

Prezenta invenție se referă la un construct de anticorp bispecific care cuprinde un prim domeniu de legare care se leagă la MSLN umană pe suprafața unei celule țintă și un al doilea domeniu de legare care se leagă la CD3 uman pe suprafața unei celule T, așa cum este definit în revendicări. Mai mult, invenția furnizează o polinucleotidă care codifică constructul de anticorp și o celulă gazdă transformată sau transfectată cu respectiva polinucleotidă, așa cum este definită în revendicări. Mai mult, invenția furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde constructul de anticorp conform invenției, o utilizare medicală a constructului de anticorp menționat și un kit care cuprinde constructul de anticorp menționat, așa cum este definit în revendicări.

INTRODUCERE:

Mezotelina este o proteină de suprafață celulară care a fost descoperită inițial ca un antigen recunoscut de K1, un anticorp monoclonal derivat prin imunizarea șoarecilor cu linia celulară de cancer ovarian uman OVCAR-3 (Chang și colab., Int. J. Cancer 1992). Clonarea exprimării a fost utilizată pentru a identifica ADNc-ul mezotelinei dintr-o bibliotecă HeLa (Chang și colab., PNAS 1996). Analiza moleculară a demonstrat că gena mezotelinei este codificată într-o proteină precursoră de 69 kD, care este scindată de furină pentru a furniza două proteine distincte: factorul de potențare a megacariocitelor (MPF), o proteină de 31 kD care este eliminată și mezotelina, o proteină de 40 kD care se asociază cu membrana celulară printr-o legătură glicofosfatidilinozitol (ancoră GPI) (Chang și colab., PNAS 1996). Proteina mezotelină este organizată în domenii superelicoidale, cu repetări de tip ARM.

Mezotelina este foarte exprimată în cancerul ovarian, precum și în alte tipuri de tumori, inclusiv cancerul pancreatic, mezoteliomul, cancerul pulmonar, cancerul gastric și cancerul de sân triplu negativ. În țesuturile normale, mezotelina este exprimată în principal în stratul de celule mezoteliale din cavitățile pleurale, pericardice și peritoneale. Mezotelina este exprimată și pe epiteliul de suprafață al ovarului normal, trompei uterine și amigdalei.

Pe lângă exprimarea sa pe suprafața celulară, mezotelina este, de asemenea, eliminată în ser prin acțiunea ADAM17/TACE. Nivelurile serice de mezotelină eliminată sunt crescute la pacienții cu cancer ovarian și alte tipuri de cancer. MESOMARK[®], un test ELISA pentru mezotelina serică eliminată, este aprobat de FDA pentru uz uman și poate ajuta la diagnosticarea sau monitorizarea mezoteliomului. Mezotelina eliminată a fost, de asemenea, utilizată, singură, sau împreună cu alți markeri, pentru a ajuta la diagnosticarea sau prognosticul altor tipuri de cancer.

Corelația nivelurilor serice de mezotelină eliminată cu boala a sugerat un rol potențial al proteinei mezotelină în progresia cancerului. În timp ce funcția biologică a mezotelinei nu este bine înțeleasă - șoarecii knockout par normali - s-a demonstrat că mezotelina leagă mucina MUC16/CA-125. S-a sugerat că interacțiunea mezotelină-CA-125 funcționează în adeziunea, invazia și metastaza celulară.

Primii anticorpi generați împotriva mezotelinei pentru intervenție terapeutică au fost proiectați să interfereze cu interacțiunea dintre mezotelină și CA-125. Expunerea pe fagi a identificat Fv SS, care a fost optimizat cu privire la afinitate și utilizat pentru a genera o imunotoxină recombinantă care vizează mezotelina, SS1P. Anticorpul MORAb-009 amatuximab, care folosește și SS1, recunoaște un epitop nelinier în cei 64 de aminoacizi amino terminali ai mezotelinei. SS1 Fv a fost, de asemenea, utilizat pentru a genera celule T create de receptorul antigen himeric. Anticorpul anti-mezotelină au fost, de asemenea, utilizați pentru a genera conjugate de medicamente, cum ar fi Anetumab ravtansine, care conține anticorpul MF-T cuplat la DM4 și anticorpul 7D9 conjugat la monometil auristatina E. Acești anticorpi anti-mezotelină recunosc, de asemenea, regiunea amino terminală a proteinei (aminoacizi 296-390) deși nu concurează cu. Aceste terapii țintite anti-mezotelină care se află în prezent în studii clinice au demonstrat o eficacitate limitată ca agenți unici.

WO2014/004549 dezvăluie constructe bispecifice care leagă mezotelina și CD3. WO2010/124797 dezvăluie imunoconjugate anti-mezotelină bazate pe un anticorp anti-mezotelină pentru tratamentul cancerului pancreatic care exprimă mezotelină.

Foarte recent, au fost raportați noi anticorpi anti-mezotelină care recunosc alte regiuni ale proteinei mezotelină. Rămâne încă o nevoie de a înțelege dacă anticorpul împotriva diferiților epitopi ai mezotelinei decât SS1/MORAb-009 (de exemplu, anticorpul care nu sunt concurați de mezotelină eliminată sau CA-125 eliminat) ar fi îmbunătățit eficacitatea la pacienți.

Deoarece există încă o nevoie de a avea la dispoziție opțiuni suplimentare pentru tratamentul bolilor cu tumori solide legate de supraexprimarea MSLN, cum ar fi cancerul ovarian, cancerul pancreatic, mezoteliomul, cancerul pulmonar, cancerul gastric și cancerul de sân triplu negativ, prin prezenta sunt oferite mijloace și metode pentru rezolvarea acestei probleme sub forma unui construct de anticorp bispecific având un domeniu de legare direcționat către MSLN pe suprafața celulelor țintă tumorale și un al doilea domeniu de legare direcționat către CD3 pe suprafața celulelor T.

Astfel, într-un prim aspect, prezenta invenție furnizează un construct de anticorp bispecific care cuprinde un prim domeniu de legare care se leagă la MSLN umană pe suprafața unei celule țintă și un al doilea domeniu de legare care se leagă de CD3 uman pe suprafața unei celule T, în care primul domeniu de legare se leagă la un epitop al MSLN care este cuprins în regiunea descrisă în SECV ID NR: 245;

în care primul domeniu de legare care leagă MSLN umană cuprinde o regiune VH cuprinzând CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 și o regiune VL cuprinzând CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 selectate din grupul constând din:

- a) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 161, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 162, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 163, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 164, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 165 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 166;
- b) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 171, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 172, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 173, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 174, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 175 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 176;
- c) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 181, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 182, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 183, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 184, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 185 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 186;
- d) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 191, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 192, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 193, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 194, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 195 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 196; și
- e) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 201, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 202, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 203, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 204, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 205 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 206.

De asemenea, este dezvăluit un construct de anticorp bispecific care cuprinde un prim domeniu de legare care se leagă la MSLN umană pe suprafața unei celule țintă și un al doilea domeniu de legare care se leagă la CD3 uman pe suprafața unei celule T, în care primul domeniu de legare se leagă la un epitop al MSLN care este cuprins în variantele MSLN descrise în SECV ID NR: 231, 232 și 233 și se leagă în plus la MSLN *Macaca fascicularis* așa cum este descris în SECV ID NR: 234.

Trebuie remarcat faptul că, așa cum sunt utilizate aici, formele de singular "un", "unul" și "acela" includ referințe la plural, cu excepția cazului în care contextul indică în mod clar altfel. Astfel, de exemplu, referința la "un reactiv" include unul sau mai mulți dintre acești reactivi diferiți, și referința la "metodă" include referința la etape echivalente și metode cunoscute celor cu calificare obișnuită în domeniu care ar putea fi modificate sau substituite pentru metodele descrise aici.

Dacă nu se indică altfel, termenul "cel puțin" care precede o serie de elemente trebuie înțeles a se referi la fiecare element din serie. Persoanele cu calificare în domeniu vor recunoaște sau vor putea constata folosind nu mai mult decât experimentarea de rutină, multe echivalențe la exemplele de realizare specifice ale invenției descrise aici. Astfel de echivalențe sunt intenționate să fie cuprinse de prezenta invenție.

Termenul "și/sau" oriunde este utilizat aici include semnificația "și", "sau" și "toate sau orice altă combinație a elementelor legate de termenul menționat".

Termenul "aproximativ" sau "circa" așa cum este utilizat aici înseamnă în intervalul $\pm 20\%$, preferabil în intervalul $\pm 15\%$, mai preferabil în intervalul $\pm 10\%$, și cel mai preferabil în intervalul $\pm 5\%$ dintr-o valoare sau interval dat.

Pe parcursul acestei specificații și al revendicărilor care urmează, cu excepția cazului în care contextul cere altfel, cuvântul "a cuprinde", și variații, cum ar fi "cuprinde" și "cuprinzând", vor fi înțelese ca implicând includerea unui număr întreg declarat sau a unei trepte sau a unui grup de numere întregi sau trepte, dar nu excluderea oricărui alt număr întreg sau treaptă sau grup de numere întregi sau treaptă. Când este utilizat aici, termenul "cuprinzând" poate fi substituit cu termenul "conținând" sau "incluzând" sau uneori când este utilizat aici cu termenul "având".

Când este utilizat aici, "constând din" exclude orice element, etapă sau ingredient nespecificat în elementul revendicării. Atunci când este utilizat aici, "constând în esență din" nu exclude materialele sau etapele care nu afectează material caracteristicile de bază și noi ale revendicării.

În fiecare caz de aici, oricare dintre termenii "cuprinzând", "constând în esență din" și "constând din" poate fi înlocuit cu oricare dintre ceilalți doi termeni.

Termenul "construct de anticorp" se referă la o moleculă în care structura și/sau funcția se bazează pe structura și/sau funcția unui anticorp, de ex., a unei molecule de imunoglobulină cu lungime completă sau întreagă. Un construct de anticorp este, prin urmare, capabil să se lege de ținta sau antigenul său specific. Mai mult, un construct de anticorp conform invenției cuprinde cerințele structurale minime ale unui anticorp care

permit legarea țintei. Această cerință minimă este definită de prezența a cel puțin celor trei CDR-uri de lanț ușor (adică CDR1, CDR2 și CDR3 din regiunea VL) și a celor trei CDR-uri de lanț greu (adică CDR1, CDR2 și CDR3 din regiunea VH), adică a tuturor șase CDR-uri. Anticorpul pe care se bazează constructele conform invenției includ, de exemplu, anticorpi monoclonali, recombinanți, himerici, dezimunizați, umanizați și umani.

În definiția "constructelor de anticorpi" conform invenției sunt cuprinși anticorpi de lungime completă sau întregi incluzând, de asemenea, anticorpi de camelide și alți anticorpi de imunoglobuline generați prin metode sau procese biotehnologice sau de inginerie proteică. Acești anticorpi de lungime completă pot fi, de exemplu, anticorpi monoclonali, recombinanți, himerici, dezimunizați, umanizați și umani. De asemenea, în definiția "constructelor de anticorpi" sunt incluse fragmente de anticorpi de lungime completă, cum ar fi VH, VHH, VL, (s)dAb, Fv, Fd, Fab, Fab', F(ab')₂ sau "r IgG" ("jumătate de anticorp"). Constructele de anticorpi conform invenției pot fi, de asemenea, fragmente modificate de anticorpi, numite și variante de anticorpi, cum ar fi scFv, di-scFv sau bi(s)-scFv, scFv-Fc, scFv-fermoar, scFab, Fab₂, Fab₃, diacorpi, diacorpi cu lanț unic, diacorpi tandem (Tandab), di-scFv tandem, tri-scFv tandem, "minicorpi" exemplificați printr-o structură care este după cum urmează: (VH-VL-CH₃)₂, (scFv-CH₃)₂, ((scFv)₂-CH₃ + CH₃), ((scFv)₂-CH₃) sau (scFv-CH₃-scFv)₂, multicorpi cum ar fi triacorpi sau tetracorpi și anticorpi cu un singur domeniu, cum ar fi nanocorpi sau anticorpi cu un singur domeniu variabil care cuprind doar un domeniu variabil, care ar putea fi VHH, VH sau VL, care leagă în mod specific un antigen sau epitop independent de alte regiuni sau domenii V.

Un domeniu de legare poate cuprinde în mod tipic o regiune variabilă a lanțului ușor de anticorp (VL) și o regiune variabilă a lanțului greu de anticorp (VH); cu toate acestea, nu trebuie să le cuprindă pe amândouă. Fragmentele Fd, de exemplu, au două regiuni VH și adesea păstrează o anumită funcție de legare la antigen a domeniului intact de legare la antigen. Exemple suplimentare pentru formatul fragmentelor de anticorpi, variantelor de anticorpi sau domeniilor de legare includ (1) un fragment Fab, un fragment monovalent având domeniile VL, VH, CL și CH₁; (2) un fragment F(ab')₂, un fragment bivalent având două fragmente Fab legate printr-o punte disulfurică în regiunea balama; (3) un fragment Fd având cele două domenii VH și CH₁; (4) un fragment Fv având domeniile VL și VH ale unui singur braț al unui anticorp, (5) un fragment dAb (Ward și colab., (1989) Nature 341:544-546), care are un domeniu VH; (6) o regiune de determinare a complementarității (CDR) izolată și (7) un singur lanț Fv (scFv), acesta din urmă fiind preferat (de exemplu, derivat dintr-o bibliotecă scFV). Exemple de exemple de

realizare a constructelor de anticorpi conform invenției sunt descrise, de ex., în WO 00/006605, WO 2005/040220, WO 2008/119567, WO 2010/037838, WO 2013/026837, WO 2013/026833, US 2014/0308285, US 2014/0302037, WO 2014/144722, WO 2014/151910, și WO 2015/048272.

Mai mult, definiția termenului "construct de anticorp" include constructe monovalente, bivalente și polivalente/multivalente și, prin urmare, constructe monospecifice, care se leagă în mod specific la o singură structură antigenică, precum și constructe bispecifice și polispecifice/multispecifice, care se leagă în mod specific la mai mult de o structură antigenică, de ex. două, trei sau mai multe, prin domenii de legare distincte. Mai mult, definiția termenului "construct de anticorp" include molecule care constau dintr-un singur lanț polipeptidic, precum și molecule constând din mai multe lanțuri polipeptidice, care lanțuri pot fi identice (homodimeri, homotrimeri sau homo oligomeri) sau diferite (heterodimeri, heterotrimeri sau heterooligomeri). Exemple pentru anticorpii identificați mai sus și variantele sau derivații acestora sunt descrise, printre altele, în Harlow și Lane, *Antibodies a laboratory manual*, CSHL Press (1988) și *Using Antibodies: a laboratory manual*, CSHL Press (1999), Kontermann și Dübel, *Antibody Engineering*, Springer, 2nd ed. 2010 și Little, *Recombinant Antibodies for Immunotherapy*, Cambridge University Press 2009.

Constructele de anticorpi conform prezentei invenții sunt, de preferință, "constructe de anticorpi generați in vitro". Acest termen se referă la un construct de anticorp conform definiției de mai sus, în care întreaga regiune variabilă sau o parte a acesteia (de ex., cel puțin o CDR) este generată într-o selecție de celule non-imune, de ex., o expunere pe fagi in vitro, un cip de proteine sau orice altă metodă în care secvențele candidate pot fi testate cu privire la capacitatea lor de a se lega la un antigen. Astfel, acest termen exclude, de preferință, secvențele generate exclusiv de rearanjarea genomică într-o celulă imună la un animal. Un "anticorp recombinant" este un anticorp produs prin utilizarea tehnologiei de ADN recombinant sau a ingineriei genetice.

Termenul "anticorp monoclonal" (mAb) sau construct de anticorp monoclonal, așa cum este utilizat aici, se referă la un anticorp obținut dintr-o populație de anticorpi substanțial omogeni, adică anticorpii individuali care cuprind populația sunt identici, cu excepția posibilelor mutații care apar în mod natural și/sau modificărilor post-translație (de ex., izomerizări, amidări) care pot fi prezente în cantități minore. Anticorpii monoclonali sunt foarte specifici, fiind direcționați împotriva unui singur situs antigenic sau determinant asupra antigenului, spre deosebire de preparatele de anticorpi

(policlonali) convenționali care includ de obicei diferiți anticorpi direcționați împotriva diferiților determinanți (sau epitopi). În plus față de specificul lor, anticorpul monoclonal sunt avantajoși prin faptul că sunt sintetizați prin cultura hibridomului, deci necontaminat de alte imunoglobuline. Modificatorul "monoclonal" indică caracterul anticorpului ca fiind obținut dintr-o populație substanțial omogenă de anticorpi și nu trebuie interpretat ca necesitând producerea anticorpului prin nici o metodă particulară.

Pentru prepararea anticorpilor monoclonali poate fi utilizată orice tehnică care furnizează anticorpi produși prin culturi de linii celulare continue. De exemplu, anticorpul monoclonal care trebuie utilizați pot fi produși prin metoda hibridomului descrisă mai întâi de Koehler și colab., *Nature*, 256: 495 (1975), sau pot fi produși prin metode de ADN recombinant (a se vedea, de ex., Brevetul SUA Nr. 4.816.567). Exemple de tehnici suplimentare pentru producerea de anticorpi monoclonali umani includ tehnica triomului, tehnica hibridomului cu celule B umane (Kozbor, *Immunology Today* 4 (1983), 72) și tehnica hibrodromului EBV (Cole și colab., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96).

Hibridomii pot fi apoi testați folosind metode standard, cum ar fi testul imunosorbent legat de enzime (ELISA) și rezonanța plasmonilor de suprafață (BIAcore™), pentru a identifica unul sau mai mulți hibridomi care produc un anticorp care se leagă în mod specific cu un antigen specificat. Orice formă a antigenului relevant poate fi utilizată ca imunogen, de ex., antigen recombinant, forme naturale, orice variante sau fragmente ale acestuia, precum și o peptidă antigenică a acestuia. Rezonanța plasmonilor de suprafață, așa cum este folosită în sistemul BIAcore, poate fi utilizată pentru a crește eficiența anticorpilor fagi care se leagă la un epitop al unui antigen țintă, cum ar fi MSLN sau CD3 epsilon (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmberg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13).

O altă metodă, cu titlu de exemplu, de producere a anticorpilor monoclonali include screeningul bibliotecilor de exprimare a proteinelor, de ex., al bibliotecilor de expunere pe fagi sau bibliotecilor de expunere pe ribozomi. Expunerea pe fagi este descrisă, de exemplu, în Ladner și colab., Brevetul SUA Nr. 5.223.409; Smith (1985) *Science* 228:1315-1317, Clackson și colab., *Nature*, 352: 624-628 (1991) și Marks și colab., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991).

În plus față de utilizarea bibliotecilor de expunere, antigenul relevant poate fi utilizat pentru a imuniza un animal non-uman, de ex., o rozătoare (cum ar fi un șoarece, hamster, iepure sau șobolan). Într-un exemplu de realizare, animalul non-uman include cel puțin o

parte a unei gene a imunoglobulinei umane. De exemplu, este posibil să se proiecteze tulpini de șoarece deficiente în producția de anticorpi de șoarece cu fragmente mari de locusuri de Ig (imunoglobulină) umană. Folosind tehnologia hibridomului, pot fi produși și selectați anticorpi monoclonali specifici antigenului derivați din gene cu specificitatea dorită. A se vedea, de ex., XENOMOUSE™, Green și colab. (1994) *Nature Genetics* 7:13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096, și WO 96/33735.

Un anticorp monoclonal poate fi, de asemenea, obținut de la un animal non-uman, și apoi modificat, de ex., umanizat, dezimunizat, himerizat, etc., utilizând tehnici de ADN recombinant cunoscute în domeniu. Exemple de constructe de anticorpi modificate includ variante umanizate de anticorpi non-umani, anticorpi cu "afinitate maturată" (a se vedea, de ex. Hawkins și colab. *J. Mol. Biol.* 254, 889-896 (1992) și Lowman și colab., *Biochemistry* 30, 10832- 10837 (1991)) și mutanți de anticorp cu funcție (funcții) efectoare modificată (a se vedea, de ex., Brevetul SUA 5.648.260, Kontermann și Dübel (2010), *loc. cit.* și Little (2009), *loc. cit.*).

În imunologie, maturarea afinității este procesul prin care celulele B produc anticorpi cu afinitate crescută pentru antigen în cursul unui răspuns imun. Cu expuneri repetate la același antigen, o gazdă va produce anticorpi cu afinități succesiv mai mari. La fel ca prototipul natural, maturarea afinității *in vitro* se bazează pe principiile mutației și selecției. Maturarea afinității *in vitro* a fost folosită cu succes pentru a optimiza anticorpilor, constructele de anticorpi și fragmentele de anticorpi. Mutațiile aleatorii din interiorul CDR-urilor sunt introduse folosind radiații, mutageni chimici sau PCR predispuse la erori. În plus, diversitatea genetică poate fi mărită prin amestecarea lanțului. Două sau trei runde de mutație și selecție folosind metode de expunere, cum ar fi expunerea pe fagi, duc de obicei la fragmente de anticorpi cu afinități în domeniul nanomolar scăzut.

Un tip preferat de variație de substituție de aminoacizi a constructelor de anticorpi implică substituția unuia sau mai multor resturi de regiune hipervariabilă ale unui anticorp părinte (de ex., un anticorp umanizat sau uman). În general, variantele rezultate selectate pentru dezvoltarea ulterioară vor avea proprietăți biologice îmbunătățite în raport cu anticorpul părinte din care sunt generate. O modalitate convenabilă de a genera astfel de variante de substituție implică maturarea afinității folosind expunerea pe fagi. Pe scurt, mai multe situsuri ale regiunii hipervariabile (de ex., 6-7 situsuri) sunt mutate pentru a genera toate substituțiile posibile de aminoacizi la fiecare situs. Variantele de anticorpi astfel generate sunt expuse într-un mod monovalent din particule de fagi filamentose ca

fuziuni cu produsul genei III din M13 ambalat în fiecare particulă. Variantele expuse pe fagi sunt apoi selectate pentru activitatea lor biologică (de ex., afinitate de legare) așa cum este dezvoltat aici. Pentru a identifica situsurile regiunii hipervariabile candidate pentru modificare, se poate efectua mutageneză de scanare cu alanină pentru a identifica reziduurile regiunii hipervariabile contribuind semnificativ la legarea antigenului. Alternativ sau suplimentar, poate fi benefic să se analizeze o structură cristalină a complexului antigen-anticorp pentru a identifica punctele de contact între domeniul de legare și, de ex., MSLN umană. Astfel de reziduuri de contact și reziduuri învecinate sunt candidați la substituție în conformitate cu tehnicile elaborate aici. Odată ce astfel de variante sunt generate, panoul de variante este supus screeningului așa cum este descris aici și anticorpii cu proprietăți superioare într-una sau mai multe teste relevante pot fi selectați pentru dezvoltare ulterioară.

Anticorpii monoclonali și constructele de anticorpi din prezenta invenție includ în mod specific anticorpi "himerici" (imunoglobuline) în care o porțiune a lanțului greu și/sau ușor este identică sau omoloagă cu secvențele corespunzătoare în anticorpi derivați de la o anumită specie sau aparținând unei anumite clase sau subclase de anticorpi, în timp ce restul lanțului (lanțurilor) este identic sau omolog cu secvențele corespunzătoare în anticorpi derivați de la o altă specie sau aparținând unei alte clase sau subclase de anticorpi, precum și fragmente ale unor astfel de anticorpi, atâta timp cât prezintă activitatea biologică dorită (Brevetul SUA Nr. 4.816.567; Morrison și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. SUA, 81: 6851-6855 (1984)). Anticorpii himerici de interes din prezenta includ anticorpi "primitivi" care cuprind secvențe de legare a antigenului domeniului variabil derivat de la un primat neuman (de ex., Cercopitecide, Hominoide etc.) și secvențe de regiune constantă umană. Au fost descrise o varietate de abordări pentru producerea anticorpilor himerici. A se vedea de ex, Morrison și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda și colab., Nature 314:452, 1985, Cabilly și colab., Brevetul SUA Nr. 4.816.567; Boss și colab., Brevetul SUA Nr. 4.816.397; Tanaguchi și colab., EP 0171496; EP 0173494; și GB 2177096.

Un anticorp, un construct de anticorp, un fragment de anticorp sau o variantă de anticorp poate fi, de asemenea, modificat(ă) prin deleția specifică a epitopilor celulelor T umane (o metodă numită "dezimunizare") prin metodele descrise, de exemplu, în WO 98/52976 sau WO 00/34317. Pe scurt, domeniile variabile ale lanțului greu și ușor ale unui anticorp pot fi analizate pentru peptide care se leagă la MHC clasa II; aceste peptide reprezintă epitopi potențiali ai celulelor T (așa cum sunt definiți în WO 98/52976 și WO

00/34317). Pentru detectarea potențialilor epitopi ai celulelor T, poate fi aplicată o abordare de modelare computerizată numită "filetarea peptidei" și, în plus, poate fi căutată o bază de date cu peptide de legare a MHC umane clasa II pentru motivele prezente în secvențele VH și VL, așa cum este descris în WO 98/52976 și WO 00/34317. Aceste motive se leagă de oricare dintre cele 18 alotipuri majore MHC clasa II DR și astfel constituie epitopi potențiali ai celulelor T. Epitopii potențiali ai celulelor T detectați pot fi eliminați prin substituirea unui număr mic de reziduuri de aminoacizi în domeniile variabile sau, de preferință, prin substituții de aminoacizi unici. De obicei, se fac substituții conservatoare. Adesea, dar nu exclusiv, poate fi utilizat un aminoacid comun unei poziții în secvențele de anticorpi ai liniei germinale umane. Secvențele liniei germinale umane sunt dezvăluite, *de ex.* în Tomlinson, și colab. (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G.P. și colab. (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242; și Tomlinson și colab. (1995) EMBO J. 14: 14:4628-4638. Directorul V BASE oferă un director cuprinzător de secvențe de regiune variabilă a imunoglobulinei umane (compilat de Tomlinson, LA. și colab. Centrul MRC pentru Ingineria Proteinelor, Cambridge, Marea Britanie). Aceste secvențe pot fi utilizate ca sursă de secvență umană, *de ex.*, pentru regiunile cadru și CDR-uri. Regiunile cadru umane consens pot fi, de asemenea, utilizate, *de exemplu*, așa cum este descris în Brevetul SUA Nr. 6.300.064.

Anticorpii "umanizați", construite de anticorpi, variante sau fragmente ale acestora (cum ar fi Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ sau alte subsecvențe ale anticorpilor care leagă antigenul) sunt anticorpi sau imunoglobuline cu secvențe preponderent umane, care conțin (a) secvențe minime derivate din imunoglobulină non-umană. În cea mai mare parte, anticorpii umanizați sunt imunoglobuline umane (anticorp receptor) în care reziduurile dintr-o regiune hipervariabilă (de asemenea, CDR) a receptorului sunt înlocuite cu reziduuri dintr-o regiune hipervariabilă a unei specii neumane (de *ex.*, rozătoare) (anticorp donator) cum ar fi șoarecele, șobolanul, hamsterul sau iepurele având specificitatea, afinitatea și capacitatea dorite. În unele cazuri, reziduurile regiunii cadru Fv (FR) ale imunoglobulinei umane sunt înlocuite cu reziduuri neumane corespunzătoare. Mai mult, "anticorpii umanizați", așa cum se utilizează aici, pot cuprinde, de asemenea, reziduuri care nu se găsesc nici în anticorpii receptor, nici în anticorpii donator. Aceste modificări sunt făcute pentru a rafina și optimiza în continuare performanța anticorpilor. Anticorpii umanizați pot cuprinde, de asemenea, cel puțin o porțiune dintr-o regiune constantă a imunoglobulinei (Fc), în mod tipic aceea a unei imunoglobuline umane. Pentru detalii suplimentare, a se vedea Jones și colab., Nature,

321: 522-525 (1986); Reichmann și colab., *Nature*, 332: 323-329 (1988); și Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

Anticorprii umanizați sau fragmente ale acestora pot fi generați prin înlocuirea secvențelor domeniului variabil Fv care nu sunt direct implicate în legarea antigenului cu secvențe echivalente din domeniile variabile Fv umane. Metode, cu titlu de exemplu, pentru generarea de anticorpi umanizați sau fragmente ale acestora sunt furnizate de Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; de Oi și colab. (1986) *BioTechniques* 4:214; și de US 5.585.089; US 5.693.761; US 5.693.762; US 5.859.205; și US 6.407.213. Aceste metode includ izolarea, manipularea și exprimarea secvențelor de acid nucleic care codifică toate sau o parte din domeniile variabile ale imunoglobulinei Fv din cel puțin unul dintr-un lanț greu sau ușor. Astfel de acizi nucleici pot fi obținuți dintr-un hibridom care produce un anticorp împotriva unei ținte determinate, așa cum este descris mai sus, precum și din alte surse. ADN-ul recombinant care codifică molecula de anticorp umanizat poate fi apoi clonat într-un vector de exprimare adecvat.

Anticorprii umanizați pot fi produși, de asemenea, utilizând animale transgenice, cum ar fi șoarecii care exprimă gene ale lanțului greu și ușor uman, dar sunt incapabili să exprime genele endogene ale imunoglobulinei de șoarece. Winter descrie un exemplu de metodă de grefare CDR care poate fi utilizată pentru a prepara anticorprii umanizați descriși aici (Brevetul SUA Nr. 5.225.539). Toate CDR-urile unui anumit anticorp uman pot fi înlocuite cu cel puțin o porțiune dintr-o CDR non-umană sau doar unele dintre CDR-uri pot fi înlocuite cu CDR-uri non-umane. Este necesar doar să se înlocuiască numărul de CDR-uri necesare pentru legarea anticorpului umanizat la un antigen determinat.

Un anticorp umanizat poate fi optimizat prin introducerea de substituții conservatoare, substituții de secvență consens, substituții de linie germinală și/sau mutații inverse. Astfel de molecule de imunoglobulină modificate pot fi produse prin oricare dintre mai multe tehnici cunoscute în domeniu (de ex., Teng și colab., *Proc. Natl. Acad. Sci. S.U.A.*, 80: 7308-7312, 1983; Kozbor și colab., *Immunology Today*, 4: 7279, 1983; Olsson și colab., *Meth. Enzymol.*, 92: 3-16, 1982, și EP 239 400).

Termenul "anticorp uman", "construct de anticorp uman" și "domeniu de legare uman" include anticorpi, constructe de anticorpi și domenii de legare având regiuni de anticorpi, cum ar fi regiuni variabile și constante sau domenii care corespund în mod substanțial secvențelor de imunoglobuline ale liniei germinale umane cunoscute în domeniu, incluzându-le, de exemplu, pe cele descrise de Kabat *et al.* (1991) (*loc. cit.*). Anticorprii umani, constructele de anticorpi sau domeniile de legare ale invenției pot

include resturi de aminoacizi necodificate de secvențele de imunoglobuline ale liniei germinale umane (*de ex.*, mutații introduse prin mutageneză aleatorie sau specifică situsului *in vitro* sau prin mutație somatică *in vivo*), de exemplu, în CDR-uri și, în special, în CDR3. Anticorprii umani, constructele de anticorpi sau domeniile de legare pot avea cel puțin una, două, trei, patru, cinci sau mai multe poziții înlocuite cu un reziduu de aminoacizi care nu este codificat de secvența de imunoglobulină a liniei germinale umane. Definiția anticorpilor umani, a constructelor de anticorpi și a domeniilor de legare, așa cum este utilizată aici, are în vedere și anticorprii complet umani, care includ doar secvențe umane de anticorpi modificate non-artificial și/sau genetic, deoarece aceștia pot fi derivați folosind tehnologii sau sisteme, cum ar fi Xenomouse.

În unele exemple de realizare, constructele de anticorpi ale invenției sunt constructe de anticorpi "izolate" sau "substanțial pure". "Izolată" sau "substanțial pur", atunci când este utilizat pentru a descrie constructele de anticorpi dezvăluite aici, înseamnă un construct de anticorp care a fost identificat, separat și/sau recuperat dintr-o componentă a mediului său de producție. De preferință, constructul de anticorp este liber sau substanțial lipsit de asociere cu toate celelalte componente din mediul său de producție. Componentele contaminante ale mediului său de producție, cum ar fi cel care rezultă din celulele transfectate recombinante, sunt materiale care ar interfera în mod obișnuit cu utilizările diagnostice sau terapeutice pentru polipeptidă și pot include enzime, hormoni și alte substanțe dizolvate proteice sau neproteice. Constructele de anticorpi pot constitui, de ex., cel puțin aproximativ 5% sau cel puțin aproximativ 50% în greutate din proteina totală dintr-o probă dată. Se înțelege că proteina izolată poate constitui de la 5% la 99,9% în greutate din conținutul total de proteine, în funcție de circumstanțe. Polipeptida poate fi realizată la o concentrație semnificativ mai mare prin utilizarea unui promotor inductibil sau promotor cu exprimare ridicată, astfel încât să fie produs la niveluri crescute de concentrație. Definiția include producerea unui construct de anticorp într-o mare varietate de organisme și/sau celule gazdă care sunt cunoscute în domeniu. În exemple de realizare preferate, constructul de anticorp va fi purificat (1) într-un grad suficient pentru a obține cel puțin 15 reziduuri de secvență de aminoacizi cu N-terminal sau intern prin utilizarea unei cupe de secvențiere de filare sau (2) la omogenitate prin SDS-PAGE în condiții nereducătoare sau reducătoare utilizând colorare cu albastru Coomassie sau, de preferință, de argint. În mod obișnuit, totuși, un construct de anticorp izolat va fi preparat prin cel puțin o etapă de purificare.

Termenul "domeniu de legare" caracterizează în legătură cu prezenta invenție un domeniu care (în mod specific) se leagă la/interacționează cu/recunoaște un anumit epitop țintă sau un anumit situs țintă pe moleculele țintă (antigene), aici: MSLN și respectiv CD3. Structura și funcția primului domeniu de legare (recunoașterea MSLN), și, de preferință, de asemenea, structura și/sau funcția celui de al doilea domeniu de legare (recunoașterea CD3), se bazează pe structura și/sau funcția unui anticorp, de ex. a unei molecule de imunoglobulină de lungime completă sau întreagă. Conform invenției, primul domeniu de legare este caracterizat prin prezența a trei CDR-uri ale lanțului ușor (adică CDR1, CDR2 și CDR3 ale regiunii VL) și/sau trei CDR-uri ale lanțului greu (adică CDR1, CDR2 și CDR3 ale regiunii VH). Al doilea domeniu de legare cuprinde, de asemenea, de preferință, cerințele structurale minime ale unui anticorp care permit legarea țintei. Mai preferabil, al doilea domeniu de legare cuprinde cel puțin trei CDR-uri ale lanțului ușor (adică CDR1, CDR2 și CDR3 ale regiunii VL) și trei CDR-uri ale lanțului greu (adică CDR1, CDR2 și CDR3 ale regiunii VH). Se preconizează că primul și/sau al doilea domeniu de legare este produs prin sau poate fi obținut prin expunerea pe fagi sau prin metode de screening de bibliotecă, mai degrabă decât prin grefarea secvențelor CDR dintr-un anticorp (monoclonal) preexistent într-un eșafod cadru.

Conform prezentei invenții, domeniile de legare sunt sub forma uneia sau mai multor polipeptide. Astfel de polipeptide pot include părți proteice și părți neproteice (de ex., linker chimici sau agenți chimici de reticulare, cum ar fi glutaraldehida). Proteinele (inclusiv fragmente ale acestora, de preferință fragmente biologic active și peptide, având de obicei mai puțin de 30 de aminoacizi) cuprind doi sau mai mulți aminoacizi cuplați între ei printr-o legătură peptidică covalentă (rezultând un lanț de aminoacizi). Termenul "polipeptidă" așa cum este utilizat aici descrie un grup de molecule, care constau de obicei din mai mult de 30 de aminoacizi. Polipeptidele pot forma în continuare multimeri, cum ar fi dimeri, trimeri și oligomeri superiori, *adică*, constând din mai mult de o moleculă de polipeptidă. Moleculele polipeptidice care formează astfel de dimeri, trimeri etc. pot fi identice sau neidentice. Structurile corespunzătoare de ordin superior ale acestor multimeri sunt, în consecință, denumite homo- sau heterodimeri, homo- sau heterotrimeri etc. Un exemplu pentru un heteromultimer este o moleculă de anticorp, care, în forma sa naturală, constă din două lanțuri polipeptidice ușoare identice și două lanțuri polipeptidice grele identice. Termenii "peptidă", "polipeptidă" și "proteină" se referă, de asemenea, la peptide/polipeptide/proteine modificate în mod natural în care modificarea este efectuată de ex. prin modificări post-tranșlaționale, cum ar fi glicozilarea, acetilarea,

fosforilarea și altele asemenea. O "peptidă", "polipeptidă" sau "proteină", la care se face referire aici, poate fi, de asemenea, modificată chimic, cum ar fi pegilată. Astfel de modificări sunt bine cunoscute în domeniu și descrise aici mai jos.

De preferință, domeniul de legare care se leagă la MSLN și/sau domeniul de legare care se leagă la CD3 este/sunt domenii de legare umane. Anticorpul și constructele de anticorpi cuprinzând cel puțin un domeniu de legare uman evită unele dintre problemele asociate cu anticorpul sau constructele de anticorpi care posedă regiuni non-umane, cum ar fi de rozătoare (de ex. murin, șobolan, hamster sau iepure) regiuni variabile și/sau constante. Prezența unor astfel de proteine derivate din rozătoare poate duce la eliminarea rapidă a anticorpilor sau a constructelor de anticorpi sau poate duce la generarea unui răspuns imun împotriva anticorpului sau a constructului de anticorp de către un pacient. Pentru a evita utilizarea anticorpilor derivați de la rozătoare sau a constructelor de anticorpi, anticorpul/constructele de anticorpi umani sau complet umani pot fi generate prin introducerea funcției anticorpului uman într-un rozător, astfel încât rozătoarele să producă anticorpi complet umani.

Capacitatea de a clona și de a reconstrui locusuri umane de mărime megabază în YAC și de a le introduce în linia germinală de șoarece oferă o abordare puternică pentru elucidarea componentelor funcționale ale locusurilor foarte mari sau cartografiate brut, precum și generarea de modele utile de boli umane. În plus, utilizarea unei astfel de tehnologii pentru înlocuirea locusurilor de șoarece cu echivalenții lor umani ar putea oferi informații unice asupra exprimării și reglării produselor genetice umane în timpul dezvoltării, comunicării lor cu alte sisteme și implicării lor în inducerea și progresia bolii.

O aplicație practică importantă a unei astfel de strategii este "umanizarea" sistemului imunitar umoral al șoarecelui. Introducerea locusurilor imunoglobulinei umane (Ig) în șoareci în care genele Ig endogene au fost inactivate oferă posibilitatea de a studia mecanismele care stau la baza exprimării și asamblării programate a anticorpilor, precum și rolul lor în dezvoltarea celulelor B. Mai mult, o astfel de strategie ar putea oferi o sursă ideală pentru producerea de anticorpi monoclonali complet umani (mAb) - o etapă importantă pentru îndeplinirea promisiunii terapiei cu anticorpi în bolile umane. Se așteaptă ca anticorpul sau constructele de anticorpi complet umani să minimizeze răspunsurile imunogene și alergice intrinseci la mAb de șoareci sau derivați de la șoareci și astfel să crească eficacitatea și siguranța anticorpilor/constructelor de anticorpi administrați. Se poate aștepta ca utilizarea anticorpilor sau a constructelor de anticorpi complet umani să ofere un avantaj substanțial în tratamentul bolilor umane cronice și

recurente, cum ar fi inflamația, autoimunitatea și cancerul, care necesită administrări repetate de compuși.

O abordare către acest obiectiv a fost să se proiecteze tulpini de șoarece cu deficit de producție de anticorpi de șoarece cu fragmente mari de locusuri Ig umane în așteptarea că astfel de șoareci ar produce un repertoriu mare de anticorpi umani în absența anticorpilor de șoarece. Fragmente mari de Ig umană ar păstra marea diversitate de gene variabile, precum și reglarea adecvată a producției și exprimării anticorpilor. Prin exploatarea mașinărilor șoarecelui pentru diversificarea și selecția anticorpilor și lipsa toleranței imunologice la proteinele umane, repertoriul de anticorpi umani reprodus în aceste tulpini de șoarece ar trebui să producă anticorpi cu afinitate ridicată împotriva oricărui antigen de interes, inclusiv antigeni umani. Folosind tehnologia hibridomului, mAb umani specifici antigenului cu specificitatea dorită ar putea fi produși și selectați cu ușurință. Această strategie generală a fost demonstrată în legătură cu generarea primelor tulpini de șoarece XenoMouse (a se vedea Green și colab. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994)). Tulpinile XenoMouse au fost proiectate cu cromozomi artificiali de drojdie (YAC) care conțin fragmente de configurație a liniei germinale cu dimensiunea de 245 kb și 190 kb ale locusului lanțului greu uman și, respectiv, ale locusului lanțului ușor kappa, conținând secvențe de regiuni variabile și regiuni constante de bază. YAC care conțin Ig umană s-au dovedit a fi compatibili cu sistemul șoarecelui atât pentru rearanjare, cât și pentru exprimarea anticorpilor și au fost capabili să înlocuiască genele Ig de șoarece inactivate. Acest lucru a fost demonstrat de capacitatea lor de a induce dezvoltarea celulelor B, de a produce un repertoriu uman de tip adult cu anticorpi complet umani și de a genera mAb umani specifici antigenului. Aceste rezultate au sugerat, de asemenea, că introducerea unor porțiuni mai mari ale locusurilor Ig umane care conțin un număr mai mare de gene V, elemente de reglare suplimentare și regiuni constante de Ig umane ar putea recapitula substanțial repertoriul complet care este caracteristic răspunsului umoral uman la infecție și imunizare. Lucrarea lui Green și colab. a fost extinsă recent la introducerea a mai mult de aproximativ 80% din repertoriul de anticorpi umani prin introducerea fragmentelor YAC de configurație a liniei germinale de dimensiunea megabazei ale locusurilor lanțului greu uman și, respectiv, ale locusurilor lanțului ușor kappa. A se vedea Mendez și colab. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997).

Producerea șoarecilor XenoMouse este discutată și delimitată în continuare în Brevetul SUA Nr. 6.673.986, Brevetele SUA Nr. 6.162.963; 6.150.584; 6.114.598; 6.075.181, și 5.939.598 precum și cererile de brevet americane subiacente și Brevetele

Japoneze Nr. 3 068 180 B2, 3 068 506 B2, și 3 068 507 B2. A se vedea, de asemenea, Mendez și colab. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) și Green și Jakobovits J. *Exp. Med.* 188:483-495 (1998), EP 0 463 151 B1, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310, și WO 03/47336.

Într-o abordare alternativă, alții, inclusiv GenPharm International, Inc., au utilizat o abordare "minilocus". În abordarea minilocus, un locus de Ig exogenă este mimat prin includerea de piese (gene individuale) din locusul Ig. Astfel, una sau mai multe gene VH, una sau mai multe gene DH, una sau mai multe gene JH, o regiune constantă mu și o a doua regiune constantă (de preferință o regiune constantă gamma) sunt formate într-un construct pentru inserare într-un animal. Această abordare este descrisă în Brevetul SUA Nr. 5.545.807 acordat lui Surani și colab. și Brevetele SUA Nr. 5.545.806; 5.625.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; 5.770.429; 5.789.650; 5.814.318; 5.877.397; 5.874.299; și 6.255.458 acordat fiecare lui Lonberg și Kay, Brevetele SUA Nr. 5.591.669 și 6.023.010 acordate lui Krimpenfort și Berns, Brevetele SUA Nr. 5.612.205; 5.721.367; și 5.789.215 acordate lui Berns și colab., și Brevetul SUA Nr. 5.643.763 acordat lui Choi și Dunn. Această abordare este descrisă în plus în GenPharm International Brevetele SUA Nr. 5.569.825, 5.789.650, 5.545.806, 5.661.016, 5.814.318, și 5.364.079, precum și cererile de brevet subiacente. A se vedea, de asemenea, EP 0 546 073 B1, WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, și WO 98/24884 și Brevetul SUA Nr. 5.981.175. A se vedea în plus Taylor și colab. (1992), Chen și colab. (1993), Tuaillon și colab. (1993), Choi și colab. (1993), Lonberg și colab. (1994), Taylor și colab. (1994), și Tuaillon și colab. (1995), Fishwild și colab. (1996).

Kirin a demonstrat, de asemenea, generarea de anticorpi umani de la șoareci în care, prin fuziunea microcelulelor, au fost introduse bucăți mari de cromozomi sau cromozomi întregi. A se vedea cererile de brevet european nr. 773 288 și 843 961. Xenerex Biosciences dezvoltă o tehnologie pentru generarea potențială de anticorpi umani. În această tehnologie, șoarecii SCID sunt reconstituiți cu celule limfatice umane, de ex., celule B și/sau T. Șoarecii sunt apoi imunizați cu un antigen și pot genera un răspuns imun împotriva antigenului. A se vedea Brevetele SUA Nr. 5.476.996; 5.698.767; și 5.958.765.

Răspunsurile la anticorpi umani anti-șoarece (HAMA) au determinat industria să prepare anticorpi umanizați himeric sau în alt fel. Cu toate acestea, este de așteptat ca anumite răspunsuri la anticorpi anti-himerici umani (HACA) să fie observate, în special în

utilizările cronice sau cu doze multiple ale anticorpului. Astfel, ar fi de dorit să se furnizeze structuri de anticorpi care cuprind un domeniu de legare uman împotriva MSLN și un domeniu de legare uman împotriva CD3 pentru a anula preocupările și/sau efectele răspunsului HAMA sau HACA.

Termenii "se leagă (specific) la", "recunoaște (în mod specific)", "este (în mod specific) direcționat către" și "reacționează (specific) cu" înseamnă, în conformitate cu această invenție, că un domeniu de legare interacționează sau interacționează în mod specific cu un anumit epitop sau un anumit situs țintă pe moleculele țintă (antigene), aici: MSLN și respectiv CD3.

Termenul "epitop" se referă la un situs pe un antigen la care se leagă în mod specific un domeniu de legare, cum ar fi un anticorp sau o imunoglobulină, sau un derivat, fragment sau variantă a unui anticorp sau a unei imunoglobuline. Un "epitop" este antigenic și, prin urmare, termenul de epitop este uneori denumit aici și "structură antigenică" sau "determinant antigenic". Astfel, domeniul de legare este un „situs de interacțiune cu antigenul”. Această legare/interacțiune este, de asemenea, înțeleasă ca definind o "recunoaștere specifică".

"Epitopii" pot fi formați atât din aminoacizi alăturați, cât și din aminoacizi nealăturați, juxtapuși prin plierea terțiară a unei proteine. Un "epitop liniar" este un epitop în care o secvență primară de aminoacizi cuprinde epitopul recunoscut. Un epitop liniar include în mod tipic cel puțin 3 sau cel puțin 4 și, de obicei, cel puțin 5 sau cel puțin 6 sau cel puțin 7, de exemplu, aproximativ 8 până la aproximativ 10 aminoacizi într-o secvență unică.

Un "epitop conformațional", spre deosebire de un epitop liniar, este un epitop în care secvența primară de aminoacizi care cuprinde epitopul nu este singura componentă definitorie a epitopului recunoscut (*de ex.*, un epitop în care secvența primară de aminoacizi nu este neapărat recunoscută de domeniul de legare). De obicei, un epitop conformațional cuprinde un număr crescut de aminoacizi față de un epitop liniar. În ceea ce privește recunoașterea epitopilor conformaționali, domeniul de legare recunoaște o structură tridimensională a antigenului, de preferință o peptidă sau o proteină sau un fragment al acesteia (în contextul prezentei invenții, structura antigenică pentru unul dintre domeniile de legare este cuprinsă în proteina MSLN). De exemplu, atunci când o moleculă de proteină se pliază pentru a forma o structură tridimensională, anumiți aminoacizi și/sau scheletul polipeptidic care formează epitopul conformațional devin juxtapuși permițând anticorpului să recunoască epitopul. Metodele de determinare a

conformației epitopilor includ, dar nu sunt limitate la, cristalografie cu raze X, spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară bidimensională (2D-RMN) și etichetare spin direcționată către situs și spectroscopie de rezonanță electronică paramagnetică (EPR).

O metodă de cartografiere a epitopilor este descrisă în cele ce urmează: Când o regiune (o întindere de aminoacizi contiguă) din proteina MSLN umană este schimbată/înlocuită cu regiunea corespunzătoare a unui antigen MSLN non-umană și non-primată (de exemplu, MSLN de șoarece, dar și altele, cum ar fi pui, șobolan, hamster, iepure etc. ar putea fi, de asemenea, imaginabile), este de așteptat să apară o scădere a legării domeniului de legare, cu excepția cazului în care domeniul de legare este reactiv încrucișat pentru MSLN non-umană, non-primată utilizată. Respectiva scădere este, de preferință, de cel puțin 10%, 20%, 30%, 40% sau 50%; mai preferabil de cel puțin 60%, 70% sau 80% și cel mai preferabil de 90%, 95% sau chiar 100% în comparație cu legarea la regiunea respectivă din proteina MSLN umană, în care legarea la regiunea respectivă din proteina MSLN umană este setată să fie de 100%. Este avut în vedere ca himerele MSLN umană/MSLN non-umană menționate mai sus să fie exprimate în celule CHO. Himerele MSLN umană/MSLN non-umană pot fi, de asemenea, fuzionate cu un domeniu transmembrantar și/sau un domeniu citoplasmatic al unei proteine diferite legate de membrană, cum ar fi EpCAM, deși o astfel de tehnică nu a fost necesară pentru metoda descrisă în Exemplele 1 și 2.

Într-o metodă alternativă sau suplimentară pentru cartografierea epitopilor, pot fi generate mai multe versiuni trunchiate ale domeniului extracelular MSLN umană pentru a determina o regiune specifică care este recunoscută de un domeniu de legare. În aceste versiuni trunchiate, diferitele domenii/subdomenii sau regiuni MSLN extracelulare sunt șterse treptat, începând de la capătul N-terminal. Versiunile MSLN trunchiate care pot fi exprimate în celule CHO. Este avut în vedere, de asemenea, că versiunile MSLN trunchiate pot fi fuzionate cu un domeniu transmembrantar și/sau domeniu citoplasmatic al unei proteine diferite legate de membrană, cum ar fi EpCAM. Este avut în vedere, de asemenea, că versiunile MSLN trunchiate pot cuprinde un domeniu de peptidă semnal la capătul lor N-terminal, de exemplu o peptidă semnal derivată din peptida semnal a lanțului greu IgG de șoarece. În plus, este avut în vedere că versiunile MSLN trunchiate pot cuprinde un domeniu v5 la capătul lor N-terminal (în urma peptidei semnal) care permite verificarea exprimării lor corecte pe suprafața celulei. Este de așteptat să apară o scădere sau o pierdere a legării cu acele versiuni MSLN trunchiate care nu mai cuprind

regiunea MSLN care este recunoscută de domeniul de legare. Scăderea legării este, de preferință, de cel puțin 10%, 20%, 30%, 40%, 50%; mai preferabil de cel puțin 60%, 70%, 80% și cel mai preferabil de 90%, 95% sau chiar 100%, prin care legarea la întreaga proteină MSLN umană (sau regiunea sau domeniul său extracelular) este setată la 100%.

O altă metodă pentru a determina contribuția unui reziduu specific al unui antigen țintă la recunoașterea de către un construct de anticorp sau un domeniu de legare este scanarea cu alanină (a se vedea de ex. Morrison KL & Weiss GA. *Curr Opin Chem Biol.* 2001 iun;5(3):302-7), unde fiecare reziduu de analizat este înlocuit cu alanină, de ex. prin mutageneză direcționată către situs. Alanina este utilizată datorită grupării sale funcționale metil nevoluminoase, inerte chimic, care totuși imită referințele structurii secundare pe care o posedă mulți dintre ceilalți aminoacizi. Uneori, aminoacizii voluminoși, cum ar fi valina sau leucina, pot fi utilizați în cazurile în care se dorește conservarea dimensiunii reziduurilor mutante. Scanarea cu alanină este o tehnologie matură care a fost utilizată pentru o perioadă lungă de timp.

Interacțiunea dintre domeniul de legare și epitop sau regiunea care cuprinde epitopul implică faptul că un domeniu de legare prezintă o afinitate apreciabilă pentru epitop/regiunea care cuprinde epitopul pe o anumită proteină sau antigen (aici: MSLN și, respectiv, CD3) și, în general, nu prezintă reactivitate semnificativă cu proteine sau antigeni, altele decât MSLN sau CD3. "Afinitate apreciabilă" include legarea cu o afinitate de aproximativ 10^{-6} M (KD) sau mai puternică. De preferință, legarea este considerată specifică atunci când afinitatea de legare este de aproximativ 10^{-12} la 10^{-8} M, 10^{-12} la 10^{-9} M, 10^{-12} la 10^{-10} M, 10^{-11} la 10^{-8} M, de preferință de aproximativ 10^{-11} la 10^{-9} M. Dacă un domeniu de legare reacționează în mod specific cu sau se leagă de o țintă poate fi testat cu ușurință prin, *printre altele*, compararea reacției domeniului de legare menționat cu o proteină sau un antigen țintă cu reacția domeniului de legare menționat cu alte proteine sau antigeni decât MSLN sau CD3. De preferință, un domeniu de legare al invenției nu se leagă în mod esențial sau substanțial la proteine sau antigeni, altele decât MSLN sau CD3 (adică primul domeniu de legare nu este capabil să se lege la alte proteine decât MSLN și al doilea domeniu de legare nu este capabil să se lege la alte proteine decât CD3).

Termenul "nu se leagă în mod esențial/substanțial" sau "nu este capabil să se lege" înseamnă că un domeniu de legare al prezentei invenții nu se leagă la o proteină sau un antigen altul decât MSLN sau CD3, adică nu prezintă o reactivitate mai mare de 30%, preferabil nu mai mare de 20%, mai preferabil nu mai mare de 10%, în mod deosebit

de preferabil nu mai mare de 9%, 8%, 7%, 6% sau 5% cu proteine sau antigeni, altele decât MSLN sau CD3, prin care se leagă la MSLN sau, respectiv, CD3 este setat să fie 100%.

Se crede că legarea specifică este efectuată de motive specifice din secvența de aminoacizi a domeniului de legare și a antigenului. Astfel, legarea se realizează ca urmare a structurii lor primare, secundare și/sau terțiare, precum și a rezultatului modificărilor secundare ale structurilor menționate. Interacțiunea specifică a situsului de interacțiune antigen cu antigenul său specific poate duce la o legare simplă a situsului menționat la antigen. Mai mult, interacțiunea specifică a situsului de interacțiune antigen cu antigenul său specific poate duce alternativ sau suplimentar la inițierea unui semnal, de ex. datorită inducerii unei modificări a conformației antigenului, a unei oligomerizări a antigenului etc.

De asemenea, este de preferat într-un exemplu de realizare a invenției ca cel de al doilea domeniu de legare să se lege la CD3 uman epsilon și la CD3 *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* sau *Saimiri sciureus* epsilon.

Prezenta dezvăluire furnizează un construct de anticorp bispecific care cuprinde un prim domeniu de legare care se leagă la MSLN umană pe suprafața unei celule țintă și un al doilea domeniu de legare care se leagă la CD3 uman pe suprafața unei celule T, în care primul domeniu de legare se leagă la un epitop al MSLN care este cuprins în regiunea MSLN umană având o secvență așa cum este descrisă în SECV ID NR selectată dintre SECV ID NR: 244 (cluster 1+2) și SECV ID NR: 241 (cluster 4).

Prezenta invenție furnizează un construct de anticorp bispecific care cuprinde un prim domeniu de legare care se leagă de MSLN umană pe suprafața unei celule țintă și un al doilea domeniu de legare care se leagă de CD3 uman pe suprafața unei celule T, în care primul domeniu de legare se leagă la un epitop al MSLN care este cuprins în regiunea MSLN umană având o secvență așa cum este descrisă în SECV ID NR: 245 (cluster 2+3), în care

primul domeniu de legare al constructului de anticorp bispecific al invenției cuprinde o regiune VH care cuprinde CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 și o regiune VL care cuprinde CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 selectate din grupul constând din:

- a) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 161, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 162, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 163, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 164, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 165 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 166;

- b) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 171, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 172, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 173, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 174, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 175 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 176;
- c) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 181, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 182, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 183, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 184, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 185 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 186;
- d) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 191, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 192, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 193, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 194, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 195 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 196; și
- e) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 201, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 202, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 203, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 204, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 205 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 206.

În plus, este cuprins în prezenta dezvăluire faptul că primul domeniu de legare al constructului de anticorp bispecific descris aici cuprinde o regiune VH care cuprinde CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 și o regiune VL care cuprinde CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 selectate din grupul format din:

- a) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 151, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 152, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 153, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 154, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 155 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 156;
- b) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 211, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 212, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 213, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 214, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 215 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 216; și
- c) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 221, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 222, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 223, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 224, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 225 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 226.

Termenul "variabil" se referă la porțiunile de anticorp sau domenii de imunoglobulină care prezintă variabilitate în secvența lor și care sunt implicate în

determinarea specificității și afinității de legare a unui anticorp particular (adică, "domeniu(ii) variabil(e)"). Împerecherea unui lanț greu variabil (VH) și a unui lanț ușor variabil (VL) formează împreună un singur situs de legare a antigenului.

Variabilitatea nu este distribuită uniform în domeniile variabile ale anticorpilor; este concentrată în subdomeniile fiecăreia dintre regiunile variabile ale lanțului greu și ușor. Aceste subdomenii sunt numite "regiuni hipervariabile" sau "regiuni care determină complementaritatea" (CDR). Porțiunile mai conservate (adică, nehipervariabile) ale domeniilor variabile sunt numite regiuni "cadru" (FRM sau FR) și oferă un eșafod pentru cele șase CDR-uri în spațiu tridimensional pentru a forma o suprafață care leagă antigenul. Domeniile variabile ale lanțurilor grele și ușoare care apar în mod natural cuprind fiecare patru regiuni FRM (FR1, FR2, FR3 și FR4), adoptând în mare măsură o configurație de foaie β , conectată prin trei regiuni hipervariabile, care formează bucle de conectare și, în unele cazuri, formează parte a structurii foi β . Regiunile hipervariabile din fiecare lanț sunt ținute împreună în imediata apropiere de către FRM și, împreună cu regiunile hipervariabile din celălalt lanț, contribuie la formarea situsului de legare a antigenului (a se vedea Kabat *și colab.*, *loc. cit.*).

Termenul "CDR" și pluralul său "CDR-uri" se referă la regiunea care determină complementaritatea dintre care trei alcătuiesc caracterul de legare al unei regiuni variabile a lanțului ușor (CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3) și trei alcătuiesc caracterul de legare al unei regiuni variabile a lanțului greu (CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3). CDR-urile conțin majoritatea reziduurilor responsabile de interacțiunile specifice ale anticorpului cu antigenul și, prin urmare, contribuie la activitatea funcțională a unei molecule de anticorp: sunt principalii factori determinanți ai specificității antigenului.

Limitele și lungimile definatorii exacte ale CDR sunt supuse unor sisteme diferite de clasificare și numerotare. Prin urmare, CDR-urile pot fi denumite de Kabat, Chothia, contact sau orice altă definiție a limitelor, inclusiv sistemul de numerotare descris aici. În ciuda limitelor diferite, fiecare dintre aceste sisteme are un anumit grad de suprapunere în ceea ce constituie așa-numitele "regiuni hipervariabile" în cadrul secvențelor variabile. Definițiile CDR conform acestor sisteme pot, prin urmare, să difere în lungime și zone de graniță în raport cu regiunea cadru adiacentă. A se vedea, de exemplu, Kabat (o abordare bazată pe variabilitatea secvenței între specii), Chothia (o abordare bazată pe studii cristalografice ale complexelor antigen-anticorp), și/sau MacCallum (Kabat *și colab.*, *loc. cit.*; Chothia *și colab.*, J. Mol. Biol, 1987, 196: 901-917; și MacCallum *și colab.*, J. Mol. Biol, 1996, 262: 732). Un alt standard pentru caracterizarea situsului de legare a

antigenului este definiția AbM utilizată de software-ul de modelare a anticorpilor AbM de la Oxford Molecular. A se vedea, de ex., Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. În: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. și Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). În măsura în care două tehnici de identificare a reziduurilor definesc regiuni care se suprapun, dar nu regiuni identice, ele pot fi combinate pentru a defini o CDR hibridă. Totuși, este preferată numerotarea în conformitate cu așa-numitul sistem Kabat.

De obicei, CDR-urile formează o structură de buclă care poate fi clasificată ca o structură canonică. Termenul "structură canonică" se referă la conformația lanțului principal care este adoptată de buclele de legare a antigenului (CDR). Din studii structurale comparative, s-a constatat că cinci dintre cele șase bucle de legare a antigenului au doar un repertoriu limitat de conformații disponibile. Fiecare structură canonică poate fi caracterizată prin unghiurile de torsiune ale scheletului polipeptidic. Prin urmare, buclele corespondente dintre anticorpi pot avea structuri tridimensionale foarte asemănătoare, în ciuda variabilității mari a secvenței de aminoacizi în majoritatea părților buclelor (Chothia și Lesk, J. Mol. Biol., 1987, 196: 901; Chothia și colab., Nature, 1989, 342: 877; Martin și Thornton, J. Mol. Biol, 1996, 263: 800). Mai mult, există o relație între structura de buclă adoptată și secvențele de aminoacizi care o înconjoară. Conformația unei anumite clase canonice este determinată de lungimea buclei și a resturilor de aminoacizi care se află în pozițiile cheie din buclă, precum și în cadrul conservat (*adică*, în afara buclei). Atribuirea la o anumită clasă canonică se poate face, prin urmare, pe baza prezenței acestor resturi cheie de aminoacizi.

Termenul "structură canonică" poate include, de asemenea, considerații cu privire la secvența liniară a anticorpului, de exemplu, așa cum este catalogat de Kabat (Kabat și colab., loc. cit.). Schema (sistemul) de numerotare Kabat este un standard adoptat pe scară largă pentru numerotarea reziduurilor de aminoacizi dintr-un domeniu variabil de anticorp într-o manieră consistentă și este schema preferată aplicată în prezenta invenție, așa cum este menționat și în altă parte aici. Considerații structurale suplimentare pot fi, de asemenea, utilizate pentru a determina structura canonică a unui anticorp. De exemplu, acele diferențe, care nu sunt pe deplin reflectate de numerotarea Kabat, pot fi descrise de sistemul de numerotare al lui Chothia și colab. și/sau dezvăluite prin alte tehnici, de exemplu, cristalografia și modelarea computațională bidimensională sau tridimensională. În consecință, o anumită secvență de anticorpi poate fi amplasată într-o clasă canonică care permite, printre altele, identificarea secvențelor cadru adecvate (*de*

ex., bazată pe dorința de a include o varietate de structuri canonice într-o bibliotecă). Numerotarea Kabat a secvențelor de aminoacizi a anticorpilor și considerații structurale așa cum este descris de Chothia și colab., *loc. cit.* și implicațiile lor pentru construirea aspectelor canonice ale structurii anticorpilor, sunt descrise în literatură. Structurile subunității și configurațiile tridimensionale ale diferitelor clase de imunoglobuline sunt bine-cunoscute în domeniu. Pentru o revizuire a structurii anticorpilor, a se vedea *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, ed. Harlow și colab., 1988.

CDR3 a lanțului ușor și, în special, CDR3 a lanțului greu pot constitui cei mai importanți determinanți în legarea antigenului în regiunile variabile ale lanțului ușor și greu. În unele structuri de anticorpi, CDR3 a lanțului greu pare să constituie zona principală de contact dintre antigen și anticorp. Schemele de selecție *in vitro* în care se variază numai CDR3 pot fi utilizate pentru a varia proprietățile de legare ale unui anticorp sau pentru a determina ce reziduuri contribuie la legarea unui antigen. Prin urmare, CDR3 este de obicei cea mai mare sursă de diversitate moleculară în cadrul situsului de legare a anticorpului. H3, de exemplu, poate fi la fel de scurt ca două resturi de aminoacizi sau mai mare de 26 de aminoacizi.

Într-un anticorp sau o imunoglobulină clasică de lungime completă, fiecare lanț ușor (L) este legat de un lanț greu (H) printr-o legătură disulfurică covalentă, în timp ce cele două lanțuri H sunt legate între ele printr-una sau mai multe legături disulfurice, în funcție de izotipul lanțului H. Domeniul CH cel mai apropiat de VH este de obicei desemnat ca CH1. Domeniile constante ("C") nu sunt direct implicate în legarea antigenului, dar prezintă diferite funcții efectoare, cum ar fi citotoxicitatea dependentă de anticorp, mediată de celule și activarea complementului. Regiunea Fc a unui anticorp este cuprinsă în domeniile constante ale lanțului greu și este, de exemplu, capabilă să interacționeze cu receptori Fc situați la suprafața celulei.

Secvența genelor de anticorp după asamblare și mutație somatică este foarte variată și se estimează că aceste gene variate codifică 10^{10} molecule de anticorpi diferite (*Immunoglobulin Genes*, ed. a 2-a, ed. Jonio și colab., Academic Press, San Diego, CA, 1995). În consecință, sistemul imunitar oferă un repertoriu de imunoglobuline. Termenul "repertoriu" se referă la cel puțin o secvență de nucleotide derivată în totalitate sau parțial din cel puțin o secvență care codifică cel puțin o imunoglobulină. Secvența(ele) pot fi generate prin rearanjare *in vivo* a segmentelor V, D și J ale lanțurilor grele și a segmentelor V și J ale lanțurilor ușoare. Alternativ, secvența(ele) pot fi generate dintr-o

celulă ca răspuns la care are loc rearanjarea, de exemplu, stimulare *in vitro*. Alternativ, o parte sau toate secvența(ele) pot fi obținute prin matisare ADN, sinteza nucleotidelor, mutagenază și alte metode, a se vedea, de ex., Brevetul SUA 5.565.332. Un repertoriu poate include o singură secvență sau poate include o multitudine de secvențe, inclusiv cele dintr-o colecție genetică diversă.

Un construct de anticorp conform prezentei dezvăluiri poate fi, de asemenea, definit ca un construct de anticorp bispecific care cuprinde un prim domeniu de legare (de preferință uman) care se leagă la MSLN umană pe suprafața unei celule țintă și un al doilea domeniu de legare care se leagă la CD3 uman pe suprafața unei celule T, în care primul domeniu de legare se leagă la același epitop al MSLN ca un anticorp selectat din grupul constând din MS_1 până la MS_8, adică un anticorp care cuprinde o regiune VH cuprinzând CDR-H1, CDR-H2 și CDR- H3 și o regiune VL cuprinzând CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 selectate din grupul constând din:

- a) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 151, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 152, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 153, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 154, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 155 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 156;
- b) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 161, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 162, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 163, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 164, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 165 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 166;
- c) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 171, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 172, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 173, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 174, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 175 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 176;
- d) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 181, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 182, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 183, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 184, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 185 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 186;
- e) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 191, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 192, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 193, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 194, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 195 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 196;

- f) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 201, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 202, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 203, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 204, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 205 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 206;
- g) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 211, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 212, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 213, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 214, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 215 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 216; și
- h) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 221, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 222, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 223, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 224, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 225 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 226.

Poate fi măsurat dacă un construct de anticorp se leagă sau nu de același epitop al MSLN ca un alt construct de anticorp dat, *de ex.* prin cartografierea epitopului cu molecule țintă himerice sau trunchiate, *de ex.* așa cum este descris aici mai sus și în Exemplele anexate 1 și 2.

Un construct de anticorp conform prezentei dezvăluiri poate fi, de asemenea, definit ca un construct de anticorp bispecific care cuprinde un prim domeniu de legare (de preferință uman) care se leagă la MSLN umană pe suprafața unei celule țintă și un al doilea domeniu de legare care se leagă la CD3 uman pe suprafața unei celule T, în care primul domeniu de legare concurează pentru legarea cu un anticorp selectat din grupul constând din MS_1 la MS_8, *adică*, un anticorp care cuprinde o regiune VH cuprinzând CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 și o regiune VL cuprinzând CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 selectate din grupul constând din cele descrise mai sus.

Dacă un construct de anticorp concurează sau nu pentru legarea cu un alt construct de anticorp dat, se poate măsura într-un test competitiv, cum ar fi un ELISA competitiv sau un test competitiv pe bază de celule. Pot fi utilizate și microparticule cuplate cu avidină (mărgelile). Similar unei plăci ELISA acoperite cu avidină, atunci când reacționează cu o proteină biotinilată, fiecare dintre aceste mărgelile poate fi utilizată ca substrat pe care se poate efectua un test. Antigenul este acoperit pe o mărgea și apoi pre-acoperit cu primul anticorp. Se adaugă al doilea anticorp și se determină orice legare suplimentară. Mijloacele posibile pentru citire includ citometria în flux.

Într-un exemplu de realizare, primul domeniu de legare al constructului de anticorp conform invenției cuprinde o regiune VH selectată din grupul constând din cele descrise

în SECV ID NR: 167, SECV ID NR: 177, SECV ID NR: 187, SECV ID NR: 197, și SECV ID NR: 207. Este cuprins în prezenta dezvăluire faptul că primul domeniu de legare al constructului de anticorp descris aici cuprinde o regiune VH selectată din grupul constând din cele descrise în SECV ID NR: 157, SECV ID NR: 217, și SECV ID NR: 227.

Într-un alt exemplu de realizare, primul domeniu de legare al constructului de anticorp conform invenției cuprinde o regiune VL selectată din grupul constând din cele descrise în SECV ID NR: 168, SECV ID NR: 178, SECV ID NR: 188, SECV ID NR: 198, și SECV ID NR: 208. Este cuprins în prezenta dezvăluire faptul că primul domeniu de legare al constructului de anticorp descris aici cuprinde o regiune VL selectată din grupul constând din cele descrise în SECV ID NR: 158, SECV ID NR: 218, și SECV ID NR: 228.

Într-un alt exemplu de realizare, primul domeniu de legare al constructului de anticorp conform invenției cuprinde o regiune VH și o regiune VL selectate din grupul constând din perechi formate dintr-o regiune VH și o regiune VL așa cum este descris în SECV ID NR: 167+168, SECV ID NR: 177+178, SECV ID NR: 187+188, SECV ID NR: 197+198, și SECV ID NR: 207+208. Este cuprins în prezenta dezvăluire faptul că primul domeniu de legare al constructului de anticorp descris aici cuprinde o regiune VH și o regiune VL selectate din grupul constând din perechi formate dintr-o regiune VH și o regiune VL așa cum este descris în SECV ID NR: 157+158, SECV ID NR: 217+218, și SECV ID NR: 227+228.

Într-un alt exemplu de realizare, primul domeniu de legare al constructului de anticorp conform invenției cuprinde o polipeptidă selectată din grupul constând din cele descrise în SECV ID NR: 169, SECV ID NR: 179, SECV ID NR: 189, SECV ID NR: 199, și SECV ID NR: 209. Este cuprins în prezenta dezvăluire faptul că primul domeniu de legare al constructului de anticorp descris aici cuprinde o polipeptidă selectată din grupul constând din cele descrise în SECV ID NR: 159, SECV ID NR: 219, și SECV ID NR: 229.

Primele domenii de legare de mai sus (care sunt specificate prin CDR-urile lor, regiunea VH și regiunea VL și combinațiile acestora) se caracterizează ca domenii de legare care se leagă la un epitop al MSLN așa cum este descris în SECV ID NR: 231, 232 și 233.

Termenul "bispecific", așa cum este utilizat aici, se referă la un construct de anticorp care este "cel puțin bispecific", *adică*, acesta cuprinde cel puțin un prim domeniu de legare și un al doilea domeniu de legare, în care primul domeniu de legare se leagă la un antigen sau țintă (aici: MSLN), iar al doilea domeniu de legare se leagă la un alt antigen sau țintă (aici: CD3). În consecință, constructele de anticorpi conform invenției

cuprind specificități pentru cel puțin doi antigeni sau ținte diferite. Termenul "construct de anticorp bispecific" al invenției cuprinde, de asemenea, constructe de anticorpi multispecifici, cum ar fi constructe de anticorpi trispecifici, acestea din urmă incluzând trei domenii de legare, sau constructe având mai mult de trei (de ex., patru, cinci ...) specificități.

Având în vedere că constructele de anticorpi conform invenției sunt (cel puțin) bispecifice, ele nu apar în mod natural și sunt semnificativ diferite de produsele naturale. Un construct de anticorp "bispecific" sau o imunoglobulină este, prin urmare, un anticorp hibrid artificial sau imunoglobulină având cel puțin două situsuri de legare distincte cu specificități diferite. Constructele de anticorpi bispecifici pot fi produse printr-o varietate de metode, inclusiv fuziunea hibridomilor sau legarea fragmentelor Fab'. A se vedea, de ex., Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990).

Cele cel puțin două domenii de legare și domeniile variabile ale constructului de anticorp conform prezentei invenții pot cuprinde sau nu linkerii peptidici (peptide distanțiere). Termenul "linker peptidic" cuprinde în conformitate cu prezenta invenție o secvență de aminoacizi prin care secvențele de aminoacizi ale unui domeniu (variabil și/sau de legare) și unui alt domeniu (variabil și/sau de legare) al constructului de anticorp conform invenției sunt legate între ele. O caracteristică tehnică esențială a unui astfel de linker peptidic este că acesta nu cuprinde nici o activitate de polimerizare. Printre linkerii peptidici adecvați sunt cei descriși în Brevetele SUA 4.751.180 și 4.935.233 sau WO 88/09344. Linkerii peptidici pot fi, de asemenea, utilizați pentru a atașa alte domenii sau module sau regiuni (cum ar fi domeniile care se extind cu timpul de înjumătățire) la constructul de anticorp conform invenției.

În cazul în care se utilizează un linker, acest linker are, de preferință, o lungime și o secvență suficiente pentru a se asigura că fiecare dintre primul și al doilea domeniu poate, independent unul de celălalt, să-și păstreze specificitățile de legare diferențiate. Pentru linkerii peptidici care conectează cel puțin două domenii de legare (sau două domenii variabile) în constructul de anticorp conform invenției, sunt preferați acei linkerii peptidici care cuprind doar un număr mic de resturi de aminoacizi, de ex. 12 reziduuri de aminoacizi sau mai puțin. Astfel, sunt preferați linkerii peptidici de 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 sau 5 resturi de aminoacizi. Un linker peptidic prevăzut cu mai puțin de 5 aminoacizi cuprinde 4, 3, 2 sau un aminoacid(i), în care sunt preferați linkerii bogați în Gly. Un aminoacid "unic" preferat în special în contextul "linkerului peptidic" este Gly. În consecință, linkerul peptidic menționat poate consta din aminoacidul unic Gly. Un alt

exemplu realizare preferat al unui linker peptidic este caracterizat prin secvența de aminoacizi Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, adică Gly₄Ser (SECV ID NR.: 1), sau polimeri ai acestuia, adică (Gly₄Ser)_x, în care x este un număr întreg de 1 sau mai mare (de ex. 2 sau 3). Linkeri preferați sunt descriși în SECV ID NR: 1-9. Caracteristicile linkerului peptidic menționat, care cuprind absența promovării structurilor secundare, sunt cunoscute în domeniu și sunt descrise de ex. în Dall'Acqua și colab. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle și colab. (Mol Immunol (1992) 29, 21-30) și Raag și Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Sunt de preferat linkeri peptidici care, în plus, nu promovează nici o structură secundară. Legarea domeniilor menționate unul la altul poate fi furnizată, de ex., prin inginerie genetică, așa cum este descris în exemple. Metodele de preparare a constructelor bispecifice cu un singur lanț fuzionate și legate operativ și de exprimare a acestora în celule sau bacterii de mamifere sunt bine-cunoscute în domeniu (de ex. WO 99/54440 sau Sambrook și colab., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001).

Așa cum este descris aici mai sus, invenția furnizează un exemplu de realizare preferat în care constructul de anticorp este într-un format selectat din grupul constând din (scFv)₂, mAb cu domeniu unic scFv, diacorpi și oligomeri ai oricăruia dintre aceste formate.

Conform unui exemplu de realizare deosebit de preferat, și așa cum este documentat în exemplele anexate, constructul de anticorp conform invenției este un "construct de anticorp bispecific cu lanț unic", mai preferabil un "Fv cu lanț unic" bispecific (scFv). Deși cele două domenii ale fragmentului Fv, VL și VH, sunt codificate de gene separate, ele pot fi unite, folosind metode recombinante, printr-un linker sintetic - așa cum este descris mai sus - care le permite să fie făcute ca un singur lanț proteic în care regiunile VL și VH se împerechează pentru a forma o moleculă monovalentă; a se vedea, de ex., Huston și colab. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Aceste fragmente de anticorpi sunt obținute folosind tehnici convenționale cunoscute de specialiștii în domeniu, iar fragmentele sunt evaluate cu privire la funcționare în același mod ca și anticorpii întregi sau de lungime completă. Un fragment variabil cu un singur lanț (scFv) este, prin urmare, o proteină de fuziune a regiunii variabile a lanțului greu (VH) și a lanțului ușor (VL) de imunoglobuline, de obicei conectată cu o peptidă scurtă de legătură de aproximativ zece până la aproximativ 25 aminoacizi, preferabil aproximativ 15 până la 20 de aminoacizi. Linkerul este de obicei bogat în glicină pentru flexibilitate, precum și serină sau treonină pentru solubilitate și poate conecta fie capătul N-terminal

al VH cu capătul C-terminal al VL, fie *viceversa*. Această proteină păstrează specificitatea imunoglobulinei originale, în ciuda îndepărtării regiunilor constante și a introducerii linkerului.

Moleculele bispecifice cu un singur lanț sunt cunoscute în domeniu și sunt descrise în WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brühl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426, Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56. Tehnicile descrise pentru producerea de anticorpi cu un singur lanț (a se vedea, *printre altele*, Brevetul SUA 4.946.778, Kontermann și Dübel (2010), *loc. cit.* și Little (2009), *loc. cit.*) pot fi adaptate pentru a produce structuri de anticorpi cu lanț unic care recunosc în mod specific (o) țintă(e) aleasă(e).

Fragmente variabile bivalente (numite și divalente) sau bispecifice cu un singur lanț (bi-scFv sau di-scFv având formatul (scFv)₂) pot fi proiectate prin legarea a două molecule scFv (*de ex.* cu linkeri așa cum este descris mai sus). Dacă aceste două molecule scFv au aceeași specificitate de legare, molecula (scFv)₂ rezultată se va numi de preferință bivalentă (*adică* are două valențe pentru același epitop țintă). Dacă cele două molecule scFv au specificități de legare diferite, molecula (scFv)₂ rezultată va fi, de preferință, numită bispecifică. Legarea poate fi realizată prin producerea unui singur lanț peptidic cu două regiuni VH și două regiuni VL, producând scFv tandem (*a se vedea de ex.* Kufer P. și colab., (2004) Trends in Biotechnology 22(5):238-244). O altă posibilitate este crearea de molecule scFv cu peptide linker care sunt prea scurte pentru ca cele două regiuni variabile să se plieze împreună (*de ex.* aproximativ cinci aminoacizi), forțând scFv-urile să dimerizeze. Acest tip este cunoscut sub numele de diacorpi (*a se vedea de ex.* Hollinger, Philipp și colab., (July 1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (14): 6444-8.).

Conform unui exemplu de realizare preferat al constructului de anticorp conform invenției, lanțul greu (VH) și lanțul ușor (VL) al unui domeniu de legare care se leagă fie la antigenul țintă MSLN, fie la CD3 nu sunt conectate direct printr-un linker peptidic descris mai sus, ci domeniul de legare se formează datorită formării unei molecule bispecifice așa cum este descris pentru diacorp. Astfel, lanțul VH al domeniului de legare CD3 poate fi fuzionat la VL al domeniului de legare MSLN prin intermediul unui astfel de linker peptidic, în timp ce lanțul VH al domeniului de legare MSLN este fuzionat la VL al domeniului de legare CD3 printr-un astfel de linker peptidic.

Anticorpilor cu un singur domeniu cuprind doar un domeniu variabil de anticorp (monomeric) care este capabil să se lege selectiv la un antigen specific, independent de alte regiuni sau domenii V. Primii anticorpi cu un singur domeniu au fost proiectați din anticorpi cu lanț greu găsiți în camelide și aceștia sunt numiți fragmente V_{HH} . Peștii cartilaginoși au, de asemenea, anticorpi cu lanț greu (IgNAR) din care se pot obține anticorpi cu un singur domeniu numiți fragmente V_{NAR} . O abordare alternativă este împărțirea domeniilor variabile dimerice de imunoglobulinele comune *de ex.* de la oameni sau rozătoare în monomeri, obținând astfel VH sau VL ca un Ab cu un singur domeniu. Deși majoritatea cercetărilor privind anticorpilor cu un singur domeniu se bazează în prezent pe domenii variabile ale lanțului greu, nanocorpilor derivați din lanțurile ușoare s-au dovedit, de asemenea, a se lega în mod specific de epitopii țintă. Exemplele de anticorpi cu un singur domeniu se numesc sdAb, nanocorpi sau anticorpi cu un singur domeniu variabil.

A (mAb cu un singur domeniu)₂ este, prin urmare, un construct de anticorpi monoclonali compus din (cel puțin) doi anticorpi monoclonali cu un singur domeniu, care sunt selectați individual din grupul care cuprinde VH, VL, V_{HH} și V_{NAR} . Linkerul este, de preferință, sub forma unui linker peptidic. În mod similar, un "mAb cu un singur domeniu scFv" este un construct de anticorp monoclonal compus din cel puțin un anticorp cu un singur domeniu așa cum este descris mai sus și o moleculă scFv așa cum este descrisă mai sus. Din nou, linkerul este, de preferință, sub forma unui linker peptidic.

Prezenta invenție furnizează un construct de anticorp bispecific care cuprinde un prim domeniu de legare care se leagă la MSLN umană pe suprafața unei celule țintă și un al doilea domeniu de legare care se leagă la CD3 uman pe suprafața unei celule T, în care primul domeniu de legare se leagă la un epitop al MSLN care este cuprins în regiunea descrisă în SECV ID NR: 245 (cluster 2+3), în care primul domeniu de legare al constructului de anticorp bispecific cuprinde o regiune VH cuprinzând CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 și o regiune VL cuprinzând CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 selectate din grupul constând din:

- a) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 161, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 162, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 163, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 164, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 165 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 166;
- b) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 171, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 172, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 173, CDR-

L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 174, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 175 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 176;

c) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 181, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 182, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 183, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 184, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 185 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 186;

d) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 191, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 192, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 193, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 194, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 195 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 196;

e) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 201, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 202, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 203, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 204, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 205 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 206.

Într-un exemplu de realizare, primul domeniu de legare al constructului de anticorp conform invenției cuprinde o regiune VH selectată din grupul constând din cele descrise în SECV ID NR: 167, SECV ID NR: 177, SECV ID NR: 187, SECV ID NR: 197, și SECV ID NR: 207.

Într-un alt exemplu de realizare, primul domeniu de legare al constructului de anticorp conform invenției cuprinde o regiune VL selectată din grupul constând din cele descrise în SECV ID NR: 168, SECV ID NR: 178, SECV ID NR: 188, SECV ID NR: 198, și SECV ID NR: 208.

Într-un alt exemplu de realizare, primul domeniu de legare al constructului de anticorp conform invenției cuprinde o regiune VH și o regiune VL selectate din grupul constând din perechi formate dintr-o regiune VH și o regiune VL așa cum este descris în SECV ID NR: 167+168, SECV ID NR: 177+178, SECV ID NR: 187+188, SECV ID NR: 197+198, și SECV ID NR: 207+208.

Într-un alt exemplu de realizare, primul domeniu de legare al constructului de anticorp conform invenției cuprinde o polipeptidă selectată din grupul constând din cele descrise în SECV ID NR: 169, SECV ID NR: 179, SECV ID NR: 189, SECV ID NR: 199, și SECV ID NR: 209.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, un construct de anticorp bispecific care cuprinde un prim domeniu de legare care se leagă la MSLN umană pe suprafața unei celule țintă și un al doilea domeniu de legare care se leagă de CD3 uman pe

suprafața unei celule T, în care primul domeniu de legare se leagă la un epitop al MSLN care este cuprins în regiunea descrisă în SECV ID NR: 244 (cluster 1+2).

Primul domeniu de legare al constructului de anticorp bispecific dezvăluit aici poate cuprinde o regiune VH cuprinzând CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 și o regiune VL cuprinzând CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 după cum urmează:

(a) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 151, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 152, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 153, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 154, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 155 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 156; sau

(b) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 221, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 222, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 223, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 224, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 225 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 226.

Primul domeniu de legare al constructului de anticorp dezvăluit aici poate cuprinde o regiune VH descrisă în SECV ID NR: 157 sau SECV ID NR: 227.

Primul domeniu de legare al constructului de anticorp dezvăluit aici poate cuprinde o regiune VL descrisă în SECV ID NR: 158, și SECV ID NR: 228.

Primul domeniu de legare al constructului de anticorp dezvăluit aici poate cuprinde o regiune VH și o regiune VL selectate din grupul constând din perechi formate dintr-o regiune VH și o regiune VL așa cum este descris în SECV ID NR: 157+158, și SECV ID NR: 227+228.

Primul domeniu de legare al constructului de anticorp dezvăluit aici poate cuprinde o polipeptidă selectată din grupul constând din cele descrise în SECV ID NR: 159, și SECV ID NR: 229.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, un construct de anticorp bispecific care cuprinde un prim domeniu de legare care se leagă la MSLN umană pe suprafața unei celule țintă și un al doilea domeniu de legare care se leagă de CD3 uman pe suprafața unei celule T, în care primul domeniu de legare se leagă la un epitop al MSLN care este cuprins în regiunea descrisă în SECV ID NR: 241 (cluster 4).

Primul domeniu de legare al constructului de anticorp bispecific dezvăluit aici poate cuprinde o regiune VH care cuprinde CDR-H1 așa cum este descris în SECV ID NR: 211, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 212, CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 213, CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 214, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 215 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 216.

Primul domeniu de legare al constructului de anticorp dezvăluit aici poate cuprinde o regiune VH descrisă în SECV ID NR: 217.

Primul domeniu de legare al constructului de anticorp dezvăluit aici poate cuprinde o regiune VL descrisă în SECV ID NR: 218.

Primul domeniu de legare al constructului de anticorp dezvăluit aici poate cuprinde o regiune VH și o regiune VL așa cum sunt descrise în SECV ID NR: 217+218.

Primul domeniu de legare al constructului de anticorp dezvăluit aici poate cuprinde o polipeptidă așa cum este descrisă în SECV ID NR: 219.

Un alt construct de anticorp dezvăluit aici poate fi, de asemenea, definit ca un construct de anticorp bispecific care cuprinde un prim domeniu de legare (de preferință uman) care se leagă la MSLN umană pe suprafața unei celule țintă și un al doilea domeniu de legare care se leagă la CD3 uman pe suprafața unei celule T, în care primul domeniu de legare concurează pentru legarea cu un anticorp selectat din grupul constând din MS-3, MS-4 și MS-5, *adică*, un anticorp care cuprinde o regiune VH cuprinzând CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 și o regiune VL cuprinzând CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 selectate din grupul constând din cele descrise mai sus.

Celulele T sau limfocitele T sunt un tip de limfocite (în sine un tip de globule albe) care joacă un rol central în imunitatea mediată de celule. Există mai multe subseturi de celule T, fiecare cu o funcție distinctă. Celulele T se pot distinge de alte limfocite, cum ar fi celulele B și celulele NK, prin prezența unui receptor de celule T (TCR) pe suprafața celulei. TCR este responsabil pentru recunoașterea antigenilor legați de moleculele complexului de histocompatibilitate majoră (MHC) și este compus din două lanțuri de proteine diferite. În 95% din celulele T, TCR constă dintr-un lanț alfa (α) și unul beta (β). Când TCR se angajează cu peptida antigenică și MHC (complexul peptidă/MHC), limfocitul T este activat printr-o serie de evenimente biochimice mediate de enzime asociate, co-receptori, molecule adaptoare specializate și factori de transcripție activați sau eliberați

Complexul receptor CD3 este un complex proteic și este compus din patru lanțuri. La mamifere, complexul conține un lanț CD3 γ (gamma), un lanț CD3 δ (delta) și două lanțuri CD3 ϵ (epsilon). Aceste lanțuri se asociază cu receptorul de celule T (TCR) și așa-numitul lanț ζ (zeta) pentru a forma complexul CD3 al receptorului de celule T și pentru a genera un semnal de activare în limfocitele T. Lanțurile CD3 γ (gamma), CD3 δ (delta) și CD3 ϵ (epsilon) sunt proteine de suprafață celulară foarte înrudite ale superfamiliei imunoglobulinei conținând un singur domeniu de imunoglobulină extracelulară. Cozile

intracelulare ale moleculelor CD3 conțin un singur motiv conservat cunoscut sub numele de motiv de activare pe bază de tirozină imunoreceptoare sau ITAM pe scurt, care este esențial pentru capacitatea de semnalizare a TCR. Molecula epsilon CD3 este o polipeptidă care la om este codificată de gena *CD3E* care rezidă pe cromozomul 11. Cel mai preferat epitop al epsilon CD3 este cuprins în resturile de aminoacizi 1-27 din domeniul extracelular epsilon CD3 uman.

Liza redirectionată a celulelor țintă prin recrutarea celulelor T de către un construct de anticorp multispecific, cel puțin bispecific, implică formarea sinapselor citolitice și eliberarea de perforină și granzime. Celulele T angajate sunt capabile de liza celulelor țintă în serie și nu sunt afectate de mecanismele de evadare imună care interferează cu procesarea și prezentarea antigenului peptidic sau diferențierea celulelor T clonale; a se vedea, de exemplu, WO 2007/042261.

Citotoxicitatea mediată de constructele de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 poate fi măsurată în diferite moduri. A se vedea Exemplele 5. Celulele efectoare pot fi de ex. celule T CD8 pozitive stimulate îmbogățite (umane) sau celule mononucleare (umane) din sânge periferic nestimulat (uman) (PBMC). Dacă celulele țintă sunt de origine macac sau exprimă sau sunt transfectate cu MSLN de macac, celulele efectoare ar trebui să fie, de asemenea, de origine macac, cum ar fi o linie de celule T de macac, de ex. 4119LnPx. Celulele țintă ar trebui să exprime (cel puțin domeniul extracelular al) MSLN, de ex. MSLN umană sau de macac. Celulele țintă pot fi o linie celulară (cum ar fi CHO) care este transfectată stabil sau tranzitoriu cu MSLN, de ex. MSLN umană sau de macac. Alternativ, celulele țintă pot fi o linie celulară expresoare naturală pozitivă MSLN, cum ar fi linia de celule umane OVCAR-8. De obicei, valorile CE50 sunt de așteptat să fie mai mici cu liniile celulare țintă care exprimă niveluri mai mari de MSLN pe suprafața celulei. Raportul efector la celulă țintă (E:T) este de obicei aproximativ 10:1, dar poate varia, de asemenea. Activitatea citotoxică a constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 poate fi măsurată într-un test de eliberare în crom 51 (timp de incubație de aproximativ 18 ore) sau într-un test de citotoxicitate bazat pe FACS (timp de incubație de aproximativ 48 de ore). Modificări ale timpului de incubație a testului (reacție citotoxică) sunt, de asemenea, posibile. Alte metode de măsurare a citotoxicității sunt bine-cunoscute persoanei calificate și cuprind teste MTT sau MTS, teste bazate pe ATP, inclusiv teste bioluminescente, testul de sulforodamină B (SRB), testul WST, testul clonogen și tehnologia ECIS.

Activitatea citotoxică mediată de constructele de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 din prezenta invenție este măsurată, de preferință, într-un test de citotoxicitate pe bază de celule. Poate fi, de asemenea, măsurată printr-un test de eliberare în crom 51. Este reprezentată de valoarea CE_{50} , care corespunde jumătății concentrației efective maxime (concentrația constructului de anticorp care induce un răspuns citotoxic la jumătatea distanței dintre valoarea de referință și maximă). De preferință, valoarea CE_{50} a constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 este ≤ 5000 pM sau ≤ 4000 pM, mai preferabil ≤ 3000 pM sau ≤ 2000 pM, chiar mai preferabil ≤ 1000 pM sau ≤ 500 pM, chiar mai preferabil ≤ 400 pM sau ≤ 300 pM, chiar mai preferabil ≤ 200 pM, chiar mai preferabil ≤ 100 pM, chiar mai preferabil ≤ 50 pM, chiar mai preferabil ≤ 20 pM sau ≤ 10 pM, și cel mai preferabil ≤ 5 pM.

Valorile CE_{50} date mai sus pot fi măsurate în diferite teste. Persoana calificată este conștientă că valoarea CE_{50} poate fi de așteptat să fie mai mică atunci când celulele T CD8+ stimulate/îmbogățite sunt utilizate ca celule efectoare, în comparație cu PBMC nestimulate. În plus, poate fi de așteptat ca valorile CE_{50} să fie mai mici atunci când celulele țintă exprimă un număr mare de antigen țintă în comparație cu un șobolan cu exprimare țintă scăzută. De exemplu, atunci când celulele T CD8+ umane stimulate/îmbogățite sunt utilizate ca celule efectoare (și fie celule transfectate cu MSLN, cum ar fi celulele CHO, fie o linie de celule umane pozitive pentru MSLN OVCAR-8 sunt folosite ca celule țintă), valoarea CE_{50} a constructului de anticorp bispecific MSLN xCD3 este, de preferință, ≤ 1000 pM, mai preferabil ≤ 500 pM, chiar mai preferabil ≤ 250 pM, chiar mai preferabil ≤ 100 pM, chiar mai preferabil ≤ 50 pM, chiar mai preferabil ≤ 10 pM și cel mai preferabil ≤ 5 pM. Când PBMC-urile umane sunt utilizate ca celule efectoare, valoarea CE_{50} a constructului de anticorp bispecific MSLNxCD3 este, de preferință, ≤ 5000 pM sau ≤ 4000 pM (în special atunci când celulele țintă sunt o linie celulară umană MSLN pozitivă OVCAR-8), mai preferabil ≤ 2000 pM (în special atunci când celulele țintă sunt celule transfectate cu MSLN, cum ar fi celulele CHO), mai preferabil ≤ 1000 pM sau ≤ 500 pM, chiar mai preferabil ≤ 200 pM, chiar mai preferabil ≤ 150 pM, chiar mai preferabil ≤ 100 pM, și cel mai preferabil ≤ 50 pM sau mai mică. Atunci când o linie de celule T de macac, cum ar fi LnPx4119, este utilizată ca celule efectoare și o linie de celule transfectate cu MSLN de macac, cum ar fi celulele CHO, este utilizată ca linie de celule țintă, valoarea CE_{50} a constructului de anticorp bispecific MSLN xCD3 este, de preferință, ≤ 2000 pM sau ≤ 1500 pM, mai preferabil ≤ 1000 pM sau ≤ 500 pM, chiar mai preferabil ≤ 300 pM sau ≤ 250 pM, chiar mai preferabil ≤ 100 pM, și cel mai preferabil ≤ 50 pM.

De preferință, constructele de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 din prezenta invenție nu induc/mediază liza sau nu induc/mediază în esență liza celulelor negative MSLN, cum ar fi celulele CHO. Termenul "nu induc liza", "nu induc în esență liza", "nu mediază liza" sau "nu mediază în esență liza" înseamnă că un construct de anticorp conform prezentei invenții nu induce sau mediază liza pentru mai mult de 30%, preferabil nu mai mult de 20%, mai preferabil nu mai mult de 10%, în mod deosebit de preferabil nu mai mult de 9%, 8%, 7%, 6% sau 5% din celulele negative MSLN, prin care liza unei linii celulare umane pozitive MSLN OVCAR-8 (a se vedea mai sus) este setată să fie 100%. Acest lucru se aplică de obicei pentru concentrațiile de construct de anticorp de până la 500 nM. Persoana calificată știe cum să măsoare liza celulară fără alte precizări. Mai mult, prezenta specificație dă instrucțiuni specifice cu privire la modul în care se măsoară liza celulară.

Diferența de activitate citotoxică dintre izoforma monomerică și dimerică a constructelor individuale de anticorpi bispecfici MSLN xCD3 este denumită "decalaj de potență". Acest decalaj de potență poate fi calculat, de ex. ca raport între valorile CE_{50} ale formei monomerică și dimerică a moleculei, a se vedea Exemplul 5.8. Decalajele de putere ale constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 din prezenta invenție sunt, de preferință, ≤ 5 , mai preferabil ≤ 4 , chiar mai preferabil ≤ 3 , chiar mai preferabil ≤ 2 , mai preferabil ≤ 1 , și cel mai preferabil $\leq 0,3$.

Primul și/sau cel de al doilea (sau orice alt) domeniu de legare al constructului de anticorp conform invenției este, de preferință, specific între specii pentru membrii ordinului mamifer al primatelor. Domeniile de legare la CD3 specifice între specii sunt, de exemplu, descrise în WO 2008/119567. Conform unui exemplu de realizare, primul și/sau al doilea domeniu de legare, în plus față de legarea la **MSLN** umană și, respectiv, CD3 uman, se vor lega de asemenea de **MSLN** / CD3 de primate, inclusiv (dar fără a se limita la) primate din lumea nouă (cum ar fi *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* sau *Saimiri sciureus*), primate din lumea veche (cum ar fi babuini și macaci), giboni, urangutani și hominine non-umane. Este avut în vedere ca primul domeniu de legare al constructului de anticorp conform invenției care se leagă la MSLN umană de pe suprafața unei celule țintă se leagă, de asemenea, cel puțin la MSLN de macac și/sau al doilea domeniu de legare care se leagă la CD3 uman de pe suprafața unei celule T se leagă, de asemenea, cel puțin la CD3 de macac. Un macac preferat este *Macaca fascicularis*. *Macaca mulatta* (Rhesus) este de asemenea avut în vedere.

Într-un aspect al invenției, primul domeniu de legare se leagă la MSLN umană și în plus se leagă la MSLN de macac, cum ar fi MSLN de *Macaca fascicularis*, și mai preferabil, la MSLN de macac exprimat pe celulele de macac de suprafață. O MSLN preferată de *Macaca fascicularis* este descrisă în SECV ID NR: 234. Afinitatea primului domeniu de legare pentru MSLN de macac este, de preferință, ≤ 15 nM, mai preferabil ≤ 10 nM, chiar mai preferabil ≤ 5 nM, chiar mai preferabil ≤ 1 nM, chiar mai preferabil $\leq 0,5$ nM, chiar mai preferabil $\leq 0,1$ nM, și cel mai preferabil $\leq 0,05$ nM sau chiar $\leq 0,01$ nM.

De preferință, decalajul de afinitate al constructelor de anticorpi conform invenției pentru legarea MSLN de macac față de MSLN umană [ma MSLN:hu MSLN] (după cum s-a determinat de ex. prin BiaCore sau prin analiză Scatchard) este < 100 , preferabil < 20 , mai preferabil < 15 , în continuare preferabil < 10 , chiar mai preferabil < 8 , mai preferabil < 6 și cel mai preferabil < 2 . Intervalele preferate pentru decalajul de afinitate al constructelor de anticorpi conform invenției pentru legarea MSLN de macac față de MSLN umană sunt între 0,1 și 20, mai preferabil între 0,2 și 10, chiar mai preferabil între 0,3 și 6, chiar mai preferabil între 0,5 și 3 sau între 0,5 și 2,5 și cel mai preferabil între 0,5 și 2 sau între 0,6 și 2. A se vedea Exemplele 3.

Prin urmare, în conformitate cu această invenție, sunt preferate constructe de anticorpi care cuprind un liant MSLN pentru clusterul de epitop 2+3, care se arată că au un decalaj de afinitate ≤ 15 . În plus, sunt preferate constructe de anticorpi care cuprind un liant MSLN pentru clusterul de epitop 2+3 având un decalaj de afinitate ≤ 6 , cum ar fi constructe de anticorpi bispecfici pe bază de MS-3, MS-4 sau MS-5.

Într-un exemplu de realizare a constructului de anticorp conform invenției, al doilea domeniu de legare se leagă la epsilon CD3 uman și la epsilon CD3 de *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* sau *Saimiri sciureus*. De preferință, al doilea domeniu de legare se leagă de un epitop extracelular al acestor lanțuri epsilon CD3. Este avut în vedere, de asemenea, că al doilea domeniu de legare se leagă la un epitop extracelular al lanțului epsilon CD3 uman și al *Macaca*. Cel mai preferat epitop al epsilon CD3 este cuprins în resturile de aminoacizi 1-27 din domeniul extracelular epsilon CD3 uman. Chiar mai specific, epitopul cuprinde cel puțin secvența de aminoacizi Gln-Asp-Gly-Asn-Glu. *Callithrix jacchus* și *Saguinus oedipus* sunt ambele primate din lumea nouă aparținând familiei de *Callitrichidae*, în timp ce *Saimiri sciureus* este o primată din lumea nouă aparținând familiei de *Cebidae*.

Este de preferat în special pentru constructul de anticorp din prezenta invenție ca al doilea domeniu de legare care se leagă la CD3 uman pe suprafața unei celule T să cuprindă o regiune VL care cuprinde CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 selectate dintre:

- (a) CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 27 din WO 2008/119567, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 28 din WO 2008/119567 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 29 din WO 2008/119567;
- (b) CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 117 din WO 2008/119567, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 118 din WO 2008/119567 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 119 din WO 2008/119567; și
- (c) CDR-L1 cum s-a descris în SECV ID NR: 153 din WO 2008/119567, CDR-L2 cum s-a descris în SECV ID NR: 154 din WO 2008/119567 și CDR-L3 cum s-a descris în SECV ID NR: 155 din WO 2008/119567.

Într-un exemplu de realizare preferat alternativ al constructului de anticorp din prezenta invenție, al doilea domeniu de legare care se leagă la CD3 uman pe suprafața unei celule T cuprinde o regiune VH care cuprinde CDR-H 1, CDR-H2 și CDR-H3 selectate dintre:

- (a) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 12 din WO 2008/119567, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 13 din WO 2008/119567 și CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 14 din WO 2008/119567;
- (b) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 30 din WO 2008/119567, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 31 din WO 2008/119567 și CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 32 din WO 2008/119567;
- (c) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 48 din WO 2008/119567, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 49 din WO 2008/119567 și CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 50 din WO 2008/119567;
- (d) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 66 din WO 2008/119567, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 67 din WO 2008/119567 și CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 68 din WO 2008/119567;
- (e) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 84 din WO 2008/119567, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 85 din WO 2008/119567 și CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 86 din WO 2008/119567;
- (f) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 102 din WO 2008/119567, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 103 din WO 2008/119567 și CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 104 din WO 2008/119567;

- (g) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 120 din WO 2008/119567, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 121 din WO 2008/119567 și CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 122 din WO 2008/119567;
- (h) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 138 din WO 2008/119567, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 139 din WO 2008/119567 și CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 140 din WO 2008/119567;
- (i) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 156 din WO 2008/119567, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 157 din WO 2008/119567 și CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 158 din WO 2008/119567; și
- (j) CDR-H1 cum s-a descris în SECV ID NR: 174 din WO 2008/119567, CDR-H2 cum s-a descris în SECV ID NR: 175 din WO 2008/119567 și CDR-H3 cum s-a descris în SECV ID NR: 176 din WO 2008/119567.

În plus, pentru constructul de anticorp din prezenta invenție este de preferat ca al doilea domeniu de legare care se leagă la CD3 uman pe suprafața unei celule T să cuprindă o regiune VL selectată din grupul constând dintr-o regiune VL cum s-a descris în SECV ID NR: 18, SECV ID NR: 27, SECV ID NR: 36, SECV ID NR: 45, SECV ID NR: 54, SECV ID NR: 63, SECV ID NR: 72, SECV ID NR: 81, SECV ID NR: 90, SECV ID NR: 99, și SECV ID NR: 102 (a se vedea, de asemenea, SECV ID NR: 35, 39, 125, 129, 161 sau 165 din WO 2008/119567).

Este de preferat ca al doilea domeniu de legare care se leagă la CD3 uman pe suprafața unei celule T să cuprindă o regiune VH selectată din grupul constând dintr-o regiune VH cum s-a descris în SECV ID NR: 17, SECV ID NR: 26, SECV ID NR: 35, SECV ID NR: 44, SECV ID NR: 53, SECV ID NR: 62, SECV ID NR: 71, SECV ID NR: 80, SECV ID NR: 89, SECV ID NR: 98, și SECV ID NR: 101 (a se vedea, de asemenea, SECV ID NR: 15, 19, 33, 37, 51, 55, 69, 73, 87, 91, 105, 109, 123, 127, 141, 145, 159, 163, 177 sau 181 din WO 2008/119567).

Mai preferabil, constructul de anticorp din prezenta invenție este caracterizat de al doilea domeniu de legare care se leagă la CD3 uman pe suprafața unei celule T cuprinzând o regiune VL și o regiune VH selectată din grupul constând din:

- (a) o regiune VL cum s-a descris în SECV ID NR: 17 sau 21 din WO 2008/119567 și o regiune VH cum s-a descris în SECV ID NR: 15 sau 19 din WO 2008/119567;

- (b) o regiune VL cum s-a descris în SECV ID NR: 35 sau 39 din WO 2008/119567 și o regiune VH cum s-a descris în SECV ID NR: 33 sau 37 din WO 2008/119567;
- (c) o regiune VL cum s-a descris în SECV ID NR: 53 sau 57 din WO 2008/119567 și o regiune VH cum s-a descris în SECV ID NR: 51 sau 55 din WO 2008/119567;
- (d) o regiune VL cum s-a descris în SECV ID NR: 71 sau 75 din WO 2008/119567 și o regiune VH cum s-a descris în SECV ID NR: 69 sau 73 din WO 2008/119567;
- (e) o regiune VL cum s-a descris în SECV ID NR: 89 sau 93 din WO 2008/119567 și o regiune VH cum s-a descris în SECV ID NR: 87 sau 91 din WO 2008/119567;
- (f) o regiune VL cum s-a descris în SECV ID NR: 107 sau 111 din WO 2008/119567 și o regiune VH cum s-a descris în SECV ID NR: 105 sau 109 din WO 2008/119567;
- (g) o regiune VL cum s-a descris în SECV ID NR: 125 sau 129 din WO 2008/119567 și o regiune VH cum s-a descris în SECV ID NR: 123 sau 127 din WO 2008/119567;
- (h) o regiune VL cum s-a descris în SECV ID NR: 143 sau 147 din WO 2008/119567 și o regiune VH cum s-a descris în SECV ID NR: 141 sau 145 din WO 2008/119567;
- (i) o regiune VL cum s-a descris în SECV ID NR: 161 sau 165 din WO 2008/119567 și o regiune VH cum s-a descris în SECV ID NR: 159 sau 163 din WO 2008/119567; și
- (j) o regiune VL cum s-a descris în SECV ID NR: 179 sau 183 din WO 2008/119567 și o regiune VH cum s-a descris în SECV ID NR: 177 sau 181 din WO 2008/119567.

De asemenea, preferat în legătură cu constructul de anticorp din prezenta invenție este un al doilea domeniu de legare care se leagă la CD3 uman pe suprafața unei celule T cuprinzând o regiune VL cum s-a descris în SECV ID NR: 102 și o regiune VH cum s-a descris SECV ID NR: 101.

Conform unui exemplu de realizare preferat al constructului de anticorp din prezenta invenție, domeniile de legare și în special al doilea domeniu de legare (care se leagă la CD3 uman pe suprafața unei celule T) au următorul format: Perechile de regiuni

VH și regiuni VL sunt în formatul unui anticorp cu un singur lanț (scFv). Regiunile VH și VL sunt aranjate în ordinea VH-VL sau VL-VH. Este de preferat ca regiunea VH să fie poziționată N-terminal la o secvență linker, și regiunea VL să fie poziționată C-terminal la o secvență linker.

Un exemplu de realizare preferat al constructului de anticorp descris mai sus din prezenta invenție este caracterizat prin al doilea domeniu de legare care se leagă la CD3 uman pe suprafața unei celule T cuprinzând o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73, SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103 (a se vedea, de asemenea, SECV ID NR: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 sau 187 din WO 2008/119567).

Este avut în vedere, de asemenea, că constructul de anticorp conform invenției are, în plus față de funcția sa de a se lega la moleculele țintă MSLN și CD3, o funcție suplimentară. În acest format, constructul de anticorp este un construct de anticorp trifuncțional sau multifuncțional prin țintirea celulelor țintă prin legarea la MSLN, medierea activității celulelor T citotoxice prin legarea CD3 și furnizarea unei funcții suplimentare, cum ar fi un domeniu constant Fc complet funcțional care mediază citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp prin recrutarea de celule efectoare, cum ar fi celulele NK, o etichetă (fluorescentă etc.), un agent terapeutic, cum ar fi o toxină sau un radionuclid și/sau mijloace de creștere a timpului de înjumătățire plasmatică etc.

Exemple de mijloace de creștere a timpului de înjumătățire plasmatică a constructelor de anticorpi conform invenției includ peptide, proteine sau domenii de proteine, care sunt fuzionate sau atașate în alt mod la constructele de anticorpi. Grupul de peptide, proteine sau domenii proteice include peptide care se leagă la alte proteine cu profil farmacocinetic preferat în corpul uman, cum ar fi albumina serică (a se vedea WO 2009/127691). Un concept alternativ al unor astfel de peptide care extind timpul de înjumătățire include peptidele care se leagă de receptorul Fc neonatal (FcRn, a se vedea WO 2007/098420), care poate fi de asemenea utilizat în constructele prezentei invenții. Conceptul de atașare a unor domenii mai mari de proteine sau proteine complete include de ex. fuziunea albuminei serice umane, a variantelor sau mutanților de albumină serică umană (a se vedea WO 2011/051489, WO 2012/059486, WO 2012/150319, WO 2013/135896, WO 2014/072481, WO 2013/075066) sau domenii ale acestora precum și fuziunea regiunii constante a imunoglobulinelor (domenii Fc) și variante ale acestora.

Astfel de variante ale domeniilor Fc pot fi optimizate/modificate pentru a permite împerecherea dorită de dimeri sau multimeri, pentru a elimina legarea receptorului Fc (de exemplu, receptorul Fcy) sau din alte motive. Un alt concept cunoscut în domeniu pentru a prelungi timpul de înjumătățire al compușilor proteici mici din corpul uman este pegilarea acelor compuși, cum ar fi constructul de anticorp din prezenta invenție.

Într-un exemplu de realizare preferat, constructul de anticorp conform invenției este descris după cum urmează:

(a) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 169, SECV ID NR: 179, SECV ID NR: 189, SECV ID NR: 199, și SECV ID NR: 209,;
- un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1-9; și
- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73, SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103; și
- opțional, o etichetă His, cum ar fi cea descrisă în SECV ID NR 10;

(b) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine pornind de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 169, SECV ID NR: 179, SECV ID NR: 189, SECV ID NR: 199, și SECV ID NR: 209;
- un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1-9;
- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73, SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103;
- opțional, un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1-9;

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 104-134; și

- opțional, o etichetă His, cum ar fi cea descrisă în SECV ID NR 10;

(c) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având secvența de aminoacizi QRFVTGHFGGLX₁PANG (SECV ID NR: 135) unde X₁ este Y sau H; și

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 169, SECV ID NR: 179, SECV ID NR: 189, SECV ID NR: 199, și SECV ID NR: 209;

- un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1-9;

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73, SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103;

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi QRFVTGHFGGLHPANG (SECV ID NR: 137) sau QRFCTGHFGGLHPCNG (SECV ID NR: 139); și

- opțional, o etichetă His, cum ar fi cea descrisă în SECV ID NR 10;

(d) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 17, SECV ID NR: 26, SECV ID NR: 35, SECV ID NR: 44, SECV ID NR: 53, SECV ID NR: 62, SECV ID NR: 71, SECV ID NR: 80, SECV ID NR: 89, SECV ID NR: 98, și SECV ID NR: 101;

- un linker peptidic având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 8;

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 168, SECV ID NR: 178, SECV ID NR: 188, SECV ID NR: 198, și SECV ID NR: 208 și un reziduu de serină la capătul C-terminal;

- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 140; și

- o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 167, SECV ID NR: 177, SECV ID NR: 187, SECV ID NR: 197, și SECV ID NR: 207;

- un linker peptidic având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 8;

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 18, SECV ID NR: 27, SECV ID NR: 36, SECV ID NR: 45, SECV ID NR: 54, SECV ID NR: 63, SECV ID NR: 72, SECV ID NR: 81, SECV ID NR: 90, SECV ID NR: 99, și SECV ID NR: 102 și un reziduu de serină la capătul C-terminal;

- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 141;

(e) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 17, SECV ID NR: 26, SECV ID NR: 35, SECV ID NR: 44, SECV ID NR: 53, SECV ID NR: 62, SECV ID NR: 71, SECV ID NR: 80, SECV ID NR: 89, SECV ID NR: 98, și SECV ID NR: 101;

- un linker peptidic având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 8;

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 168, SECV ID NR: 178, SECV ID NR: 188, SECV ID NR: 198, și SECV ID NR: 208;

- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 142; și

- o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 167, SECV ID NR: 177, SECV ID NR: 187, SECV ID NR: 197, și SECV ID NR: 207;

- un linker peptidic având o secvență de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 8;
- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 18, SECV ID NR: 27, SECV ID NR: 36, SECV ID NR: 45, SECV ID NR: 54, SECV ID NR: 63, SECV ID NR: 72, SECV ID NR: 81, SECV ID NR: 90, SECV ID NR: 99, și SECV ID NR: 102 și un reziduu de serină la capătul C-terminal;
- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 143;

(f) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 169, SECV ID NR: 179, SECV ID NR: 189, SECV ID NR: 199, și SECV ID NR: 209;
- un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1-9; și
- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73, SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103; și
- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 144; și
- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 145;

(g) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 169, SECV ID NR: 179, SECV ID NR: 189, SECV ID NR: 199, și SECV ID NR: 209; și
- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 146; și
- o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73, SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103; și
- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 147;

(h) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 169, SECV ID NR: 179, SECV ID NR: 189, SECV ID NR: 199, și SECV ID NR: 209; și
- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 148; și
- o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:
 - o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73, SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103; și
 - o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 149; sau

(i) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 169, SECV ID NR: 179, SECV ID NR: 189, SECV ID NR: 199, și SECV ID NR: 209;
- un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1-9; și
- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73,

SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103;
și

- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 150.

De asemenea, aici sunt dezvăluite structuri de anticorpi descrise după cum urmează:

(a) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 159, SECV ID NR: 219, și SECV ID NR: 229;
- un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1-9; și
- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73, SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103; și
- opțional, o etichetă His, cum ar fi cea descrisă în SECV ID NR 10;

(b) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine pornind de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 159, SECV ID NR: 219, și SECV ID NR: 229;
- un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1-9;
- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73, SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103;
- opțional, un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1-9;

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 104-134; și

- opțional, o etichetă His, cum ar fi cea descrisă în SECV ID NR 10;

(c) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având secvența de aminoacizi QRFVTGHFGGLX₁PANG (SECV ID NR: 135) unde X₁ este Y sau H; și

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 159, SECV ID NR: 219, și SECV ID NR: 229;

- un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1-9;

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73, SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103;

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi QRFVTGHFGGLHPANG (SECV ID NR: 137) sau QRFCTGHFGGLHPCNG (SECV ID NR: 139); și

- opțional, o etichetă His, cum ar fi cea descrisă în SECV ID NR 10;

(d) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 17, SECV ID NR: 26, SECV ID NR: 35, SECV ID NR: 44, SECV ID NR: 53, SECV ID NR: 62, SECV ID NR: 71, SECV ID NR: 80, SECV ID NR: 89, SECV ID NR: 98, și SECV ID NR: 101;

- un linker peptidic având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 8;

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 158, SECV ID NR: 218, și SECV ID NR: 228 și un reziduu de serină la capătul C-terminal;

- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 140; și

- o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 157, SECV ID NR: 217, și SECV ID NR: 227;

- un linker peptidic având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 8;

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 18, SECV ID NR: 27, SECV ID NR: 36, SECV ID NR: 45, SECV ID NR: 54, SECV ID NR: 63, SECV ID NR: 72, SECV ID NR: 81, SECV ID NR: 90, SECV ID NR: 99, și SECV ID NR: 102 și un reziduu de serină la capătul C-terminal;

- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 141;

(e) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 17, SECV ID NR: 26, SECV ID NR: 35, SECV ID NR: 44, SECV ID NR: 53, SECV ID NR: 62, SECV ID NR: 71, SECV ID NR: 80, SECV ID NR: 89, SECV ID NR: 98, și SECV ID NR: 101;

- un linker peptidic având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 8;

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 158, SECV ID NR: 218, și SECV ID NR: 228;

- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 142; și

- o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 157, SECV ID NR: 217, și SECV ID NR: 227;

- un linker peptidic având o secvență de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 8;
- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 18, SECV ID NR: 27, SECV ID NR: 36, SECV ID NR: 45, SECV ID NR: 54, SECV ID NR: 63, SECV ID NR: 72, SECV ID NR: 81, SECV ID NR: 90, SECV ID NR: 99, și SECV ID NR: 102 și un reziduu de serină la capătul C-terminal;
- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 143;

(f) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 159, SECV ID NR: 219, și SECV ID NR: 229;
- un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1-9; și
- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73, SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103; și
- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 144; și
- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 145;

(g) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 159, SECV ID NR: 219, și SECV ID NR: 229; și
- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 146; și
- o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73, SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103; și

- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 147;

(h) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 159, SECV ID NR: 219, și SECV ID NR: 229; și

- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 148; și

- o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73, SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103; și

- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 149; sau

(i) o polipeptidă cuprinzând în următoarea ordine începând de la capătul N-terminal:

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 159, SECV ID NR: 219, și SECV ID NR: 229;

- un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1-9; și

- o polipeptidă având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73,

SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103;
și

- o polipeptidă având secvența de aminoacizi descrisă în SECV ID NR: 150.

După cum s-a descris mai sus, mai multe constructe de anticorpi preferate ale invenției sunt modificate prin fuziune cu un alt fragment, cum ar fi albumină sau variante de albumină. Dacă aceste constructe de fuziune sunt caracterizate pentru proprietățile lor, în special afinitatea țintă sau activitatea citotoxică, persoana de specialitate va fi conștientă de faptul că constructele de fuziune similare sau constructele de anticorpi bispecfici nemodificate pot fi de așteptat să aibă proprietăți similare (sau chiar mai bune). De exemplu, dacă un construct de anticorp bispecific fuzionat cu albumină are o activitate citotoxică apreciabilă sau de dorit sau o afinitate țintă, poate fi de așteptat ca o activitate citotoxică/afinitate țintă identică/similară sau chiar mai mare să fie observată pentru constructul fără albumină.

Conform unui alt exemplu de realizare preferat, constructul de anticorp bispecific al invenției cuprinde (în plus față de cele două domenii de legare) un al treilea domeniu care cuprinde doi monomeri polipeptidici, fiecare cuprinzând o balama, un domeniu CH2 și un domeniu CH3, în care respectivele două polipeptide (sau monomeri polipeptidici) sunt fuzionate una cu cealaltă prin intermediul unui linker peptidic. De preferință, al treilea domeniu cuprinde într-o ordine N- la C-terminal: balama-CH2-CH3-linker-balama-CH2-CH3. Secvențele de aminoacizi preferate pentru al treilea domeniu menționat sunt descrise în SECV ID NR: 260-267. Fiecare dintre doi monomeri polipeptidici menționați are, de preferință, o secvență de aminoacizi care este selectată din grupul constând din SECV ID NR: 252-259, sau care este cel puțin 90% identică cu acele secvențe. Într-un alt exemplu de realizare preferat, primul și al doilea domeniu de legare a constructului de anticorp bispecific al invenției sunt fuzionate cu al treilea domeniu printr-un linker peptidic care este, de exemplu, selectat din grupul constând din SECV ID NR.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 și 9.

În conformitate cu prezenta invenție, o „balama” este o regiune balama IgG. Această regiune poate fi identificată prin analogie folosind numerotarea Kabat, a se vedea pozițiile 223-243 Kabat. În conformitate cu cele de mai sus, cerința minimă pentru o „balama” sunt reziduurile de aminoacizi corespunzătoare întinderii IgG₁ de la D231 la P243 conform numerotării Kabat. Termenii CH2 și CH3 se referă la regiunile constante 2 și 3 ale lanțului greu al imunoglobulinei. Aceste regiuni pot fi, de asemenea, identificate

prin analogie folosind numerotarea Kabat, a se vedea pozițiile Kabat 244-360 pentru CH2 și pozițiile Kabat 361-478 pentru CH3. Se înțelege că există o oarecare variație între imunoglobuline în ceea ce privește regiunea lor Fc IgG₁, regiunea Fc IgG₂, regiunea Fc IgG₃, regiunea Fc IgG₄, regiunea Fc IgM, regiunea Fc IgA, regiunea Fc IgD și regiunea Fc IgE (a se vedea, de ex., Padlan, *Molecular Immunology*, 31(3), 169-217 (1993)). Termenul monomer Fc se referă la ultimele două regiuni constante de lanț greu ale IgA, IgD și IgG și la ultimele trei regiuni constante de lanț greu ale IgE și IgM. Monomerul Fc poate include, de asemenea, balama flexibilă N-terminală la aceste domenii. Pentru IgA și IgM, monomerul Fc poate include lanțul J. Pentru IgG, porțiunea Fc cuprinde domeniile de imunoglobulină CH2 și CH3 și balama între primele două domenii și CH2. Deși limitele porțiunii Fc ale unei imunoglobuline pot varia, poate fi definit un exemplu pentru o porțiune Fc cu lanț greu IgG umană care cuprinde o balama funcțională, domeniul CH2 și CH3, de ex. pentru a cuprinde reziduuri D231 (ale domeniului balama) la P476 (a capătului C-terminal al domeniului CH3), sau D231 la L476, respectiv, pentru IgG₄, în care numerotarea este conform Kabat.

Constructul de anticorp conform invenției poate cuprinde, prin urmare, într-o ordine de la N- la C-terminal:

- (a) primul domeniu de legare;
- (b) un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 2, 8 și 9;
- (c) al doilea domeniu de legare;
- (d) un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1, 2, 4, 5, 6, 8 și 9;
- (e) primul monomer polipeptidic din al treilea domeniu (cuprinzând o balama, un domeniu CH2 și un domeniu CH3);
- (f) un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 301, 302, 303 și 304; și
- (e) al doilea monomer polipeptidic din al treilea domeniu (cuprinzând o balama, un domeniu CH2 și un domeniu CH3).

De asemenea, se preferă ca constructul de anticorp conform invenției să cuprindă într-o ordine de la N- la C-terminal:

- primul domeniu de legare având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 169, SECV ID NR: 179, SECV ID NR: 189, SECV ID NR: 199, și SECV ID NR: 209;

- un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 2, 8 și 9;
- al doilea domeniu de legare având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73, SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103 (a se vedea, de asemenea, SECV ID NR: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 sau 187 din WO 2008/119567);
- un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1, 2, 4, 5, 6, 8 și 9; și
- al treilea domeniu având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 260-267.

De asemenea, aici sunt dezvăluite constructe de anticorpi care cuprind într-o ordine de la N- la C-terminal:

- primul domeniu de legare având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 159, SECV ID NR: 219, și SECV ID NR: 229;
- un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 2, 8 și 9;
- al doilea domeniu de legare având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 19, SECV ID NR: 28, SECV ID NR: 37, SECV ID NR: 46, SECV ID NR: 55, SECV ID NR: 64, SECV ID NR: 73, SECV ID NR: 82, SECV ID NR: 91, SECV ID NR: 100, și SECV ID NR: 103 (a se vedea, de asemenea, SECV ID NR: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 sau 187 din WO 2008/119567);
- un linker peptidic având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 1, 2, 4, 5, 6, 8 și 9; și
- al treilea domeniu având o secvență de aminoacizi selectată din grupul constând din SECV ID NR: 260-267.

Constructul de anticorp descris aici cuprinde sau constă dintr-o polipeptidă selectată din grupul constând din cele descrise în SECV ID NR: 268 la 299.

De asemenea, de preferință, într-un exemplu de realizare al invenției constructul de anticorp din prezenta invenție cuprinde sau constă dintr-o polipeptidă selectată din grupul constând din cele descrise în SECV ID NR: 276 la 287.

De asemenea, într-un exemplu de realizare preferat al invenției, constructul de anticorp din prezenta invenție cuprinde sau constă dintr-o polipeptidă selectată din grupul constând din cele descrise în SECV ID NR: 276, 280 și 284, mai preferabil cuprinde sau constă dintr-o polipeptidă cum s-a descris în SECV ID NR: 280.

Modificările covalente ale constructelor de anticorpi sunt, de asemenea, incluse în cadrul acestei invenții și sunt în general, dar nu întotdeauna, efectuate post-translațional. De exemplu, mai multe tipuri de modificări covalente ale constructului de anticorp sunt introduse în moleculă prin reacția resturilor specifice de aminoacizi ale constructului de anticorp cu un agent organic de derivatizare care este capabil să reacționeze cu lanțurile laterale selectate sau cu resturile N- sau C-terminale.

Reziduurile de cisteinil reacționează cel mai frecvent cu α -haloacetații (și aminele corespunzătoare), cum ar fi acidul cloracetic sau cloracetamida, pentru a furniza derivați de carboximetil sau carboxiamidometil. Reziduurile de cisteinil sunt, de asemenea, derivatizate prin reacție cu bromotrifluoracetona, acid α -bromo- β -(5-imidozolil) propionic, fosfat de cloracetil, N-alchilmaleimide, 3-nitro-2-piridil disulfură, 2-piridil disulfură de metil, p-cloromercuribenzoat, 2-cloromercuri-4-nitrofenol sau cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Reziduurile histidil sunt derivatizate prin reacția cu dietilpirocarbonat la pH 5,5-7,0 deoarece acest agent este relativ specific pentru lanțul lateral histidil. Bromura de para-bromfenacil este de asemenea utilă; reacția se efectuează, de preferință, în cacodilat de sodiu 0,1 M la pH 6,0. Reziduurile de lizinil și amino terminale reacționează cu anhidridele acidului succinic sau ale altor acizi carboxilici. Derivatizarea cu acești agenți are ca efect inversarea sarcinii reziduurilor de lizinil. Alți reactivi adecvați pentru derivatizarea reziduurilor care conțin alfa-amino includ imidoesteri, cum ar fi picolinimidat de metil; fosfat de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruță; acid trinitrobenzensulfonic; O-metilizouree; 2,4-pentandionă; și reacție catalizată de transaminază cu glioxilat.

Reziduurile de arginil sunt modificate prin reacția cu unul sau mai mulți reactivi convenționali, printre care fenilglioxal, 2,3-butandionă, 1,2-ciclohexandionă și ninhidrină. Derivatizarea reziduurilor de arginină necesită ca reacția să fie efectuată în condiții alcaline din cauza pKa ridicat al grupării funcționale a guanidinei. Mai mult, acești reactivi pot reacționa cu grupările de lizină, precum și cu gruparea epsilon-amino a argininei.

Se poate realiza modificarea specifică a reziduurilor de tirozil, cu un interes deosebit în introducerea de marcaje spectrale în reziduurile de tirozil prin reacția cu compuși aromatici de diazoniu sau tetranitrometan. Cel mai frecvent, N-acetilimidazolul și

tetranitrometanul sunt utilizate pentru a forma specii de O-acetil tirozil și, respectiv, derivați 3-nitro. Reziduurile de tirozil sunt iodate folosind ^{125}I sau ^{131}I pentru a prepara proteine marcate pentru utilizare în radioimunotest, metoda cloraminei T descrisă mai sus fiind adecvată.

Grupările laterale carboxil (aspartil sau glutamil) sunt modificate selectiv prin reacția cu carbodiimide ($\text{R}'\text{-N}=\text{C}=\text{N--R}'$), unde R și R' sunt opțional grupări alchil diferite, cum ar fi 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)carbodiimidă sau 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimidă. Mai mult, reziduurile de aspartil și glutamil sunt transformate în reziduuri de asparaginil și glutaminil prin reacție cu ioni de amoniu.

Derivatizarea cu agenți bifuncționali este utilă pentru reticularea constructelor de anticorpi din prezenta invenție la o matrice sau o suprafață suport insolubilă în apă pentru utilizare într-o varietate de metode. Agenții de reticulare utilizați în mod obișnuit includ, *de ex.*, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletan, glutaraldehidă, esteri de N-hidroxisuccinimidă, de exemplu, esteri cu acid 4-azidosalicilic, imidoesteri homobifuncționali, inclusiv esteri disuccinimidilici, cum ar fi 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionat) și maleimide bifuncționale, cum ar fi bis-N-maleimido-1,8-octan. Agenți de derivare cum ar fi metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidat produc intermediari fotoactivabili care sunt capabili să formeze legături încrucișate în prezența luminii. Alternativ, pentru imobilizarea proteinelor se utilizează matrice reactive insolubile în apă, cum ar fi carbohidrații activați cu bromură de cianogen și substraturile reactive, așa cum este descris în Brevetele SUA Nr. 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; și 4.330.440.

Reziduurile glutaminil și asparaginil sunt frecvent deamidate la reziduurile corespunzătoare de glutamil și, respectiv, aspartil. Alternativ, aceste reziduuri sunt deamidate în condiții ușor acide. Oricare dintre aceste reziduuri se încadrează în cadrul acestei invenții.

Alte modificări includ hidroxilarea prolinei și lizinei, fosforilarea grupărilor hidroxil ale reziduurilor seril sau treonil, metilarea grupărilor α -amino ale lanțurilor laterale de lizină, arginină și histidină (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), acetilarea aminei N-terminale și amidarea oricărei grupări carboxil C-terminale.

Un alt tip de modificare covalentă a constructelor de anticorpi incluse în cadrul acestei invenții cuprinde modificarea modelului de glicozilare al proteinei. După cum este cunoscut în domeniu, modelele de glicozilare pot depinde atât de secvența proteinei (*de ex.*, prezența sau absența unor reziduuri particulare de aminoacizi de glicozilare,

discutate mai jos), sau de celula gazdă sau organismul în care este produsă proteina. Sistemele de exprimare particulare sunt discutate mai jos.

Glicozilarea polipeptidelor este în mod tipic fie legată de N, fie legată de O. Legat de N se referă la atașarea fragmentului carbohidrat la lanțul lateral al unui reziduu de asparagină. Secvențele tri-peptidice asparagină-X-serină și asparagină-X-treonină, în care X este orice aminoacid cu excepția prolinei, sunt secvențele de recunoaștere pentru atașarea enzimatică a fragmentului de carbohidrat la lanțul lateral al asparaginei. Astfel, prezența oricăreia dintre aceste secvențe tri-peptidice într-o polipeptidă creează un potențial situs de glicozilare. Glicozilarea legată de O se referă la atașarea unui dintre zaharurile N-acetilgalactozamină, galactoză sau xiloză, la un hidroxiaminoacid, cel mai frecvent serină sau treonină, deși pot fi utilizate și 5-hidroxiprolină sau 5-hidroxilizină.

Adăugarea situsurilor de glicozilare la constructul de anticorp este realizată în mod convenabil prin modificarea secvenței de aminoacizi astfel încât aceasta să conțină una sau mai multe dintre secvențele tri-peptidice descrise mai sus (pentru situsurile de glicozilare legate de N). Modificarea poate fi făcută, de asemenea, prin adăugarea sau substituirea cu unul sau mai multe reziduuri de serină sau treonină la secvența de pornire (pentru situsurile de glicozilare legate de O). Pentru ușurință, secvența de aminoacizi a unui construct de anticorp este modificată, de preferință, prin modificări la nivelul ADN-ului, în special prin mutarea ADN-ului care codifică polipeptida la baze preselecționate astfel încât să se genereze codoni care se vor traduce în aminoacizii doriți.

Un alt mijloc de creștere a numărului de fragmente de carbohidrat de pe constructul de anticorp este prin cuplarea chimică sau enzimatică a glicozidelor la proteină. Aceste proceduri sunt avantajoase prin faptul că nu necesită producerea de proteine într-o celulă gazdă care are capacitatea de glicozilare pentru glicozilare legată de N și O. În funcție de modul de cuplare utilizat, zaharul (zaharurile) poate fi atașat/pot fi atașate la (a) arginină și histidină, (b) grupări carboxil libere, (c) grupări sulfhidril libere, cum ar fi cele ale cisteinei, (d) grupări hidroxil libere, cum ar fi cele ale serinei, treoninei sau hidroxiprolinei, (e) reziduuri aromatice, cum ar fi cele ale fenilalaninei, tirozinei sau triptofanului sau (f) gruparea amidă a glutaminei. Aceste metode sunt descrise în WO 87/05330, și în Aplin and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

Îndepărtarea fragmentelor de carbohidrat prezente pe constructul de anticorp inițial poate fi realizată chimic sau enzimatic. Deglicozilarea chimică necesită expunerea proteinei la compusul acid trifluormetansulfonic sau la un compus echivalent. Acest tratament are ca rezultat scindarea majorității sau a tuturor zaharurilor, cu excepția

zaharului de legătură (N-acetilglucozamina sau N-acetilgalactozamina), lăsând polipeptida intactă. Deglicozilarea chimică este descrisă de Hakimuddin și colab., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 și de Edge și colab., 1981, Anal. Biochem. 118:131. Scindarea enzimatică a fragmentelor de carbohidrați de pe polipeptide poate fi realizată prin utilizarea unei varietăți de endo- și exo-glicozidaze așa cum este descris de Thotakura și colab., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Glicozilarea la situsurile potențiale de glicozilare poate fi prevenită prin utilizarea compusului tunicamicină așa cum este descris de Duskin și colab., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Tunicamicina blochează formarea legăturilor proteină-N-glicozidă.

Alte modificări ale constructului de anticorp sunt de asemenea avute în vedere aici. De exemplu, un alt tip de modificare covalentă a constructului de anticorp cuprinde legarea constructului de anticorp la diferiți polimeri neproteici, incluzând, dar fără a se limita la, diferiți polioli, cum ar fi polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialchileni sau copolimeri de polietilenglicol și polipropilenglicol, în modul prezentat în Brevetele SUA Nr. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 sau 4.179.337. În plus, așa cum se știe în domeniu, substituțiile de aminoacizi pot fi făcute în diferite poziții în cadrul constructului de anticorp, de ex. pentru a facilita adăugarea de polimeri, cum ar fi PEG.

În unele exemple de realizare, modificarea covalentă a constructelor de anticorpi ale invenției cuprinde adăugarea uneia sau mai multor etichete. Gruparea de etichetare poate fi cuplată la constructul de anticorp *prin* brațe distanțiere de diferite lungimi pentru a reduce potențialul obstacol steric. Diferite metode pentru etichetarea proteinelor sunt cunoscute în domeniu și pot fi utilizate în realizarea prezentei invenții. Termenul "etichetă" sau "grupare de etichetare" se referă la orice etichetă detectabilă. În general, etichetele se încadrează într-o varietate de clase, în funcție de testul în care urmează să fie detectate - următoarele exemple includ, dar nu se limitează la:

- a) etichete izotopice, care pot fi izotopi radioactivi sau grei, cum ar fi radioizotopi sau radionuclizi (*de ex.*, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I)
- b) etichete magnetice (*de ex.*, particule magnetice)
- c) fragmente active redox
- d) coloranți optici (incluzând, dar nelimitându-se la, cromofori, fosfor și fluorofori), cum ar fi grupări fluorescente (*de ex.*, FITC, rodamină, fosfor lantanid), grupări chemiluminescente și fluorofori care pot fi fie fluoruri cu „moleculă mică”, fie fluoruri proteinacee

- e) grupări enzimatică (de ex., peroxidază de hrean, β -galactozidază, luciferază, fosfatază alcalină)
- f) grupări biotinilate
- g) epitopi polipeptidici predeterminați recunoscuți de un raportor secundar (de ex., secvențe pereche cu fermoar de leucină, situsuri de legare pentru anticorpi secundari, domenii de legare a metalelor, etichete de epitop etc.)

Prin "etichetă fluorescentă" se înțelege orice moleculă care poate fi detectată *prin intermediul* proprietăților sale fluorescente inerente. Etichetele fluorescente adecvate includ, dar nu se limitează la, fluoresceină, rodamină, tetrametilrodamină, eozină, eritrozină, cumarină, cumarină de metil, piren, verde malacit, stilben, galben Lucifer, albastru cascadă J, roșu Texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, verde Oregon, coloranții Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), albastru cascadă, galben cascadă și R-ficoeritrină (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, rodamină și roșu Texas (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Coloranții optici adecvați, inclusiv fluoroforii, sunt descriși în Molecular Probes Handbook de Richard P. Haugland.

Etichetele fluorescente proteice adecvate includ, de asemenea, dar nu se limitează la, proteină fluorescentă verde, inclusiv o specie Renilla, Ptilosarcus sau Aequorea de GFP (Chalfie și colab., 1994, Science 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., număr de acces Genbank U55762), proteină fluorescentă albastră (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim și colab., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), proteină fluorescentă galbenă îmbunătățită (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luciferază (Ichiki și colab., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417), β galactozidază (Nolan și colab., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. S.U.A. 85:2603-2607) și Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, Brevetele SUA Nr. 5.292.658; 5.418.155; 5.683.888; 5.741.668; 5.777.079; 5.804.387; 5.874.304; 5.876.995; 5.925.558).

Domeniile fermoar de leucină sunt peptide care promovează oligomerizarea proteinelor în care se găsesc. Fermoarele de leucină au fost identificate inițial în mai multe proteine care leagă ADN-ul (Landschulz și colab., 1988, Science 240:1759), și de atunci au fost găsite într-o varietate de proteine diferite. Printre fermoarele de leucină cunoscute se numără peptidele naturale și derivații acestora care dimerizează sau

trimerizează. Exemple de domenii de fermoar leucină adecvate pentru producerea de proteine oligomerice solubile sunt descrise în Cererea PCT WO 94/10308, și fermoarul de leucină derivat din proteina D surfactant pulmonar (SPD) descris în Hoppe și colab., 1994, FEBS Letters 344:191. Utilizarea unui fermoar de leucină modificat care permite trimerizarea stabilă a unei proteine heterologe fuzionate cu acesta este descrisă în Fanslow și colab., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78. Într-o abordare, proteinele de fuziune recombinante care cuprind un fragment de anticorp MSLN sau un derivat fuzionat cu o peptidă cu fermoar de leucină sunt exprimate în celule gazdă adecvate, iar fragmentele sau derivații de anticorp MSLN oligomerici solubili care se formează sunt recuperați din supernatantul culturii.

Constructul de anticorp conform invenției poate cuprinde, de asemenea, domenii suplimentare, care sunt *de ex.* utile în izolarea moleculei sau se referă la un profil farmacocinetic adaptat al moleculei. Domeniile utile pentru izolarea unui construct de anticorp pot fi selectate dintre motivele peptidice sau fragmentele introduse secundar, care pot fi capturate într-o metodă de izolare, *de ex.* o coloană de izolare. Exemplele de realizare nelimitative ale unor astfel de domenii suplimentare cuprind motive peptidice cunoscute sub numele de eticheta Myc, eticheta HAT, eticheta HA, eticheta TAP, eticheta GST, domeniul de legare a chitinei (eticheta CBD), proteina de legare a maltozei (eticheta MBP), eticheta Flag, eticheta Strep și variantele acestora (*de ex.*, eticheta StreptII) și eticheta His. Toate constructele de anticorpi descrise aici caracterizate prin CDR-urile identificate sunt preferate să cuprindă un domeniu cu etichetă His, care este în general cunoscut ca o repetare a reziduurilor His consecutive în secvența de aminoacizi a unei molecule, de preferință de cinci, și mai preferabil de șase reziduuri His (hexa-histidină). Eticheta His poate fi localizată *de ex.* la capătul N- sau C-terminal al constructului de anticorp, de preferință este situat la capătul C-terminal. Cel mai preferabil, o etichetă hexa-histidină (HHHHHH) (SECV ID NR:10) este legată prin legătură peptidică la capătul C-terminal al constructului de anticorp conform invenției.

Primul domeniu de legare al constructului de anticorp din prezenta invenție se leagă la MSLN umană pe suprafața unei celule țintă. Secvența de aminoacizi preferată a MSLN umană este reprezentată de NR: 231, 232 și 233. Primul domeniu de legare conform invenției se leagă, de preferință, la MSLN atunci când este exprimat prin celule sau linii celulare care exprimă în mod natural și/sau prin celule sau linii celulare transformate sau transfectate (stabil/tranzitoriu) cu MSLN. Într-un exemplu de realizare preferat, primul domeniu de legare se leagă de asemenea la MSLN atunci când MSLN

este utilizată ca moleculă "țintă" sau "ligand" într-un test de legare *in vitro*, cum ar fi BIAcore sau Scatchard. "Celula țintă" poate fi orice celulă procariotă sau eucariotă care exprimă MSLN pe suprafața sa; de preferință, celula țintă este o celulă care face parte din corpul uman sau animal, cum ar fi o celulă de cancer ovarian, celulă de cancer pancreatic, celulă de mezoteliom, celulă de cancer pulmonar, celulă de cancer gastric și celulă de cancer de sân triplu negativ.

Afinitatea primului domeniu de legare pentru MSLN umană este de preferință ≤ 20 nM, mai preferabil ≤ 10 nM, chiar mai preferabil ≤ 5 nM, chiar mai preferabil ≤ 2 nM, chiar mai preferabil ≤ 1 nM, chiar mai preferabil $\leq 0,6$ nM, chiar mai preferabil $\leq 0,5$ nM, și cel mai preferabil $\leq 0,4$ nM. Afinitatea poate fi măsurată, de exemplu, într-un test BIAcore sau într-un test Scatchard, de ex. așa cum este descris în Exemple. Alte metode de determinare a afinității sunt, de asemenea, bine-cunoscute persoanei de specialitate; a se vedea de ex. Exemplul 3 anexat.

Sunt de asemenea avute în vedere modificări ale secvenței de aminoacizi ale constructelor de anticorpi descrise aici. De exemplu, poate fi de dorit să se îmbunătățească afinitatea de legare și/sau alte proprietăți biologice ale constructului de anticorp. Variantele secvenței de aminoacizi ale constructelor de anticorpi sunt preparate prin introducerea modificărilor adecvate de nucleotide în constructele de anticorpi ale acidului nucleic sau prin sinteza peptidelor. Toate modificările secvenței de aminoacizi descrise mai jos ar trebui să aibă ca rezultat un construct de anticorp care păstrează încă activitatea biologică dorită (legare la MSLN și la CD3) a moleculei parentale nemodificate.

Termenul "aminoacid" sau "reziduu de aminoacid" se referă în mod obișnuit la un aminoacid având definiția recunoscută în domeniu, cum ar fi un aminoacid selectat din grupul constând din: alanină (Ala sau A); arginină (Arg sau R); asparagină (Asn sau N); acid aspartic (Asp sau D); cisteină (Cys sau C); glutamină (Gln sau Q); acid glutamic (Glu sau E); glicină (Gly sau G); histidină (His sau H); izoleucină (Ile sau I); leucină (Leu sau L); lizină (Lys sau K); metionină (Met sau M); fenilalanină (Phe sau F); prolină (Pro sau P); serină (Ser sau S); treonină (Thr sau T); triptofan (Trp sau W); tirozină (Tyr sau Y); și valină (Val sau V), deși aminoacizi modificați, sintetici sau rari pot fi utilizați după cum se dorește. În general, aminoacizii pot fi grupați ca având un lanț lateral nepolar (de ex., Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val); un lanț lateral încărcat negativ (de ex., Asp, Glu); un lanț lateral încărcat pozitiv (de ex., Arg, His, Lys); sau un lanț lateral polar neîncărcat (de ex., Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp și Tyr).

Modificările aminoacizilor includ, de exemplu, ștergeri din, și/sau inserări în, și/sau substituții ale, reziduurilor din secvențele de aminoacizi ale constructelor de anticorpi. Orice combinație de ștergere, inserare și substituție este făcută pentru a ajunge la constructul final, cu condiția ca constructul final să posede caracteristicile dorite. Modificările aminoacizilor pot, de asemenea, modifica procesele post-tranlaționale ale constructelor de anticorpi, cum ar fi schimbarea numărului sau poziției situsurilor de glicozilare.

De exemplu, 1, 2, 3, 4, 5 sau 6 aminoacizi pot fi inserați sau șterși în fiecare dintre CDR-uri (desigur, în funcție de lungimea lor), în timp ce 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, sau 25 de aminoacizi pot fi inserați în sau eliminați din fiecare dintre FR-uri. De preferință, inserțiile de secvențe de aminoacizi includ fuziuni amino- și/sau carboxil-terminale variind în lungime de la 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 reziduuri la polipeptide care conțin o sută sau mai multe reziduuri, precum și inserții intra-secvență ale resturilor de aminoacizi unice sau multiple. O variantă de inserție a constructului de anticorp conform invenției include fuziunea la capătul N-terminal sau la capătul C-terminal al constructului de anticorp a unei enzime sau fuziunea la o polipeptidă care crește timpul de înjumătățire plasmatică al constructului de anticorp.

Situsurile de cel mai mare interes pentru mutageneza substituțională includ CDR-urile lanțului greu și/sau ușor, în special regiunile hipervariabile, dar sunt de asemenea avute în vedere modificări FR în lanțul greu și/sau ușor. Substituțiile sunt preferabil substituții conservatoare așa cum este descris aici. De preferință, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10 aminoacizi pot fi substituiți într-o CDR, în timp ce 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 sau 25 aminoacizi pot fi substituiți în regiunile cadru (FR), în funcție de lungimea CDR sau FR. De exemplu, dacă o secvență CDR cuprinde 6 aminoacizi, se preconizează că unul, doi sau trei dintre acești aminoacizi sunt substituiți. În mod similar, dacă o secvență CDR cuprinde 15 aminoacizi, se preconizează că unul, doi, trei, patru, cinci sau șase dintre acești aminoacizi sunt substituiți.

O metodă utilă pentru identificarea anumitor reziduuri sau regiuni ale constructelor de anticorpi care sunt locații preferate pentru mutageneză este numită "mutageneză cu scanare cu alanină", așa cum este descris de Cunningham și Wells în Science, 244: 1081-1085 (1989). Aici, un reziduu sau un grup de reziduuri țintă din constructul de anticorp este identificat (*de ex.* reziduuri încărcate, cum ar fi arg, asp, his, lys și glu) și înlocuit cu un aminoacid neutru sau încărcat negativ (cel mai preferabil alanină sau polialanină) pentru a afecta interacțiunea aminoacizilor cu epitopul.

Acele locații de aminoacizi care demonstrează sensibilitate funcțională la substituții sunt apoi rafinate prin introducerea de alte variante sau de variante suplimentare la, sau pentru, situsurile de substituție. Astfel, în timp ce situsul sau regiunea pentru introducerea unei variații a secvenței de aminoacizi este predeterminat, natura mutației *in sine* nu trebuie predeterminată. De exemplu, pentru a analiza sau optimiza performanța unei mutații la un anumit situs, scanarea cu alanină sau mutageneza aleatorie pot fi efectuate la un codon sau regiune țintă, iar variantele de construct de anticorp exprimate sunt selectate pentru combinația optimă a activității dorite. Tehnicile pentru realizarea mutațiilor de substituție la situsurile predeterminate din ADN având o secvență cunoscută sunt bine-cunoscute, de exemplu, mutageneza primerului M13 și mutageneza PCR. Screening-ul mutanților se face folosind teste ale activităților de legare a antigenului, cum ar fi legarea MSLN sau CD3.

În general, dacă aminoacizii sunt substituiți în una sau mai multe sau toate CDR-urile lanțului greu și/sau ușor, este de preferat ca secvența "substituită" obținută atunci să fie în proporție de cel puțin 60% sau 65%, mai preferabil 70% sau 75%, chiar mai preferabil 80% sau 85%, și în mod deosebit preferabil 90% sau 95% identică cu secvența CDR "originală". Aceasta înseamnă că este dependentă de lungimea CDR în măsura în care este identică cu secvența "substituită". De exemplu, o CDR având 5 aminoacizi este de preferință 80% identică cu secvența sa substituită pentru a avea cel puțin un aminoacid substituit. În consecință, CDR-urile constructului de anticorp pot avea diferite grade de identitate față de secvențele lor substituite, de exemplu, CDRL1 poate avea 80%, în timp ce CDRL3 poate avea 90%.

Substituțiile (sau înlocuirile) preferate sunt substituții conservatoare. Cu toate acestea, este avută în vedere orice substituție (inclusiv substituția neconservatoare sau una sau mai multe dintre "substituțiile de exemplu" enumerate în Tabelul 1, de mai jos) atâta timp cât constructul de anticorp își păstrează capacitatea de a se lega la MSLN prin primul domeniu de legare și la CD3 sau CD3 epsilon prin intermediul celui de al doilea domeniu de legare și/sau CDR-urile sale au o identitate cu secvența apoi substituită (cel puțin 60% sau 65%, mai preferabil 70% sau 75%, chiar mai preferabil 80% sau 85% și în mod deosebit de preferabil 90% sau 95% identice cu secvența CDR "originală").

Substituțiile conservatoare sunt prezentate în Tabelul 1 sub titlul "substituții preferate". Dacă astfel de substituții duc la o schimbare a activității biologice, atunci pot fi introduse modificări mai substanțiale, denumite "substituții de exemplu" în Tabelul 1,

sau așa cum este descris mai jos în referință la clasele de aminoacizi, și produsele selectate pentru o caracteristică dorită.

Tabelul 1: Substituții de aminoacizi

Original	Substituții de exemplu	Substituții preferate
Ala (A)	val, leu, ile	val
Arg (R)	lys, gln, asn	lys
Asn (N)	gln, his, asp, lys, arg	gln
Asp (D)	glu, asn	glu
Cys (C)	ser, ala	ser
Gln (Q)	asn, glu	asn
Glu (E)	asp, gln	asp
Gly (G)	Ala	ala
His (H)	asn, gln, lys, arg	arg
Ile (I)	leu, val, met, ala, phe	leu
Leu (L)	norleucină, ile, val, met, ala	ile
Lys (K)	arg, gln, asn	arg
Met (M)	leu, phe, ile	leu
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr, phe	tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	phe
Val (V)	ile, leu, met, phe, ala	leu

Modificările substanțiale ale proprietăților biologice ale constructului de anticorp din prezenta invenție sunt realizate prin selectarea substituțiilor care diferă semnificativ în efectul lor asupra menținerii (a) a structurii scheletului polipeptidic în zona substituției,

de exemplu, sub formă de foaie sau conformație elicoidală, (b) sarcinii sau hidrofobicității moleculei la situsul țintă sau (c) celei mai mari părți a lanțului lateral. Reziduurile naturale sunt împărțite în grupuri pe baza proprietăților comune ale lanțului lateral: (1) hidrofobe: norleucina, met, ala, val, leu, ile; (2) hidrofile neutre: cys, ser, thr; (3) acide: asp, glu; (4) bazic: asn, gin, his, lys, arg; (5) reziduuri care influențează orientarea lanțului: gly, pro; și (6) aromatice: trp, tyr, phe.

Substituțiile neconservatoare vor presupune înlocuirea unui membru al uneia dintre aceste clase cu o altă clasă. Orice reziduu de cisteină care nu este implicat în menținerea conformației corecte a constructului de anticorp poate fi substituit, în general cu serină, pentru a îmbunătăți stabilitatea oxidativă a moleculei și pentru a preveni reticularea aberantă. În schimb, se pot adăuga legături de cisteină la anticorp pentru a îmbunătăți stabilitatea acestuia (în special în cazul în care anticorpul este un fragment de anticorp, cum ar fi un fragment Fv).

Pentru secvențele de aminoacizi, identitatea și/sau asemănarea secvenței este determinată prin utilizarea tehnicilor standard cunoscute în domeniu, inclusiv, dar fără a se limita la, algoritmul de identitate a secvenței locale al Smith și Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, algoritmul de aliniere a identității secvenței al Needleman și Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, metoda de căutare a asemănării Pearson și Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. S.U.A. 85:2444, implementări computerizate ale acestor algoritmi (GAP, BESTFIT, FASTA și TFASTA în Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin), programul de secvență Best Fit descris de Devereux și colab., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, de preferință folosind setările implicite sau prin inspecție. De preferință, procentul de identitate este calculat de FastDB pe baza următorilor parametri: penalizare de nepotrivire de 1; penalizare de decalaj de 1; penalizare pentru dimensiunea decalajului de 0,33; și penalizare de alăturare de 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Un exemplu de algoritm util este PILEUP. PILEUP creează o aliniere de secvență multiplă dintr-un grup de secvențe conexe utilizând alinieri progresive, în perechi. Poate, de asemenea, să traseze un copac care să arate relațiile de grupare utilizate pentru a crea alinierea. PILEUP folosește o simplificare a metodei de aliniere progresivă a Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360; metoda este similară cu cea descrisă de Higgins și Sharp, 1989, CABIOS 5:151-153. Parametri utili PILEUP, care includ o

greutate implicită a golului de 3,00, o greutate implicită a lungimii golului de 0,10 și goluri finale ponderate.

Un alt exemplu de algoritm util este algoritmul BLAST, descris în: Altschul și colab., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul și colab., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; și Karin și colab., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. S.U.A. 90:5873-5787. Un program BLAST deosebit de util este programul WU-BLAST-2 care a fost obținut din Altschul și colab., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480. WU-BLAST-2 folosește mai mulți parametri de căutare, majoritatea fiind setați la valorile implicite. Parametrii ajustabili sunt setați cu următoarele valori: interval de suprapunere=1, fracțiune de suprapunere=0,125, prag de cuvinte (T)=ll. Parametrii HSP S și HSP S2 sunt valori dinamice și sunt stabiliți de programul însuși în funcție de compoziția secvenței particulare și de compoziția bazei de date particulare în raport cu care este căutată secvența de interes; cu toate acestea, valorile pot fi ajustate pentru a crește sensibilitatea.

Un algoritm util suplimentar este BLAST golit, așa cum este raportat de Altschul și colab., 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402. BLAST golit folosește scoruri de substituție BLOSUM-62; parametru prag T setat la 9; metoda cu două lovituri pentru a declanșa extensii fără gol, încarcă lungimi de goluri de k un cost de $10 + k$; Xu setat la 16, și Xg setat la 40 pentru etapa de căutare a bazei de date și la 67 pentru etapa de ieșire a algoritmilor. Alinierile golite sunt declanșate de un scor care corespunde la aproximativ 22 de biți.

În general, omologia aminoacizilor, asemănarea sau identitatea dintre variantele individuale de CDR-uri sunt de cel puțin 60% față de secvențele descrise aici și, mai tipic, cu omologii sau identități în creștere, de preferință, de cel puțin 65% sau 70%, mai preferabil cel puțin 75% sau 80%, chiar mai preferabil de cel puțin 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% și aproape 100%. În mod similar, "procent (%) identitate de secvență a acidului nucleic" în raport cu secvența de acid nucleic a proteinelor de legare identificate aici este definit ca procentul de reziduuri de nucleotide dintr-o secvență candidat care sunt identice cu reziduurile de nucleotide din codificarea secvenței constructului de anticorp. O metodă specifică utilizează modulul BLASTN al WU-BLAST-2 setat la parametrii implicați, cu intervalul de suprapunere și fracția de suprapunere setată la 1 și, respectiv, 0,125.

În general, omologia secvenței de acid nucleic, asemănarea sau identitatea dintre secvențele de nucleotide care codifică variantele CDR individuale și secvențele de nucleotide descrise aici sunt de cel puțin 60% și, mai tipic, cu omologii sau asemănări în

creștere, de preferință, de cel puțin 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, sau 99% și aproape 100%. Astfel, o "variantă de CDR" este una cu omologia, asemănarea sau identitatea specificată cu CDR părinte a invenției și împarte funcția biologică, incluzând, dar fără a se limita la, cel puțin 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, sau 99% din specificitatea și/sau activitatea CDR părinte.

Într-un exemplu de realizare, procentul de identitate cu linia germinală umană a constructelor de anticorpi conform invenției este $\geq 70\%$ sau $\geq 75\%$, mai preferabil $\geq 80\%$ sau $\geq 85\%$, chiar mai preferabil $\geq 90\%$ și cel mai preferabil $\geq 91\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$ sau chiar $\geq 96\%$. Identitatea față de produsele genei germinale ale anticorpilor umani este considerată a fi o caracteristică importantă pentru a reduce riscul proteinelor terapeutice de a provoca un răspuns imun împotriva medicamentului la pacient în timpul tratamentului. Hwang & Foote ("Immunogenicity of engineered antibodies"; Methods 36 (2005) 3-10) demonstrează că reducerea porțiunilor non-umane ale constructelor de anticorpi în medicament conduce la o scădere a riscului de a induce anticorpi anti-medicament la pacienți în timpul tratamentului. Prin compararea unui număr exhaustiv de medicamente cu anticorpi evaluate clinic și a datelor imunogenității respective, se arată tendința că umanizarea regiunilor V ale anticorpilor face proteina mai puțin imunogenă (în medie 5,1% dintre pacienți) decât anticorpii care prezintă regiuni V neumane nealterate (în medie 23,59% dintre pacienți). Un grad mai mare de identitate cu secvențele umane este, prin urmare, de dorit pentru terapeuica proteică bazată pe regiunea V sub formă de structuri de anticorpi. În acest scop al determinării identității liniei germinale, regiunile V ale VL pot fi aliniate cu secvențele de aminoacizi ale segmentelor V ale liniei germinale umane și ale segmentelor J (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) folosind software-ul Vector NTI și secvența de aminoacizi calculată prin împărțirea reziduurilor de aminoacizi identici la numărul total de reziduuri de aminoacizi ale VL în procente. Același lucru poate fi valabil și pentru segmentele VH (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) cu excepția faptului că VH CDR3 poate fi exclusă din cauza diversității sale ridicate și a lipsei partenerilor de aliniere existenți ai liniei germinale umane VH CDR3. Tehnicile recombinante pot fi apoi utilizate pentru a crește identitatea secvenței la genele germinale ale anticorpilor umani.

Într-un exemplu de realizare suplimentar, structurile de anticorpi bispecfici ale prezentei invenții prezintă randamente mari de monomeri în condiții standard la scară de

cercetare, *de ex.*, într-un proces standard de purificare în două etape. De preferință, randamentul de monomeri al constructelor de anticorpi conform invenției este $\geq 0,25$ mg/L supernatant, mai preferabil $\geq 0,5$ mg/L, chiar mai preferabil ≥ 1 mg/L, și cel mai preferabil ≥ 3 mg/L supernatant.

De asemenea, randamentul de izoforme ale constructului de anticorp dimeric și, prin urmare, procentul de monomer (*adică*, monomer: (monomer + dimer)) din constructele de anticorpi pot fi determinate. Productivitatea constructelor de anticorpi monomerici și dimerici și procentul de monomeri calculat poate, *de ex.*, să fie obținut în etapa de purificare SEC a supernatantului de cultură din producția standardizată la scară de cercetare în sticle cu roll on. Într-un exemplu de realizare, procentul de monomer al constructelor de anticorpi este $\geq 80\%$, mai preferabil $\geq 85\%$, chiar mai preferabil $\geq 90\%$ și cel mai preferabil $\geq 95\%$.

Într-un exemplu de realizare, constructele de anticorpi au o stabilitate plasmatică preferată (raportul dintre CE50 cu plasmă și CE50 fără plasmă) de ≤ 5 sau ≤ 4 , mai preferabil $\leq 3,5$ sau ≤ 3 , chiar mai preferabil $\leq 2,5$ sau ≤ 2 și cel mai preferabil $\leq 1,5$ sau ≤ 1 . Stabilitatea plasmatică a unui construct de anticorp poate fi testată prin incubarea constructului în plasma umană la 37°C timp de 24 de ore urmată de determinarea CE50 într-un test de citotoxicitate cu eliberare de crom 51. Celulele efectoare din testul de citotoxicitate pot fi stimulate de celule T CD8 pozitive umane îmbogățite. Celulele țintă pot, *de ex.*, să fie celule CHO transfectate cu **MSLN** umană. Raportul celulă efector-țintă (E:T) poate fi ales să fie 10: 1. Fondul de plasmă umană utilizat în acest scop este derivat din sângele donatorilor sănătoși colectat de seringile acoperite cu EDTA. Componentele celulare sunt îndepărtate prin centrifugare și faza plasmatică superioară este colectată și ulterior reunită. Ca martor, constructele de anticorpi sunt diluate imediat înainte de testul de citotoxicitate în mediu RPMI-1640. Stabilitatea plasmei este calculată ca raport dintre CE50 (după incubarea plasmei) și CE50 (martor). A se vedea Exemplul 6.

În plus, este de preferat ca conversia monomer în dimer a constructelor de anticorpi conform invenției să fie scăzută. Conversia poate fi măsurată în condiții diferite și analizată prin cromatografie de excludere pe baza mărimii de performanță ridicată. A se vedea Exemplul 9. De exemplu, incubarea izoformelor monomerice ale constructelor de anticorpi poate fi efectuată timp de 7 zile la 37°C și concentrații, *de ex.*, de 100 $\mu\text{g/ml}$ sau 250 $\mu\text{g/ml}$ într-un incubator. În aceste condiții, este de preferat ca constructele de anticorpi conform invenției să prezinte un procent de dimeri care este $\leq 5\%$, mai preferabil

$\leq 4\%$, chiar mai preferabil $\leq 3\%$, chiar mai preferabil $\leq 2,5\%$, chiar mai preferabil $\leq 2\%$, chiar mai preferabil $\leq 1,5\%$ și cel mai preferabil $\leq 1\%$ sau $\leq 0,5\%$ sau chiar 0% .

De asemenea, este de preferat ca constructele de anticorpi bispecificali ale prezentei invenții să prezinte o conversie a dimerului foarte scăzută după un număr de cicluri de înghețare/dezghețare. De exemplu, monomerul constructului de anticorp este ajustat la o concentrație de $250 \mu\text{g/ml}$, *de ex.*, în tampon de formulare generic și supus la trei cicluri de înghețare/dezghețare (înghețare la -80°C timp de 30 de minute, urmată de dezghețare timp de 30 de minute la temperatura camerei), urmate de SEC de înaltă performanță pentru a determina procentul de construct de anticorp monomeric inițial, care a fost transformat în construct de anticorp dimeric. De preferință, procentele de dimer ale constructelor de anticorpi bispecificali sunt $\leq 5\%$, mai preferabil $\leq 4\%$, chiar mai preferabil $\leq 3\%$, chiar mai preferabil $\leq 2,5\%$, chiar mai preferabil $\leq 2\%$, chiar mai preferabil $\leq 1,5\%$, și cel mai preferabil $\leq 1\%$ sau chiar $\leq 0,5\%$, de exemplu după trei cicluri de îngheț/dezgheț.

Constructele de anticorpi bispecificali din prezenta invenție prezintă, de preferință, o termostabilitate favorabilă cu temperaturi de agregare $\geq 45^\circ\text{C}$ sau $\geq 50^\circ\text{C}$, mai preferabil $\geq 51^\circ\text{C}$, $\geq 52^\circ\text{C}$, $\geq 53^\circ\text{C}$ sau $\geq 54^\circ\text{C}$, chiar mai preferabil $\geq 56^\circ\text{C}$ sau $\geq 57^\circ\text{C}$, și cel mai preferabil $\geq 58^\circ\text{C}$ sau $\geq 59^\circ\text{C}$. Parametrul de termostabilitate poate fi determinat în termeni de temperatură de agregare a anticorpilor după cum urmează: Soluția de anticorp la o concentrație de $250 \mu\text{g/ml}$ este transferată într-o cuvă de unică folosință și plasată într-un dispozitiv Dynamic Light Scattering (DLS). Proba este încălzită de la 40°C la 70°C la o rată de încălzire de $0,5^\circ\text{C/min}$, cu achiziție constantă a razei măsurate.

Creșterea razei care indică topirea proteinei și agregarea este utilizată pentru a calcula temperatura de agregare a anticorpului. A se vedea Exemplul 10.

Alternativ, curbele de topire ale temperaturii pot fi determinate prin calorimetrie cu scanare diferențială (DSC) pentru a determina stabilitățile biofizice intrinseci ale proteinelor constructelor de anticorpi. Aceste experimente sunt efectuate folosind un dispozitiv VP-DSC MicroCal LLC (Northampton, MA, S.U.A.). Absorbția energetică a unei probe care conține un construct de anticorp este înregistrată de la 20°C la 90°C comparativ cu o probă care conține doar tamponul de formulare. Constructele de anticorpi sunt ajustate la o concentrație finală de $250 \mu\text{g/ml}$, *de ex.*, în tampon de rulare SEC. Pentru înregistrarea curbei de topire respective, temperatura generală a probei este mărită în trepte. La fiecare temperatură T se captează energia probei și se înregistrează referința tamponului de formulare. Diferența de absorbție a energiei C_p ($\text{kcal/mol}/^\circ\text{C}$) a probei minus referința este reprezentată grafic în funcție de temperatura respectivă.

Temperatura de topire este definită ca temperatura la prima maximă de absorbție a energiei.

Constructele de anticorpi bispecfici MSLN xCD3 ale invenției sunt, de asemenea, preconizate a avea o turbiditate (măsurată prin OD340 după concentrarea constructului de anticorp monomeric purificat la 2,5 mg/ml și incubare peste noapte) de $\leq 0,2$, de preferință de $\leq 0,15$, mai preferabil de $\leq 0,12$, chiar mai preferabil de $\leq 0,1$ sau chiar $\geq 0,09$, și cel mai preferabil de $\leq 0,08$ sau $\geq 0,07$. A se vedea Exemplul 11.

Într-un alt exemplu de realizare, constructul de anticorp conform invenției este stabil la pH acid. Cu cât constructul anticorpului se comportă mai tolerant la pH nefiziologic, cum ar fi pH 5,5 (un pH care este necesar pentru a rula, de ex., o cromatografie cu schimb de cationi), cu atât este mai mare recuperarea constructului de anticorp eluat dintr-o coloană de schimb ionic față de cantitatea totală de proteine încărcate. Recuperarea constructului de anticorp dintr-o coloană de schimb ionic (de ex., cationic) la pH 5,5 este de preferință $\geq 30\%$, mai preferabil $\geq 40\%$, mai preferabil $\geq 50\%$, chiar mai preferabil $\geq 60\%$, chiar mai preferabil $\geq 70\%$, chiar mai preferabil $\geq 80\%$, chiar mai preferabil $\geq 90\%$, chiar mai preferabil $\geq 95\%$ și cel mai preferabil $\geq 99\%$. A se vedea Exemplul 7.

În plus, este avut în vedere că constructele de anticorpi bispecfici ale prezentei invenții prezintă eficacitate terapeutică sau activitate anti-tumorală. Acest lucru poate, de ex., să fie evaluat într-un studiu, așa cum este dezvăluit în următorul exemplu de model de xenogrefă tumorală umană în stadiu avansat:

În ziua 1 a studiului, 5×10^6 celule ale unei linii de celule canceroase umane MSLN pozitive (de ex., OVCAR-8) sunt injectate subcutanat în flancul dorsal drept al șoarecilor femele NOD/SCID. Când volumul mediu al tumorii atinge aproximativ 100 mm^3 , celulele T pozitive la CD3 uman expandate in vitro sunt transplantate la șoareci prin injectarea a aproximativ 2×10^7 celule în cavitatea peritoneală a animalelor. Șoarecii din grupul de control 1 al vehiculului nu primesc celule efectoare și sunt folosiți ca martor netransplantat pentru comparație cu grupul de control 2 al vehiculului (care primesc celule efectoare) pentru a monitoriza impactul celulelor T singure asupra creșterii tumorii. Tratamentul cu anticorpi începe când volumul mediu al tumorii ajunge la aproximativ 200 mm^3 . Dimensiunea medie a tumorii pentru fiecare grup de tratament în ziua începerii tratamentului nu trebuie să fie statistic diferită de nici un alt grup (analiza varianței). Șoarecii sunt tratați cu 0,5 mg/kg/zi dintr-un construct de anticorp bispecific MSLN xCD3 prin injectare intravenoasă în bolus timp de aproximativ 15 până la 20 de zile. Tumorile

sunt măsurate prin etrier în timpul studiului și progresul este evaluat prin compararea volumelor tumorale (TV) între grupuri. Inhibarea creșterii tumorii T/C [%] este determinată prin calcularea TV ca $T/C\% = 100 \times (TV \text{ mediană a grupului analizat}) / (TV \text{ mediană a grupului de control } 2)$.

Persoana calificată știe cum să modifice sau să adapteze anumiți parametri ai acestui studiu, cum ar fi numărul de celule tumorale injectate, situsul injectării, numărul de celule T umane transplantate, cantitatea de structuri de anticorpi bispecfici care urmează să fie administrate și orarele, ajungând totuși la un rezultat semnificativ și reproductibil. De preferință, inhibarea creșterii tumorii T/C [%] este ≤ 70 sau ≤ 60 , mai preferabil ≤ 50 sau ≤ 40 , chiar mai preferabil ≤ 30 sau ≤ 20 și cel mai preferabil ≤ 10 sau ≤ 5 sau chiar $\leq 2,5$.

Invenția furnizează în plus o polinucleotidă/moleculă de acid nucleic care codifică un construct de anticorp conform invenției.

O polinucleotidă este un biopolimer compus din 13 sau mai mulți monomeri nucleotidici legați covalent într-un lanț. ADN (cum ar fi ADNc) și ARN (cum ar fi ARNm) sunt exemple de polinucleotide cu funcție biologică distinctă. Nucleotidele sunt molecule organice care servesc drept monomeri sau subunități ale moleculelor de acid nucleic precum ADN sau ARN. Molecula de acid nucleic sau polinucleotida poate fi dublu catenară și monocatenară, liniară și circulară. Este cuprinsă, de preferință, într-un vector care este preferabil cuprins într-o celulă gazdă. Celula gazdă menționată este, de ex. după transformare sau transfecție cu vectorul sau polinucleotida conform invenției, capabilă să exprime constructul de anticorp. În acest scop, polinucleotida sau molecula de acid nucleic este legată operativ de secvențe martor.

Codul genetic este setul de reguli prin care informațiile codificate în materialul genetic (acizi nucleici) sunt traduse în proteine. Decodificarea biologică în celulele vii este realizată de ribozom care leagă aminoacizii într-o ordine specificată de ARNm, folosind molecule de ARNt pentru a transporta aminoacizii și pentru a citi trei nucleotide ARNm la un moment dat. Codul definește modul în care secvențele acestor triplete de nucleotide, numite codoni, specifică ce aminoacid va fi adăugat în continuare în timpul sintezei proteinelor. Cu unele excepții, un codon cu trei nucleotide într-o secvență de acid nucleic specifică un singur aminoacid. Deoarece marea majoritate a genelor sunt codificate cu exact același cod, acest cod particular este adesea denumit codul genetic canonic sau standard. În timp ce codul genetic determină secvența de proteine pentru o anumită

regiune de codificare, alte regiuni genomice pot influența când și unde sunt produse aceste proteine.

Mai mult, prezenta dezvoltare furnizează un vector care cuprinde o polinucleotidă/moleculă de acid nucleic conform invenției.

Un vector este o moleculă de acid nucleic folosită ca vehicul pentru a transfera material genetic (străin) într-o celulă. Termenul "vector" cuprinde - dar nu se limitează la - plasmide, virusuri, cosmide și cromozomi artificiali. În general, vectorii proiectați cuprind o origine a replicării, un situs de multiclonare și un marker selectabil. Vectorul în sine este, în general, o secvență nucleotidică, de obicei o secvență ADN, care cuprinde o inserție (transgenă) și o secvență mai mare care servește drept "schelet" al vectorului. Vectorii moderni pot cuprinde caracteristici suplimentare în afară de inserția transgenică și un schelet: promotor, marker genetic, rezistență la antibiotice, genă raportor, secvență de țintire, etichetă de purificare a proteinelor. Vectorii numiți vectori de exprimare (constructe de exprimare) sunt în mod specific pentru exprimarea transgenului în celula țintă și, în general, au secvențe de control.

Termenul "secvențe de control" se referă la secvențe de ADN necesare pentru exprimarea unei secvențe de codificare legate operabil într-un anumit organism gazdă. Secvențele de control care sunt potrivite pentru procariote, de exemplu, includ un promotor, opțional o secvență operator și un situs de legare a ribozomilor. Se știe că celulele eucariote utilizează promotori, semnale de poliadenilare și potențiatori.

Un acid nucleic este "legat operabil" atunci când este amplasat într-o relație funcțională cu o altă secvență de acid nucleic. De exemplu, ADN-ul pentru o pre-secvență sau un lider secretor este legat operabil de ADN-ul pentru o polipeptidă dacă este exprimat ca o preproteină care participă la secreția polipeptidei; un promotor sau amplificator este legat operabil de o secvență de codificare dacă afectează transcrierea secvenței; sau un situs de legare a ribozomului este legat operabil de o secvență de codificare dacă este poziționat astfel încât să faciliteze translația. În general, "legat operabil" înseamnă că secvențele ADN care sunt legate sunt adiacente și, în cazul unui lider secretor, adiacente și în fază de citire. Cu toate acestea, amplificatorii nu trebuie să fie adiacenți. Legarea se realizează prin ligare la situsuri de restricție convenabile. Dacă astfel de situsuri nu există, adaptoarele sau linkerele oligonucleotidice sintetice sunt utilizate în conformitate cu practica convențională.

"Transfecția" este procesul de introducere deliberată a moleculelor de acid nucleic sau a polinucleotidelor (inclusiv vectori) în celulele țintă. Termenul este utilizat mai ales

pentru metodele non-virale în celulele eucariote. Transducția este adesea utilizată pentru a descrie transferul de molecule de acid nucleic sau de polinucleotide mediat de virus. Transfecția celulelor animale implică de obicei deschiderea porilor tranzitorii sau "găurilor" în membrana celulară, pentru a permite absorbția materialului. Transfecția poate fi efectuată folosind fosfat de calciu, prin electroporare, prin stoarcere celulară sau prin amestecarea unei lipide cationice cu materialul pentru a produce lipozomi, care se fuzionează cu membrana celulară și își depun încărcătura în interior.

Termenul "transformare" este utilizat pentru a descrie transferul non-viral al moleculelor de acid nucleic sau al polinucleotidelor (inclusiv vectori) în bacterii și, de asemenea, în celule eucariote non-animale, inclusiv celule vegetale. Transformarea este, prin urmare, modificarea genetică a unei celule eucariote bacteriene sau non-animale, rezultată din absorbția directă prin membrana celulară (membranele celulare) din mediul înconjurător și încorporarea ulterioară a materialului genetic exogen (molecule de acid nucleic). Transformarea poate fi efectuată prin mijloace artificiale. Pentru ca transformarea să se întâmple, celulele sau bacteriile trebuie să se afle într-o stare de competență, care ar putea apărea ca răspuns limitat la condiții de mediu, cum ar fi înfometarea și densitatea celulară.

Mai mult, invenția furnizează o celulă gazdă transformată sau transfectată cu polinucleotida/molecula de acid nucleic conform invenției. Sunt, de asemenea, dezvăluite celulele gazdă transformate sau transfectate cu vectorul descris aici.

Așa cum sunt utilizați aici, termenii "celulă gazdă" sau "celulă receptor" sunt intenționați să includă orice celulă individuală sau cultură celulară care poate fi sau a fost receptor de vectori, molecule exogene de acid nucleic și polinucleotide care codifică constructul de anticorp al prezentei invenții; și/sau receptori ai constructului de anticorp în sine. Introducerea materialului respectiv în celulă se realizează prin transformare, transfecție și altele asemenea. Termenul "celulă gazdă" este, de asemenea, destinat să includă descendenți sau descendenți potențiali ai unei singure celule. Deoarece anumite modificări pot apărea în generațiile următoare, fie din cauza mutației naturale, accidentale sau deliberate, fie din cauza influențelor mediului, astfel de descendenți nu pot fi, de fapt, complet identici (în morfologie sau în complement genomic sau ADN total) cu celula părinte, dar sunt încă incluși în domeniul de aplicare al termenului așa cum este utilizat aici. Celulele gazdă adecvate includ celule procariote sau eucariote și includ în plus, dar nu se limitează la, bacterii, celule de drojdie, celule fungice, celule vegetale și celule

animale, cum ar fi celule de insecte și celule de mamifere, de exemplu, murine, de șobolan, de macac sau umane.

Constructul de anticorp conform invenției poate fi produs în bacterii. După exprimare, constructul de anticorp conform invenției este izolat de pasta celulară de *E. coli* într-o fracțiune solubilă și poate fi purificat, de exemplu, prin cromatografie de afinitate și/sau de excludere pe baza mărimii. Purificarea finală poate fi efectuată similar cu procesul de purificare a anticorpului exprimat, de ex., în celule CHO.

În plus față de procariote, microbii eucarioti, cum ar fi ciupercile filamentoase sau drojdia, sunt gazde de clonare sau exprimare adecvate pentru constructul de anticorp conform invenției. *Saccharomyces cerevisiae*, sau drojdia obișnuită de panificație, este cea mai utilizată dintre microorganismele gazdă eucariote inferioare. Cu toate acestea, un număr de alte genuri, specii și tulpini sunt disponibile în mod obișnuit și utile aici, cum ar fi *Schizosaccharomyces pombe*, gazde Kluyveromyces, cum ar fi *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilarum* (ATCC 36906), *K. thermotolerans*, și *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402 226); *Pichia pastoris* (EP 183 070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244 234); *Neurospora crassa*; Schwanniomyces, cum ar fi *Schwanniomyces occidentalis*; și ciuperci filamentoase, cum ar fi gazde *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, și *Aspergillus*, cum ar fi *A. nidulans* și *A. niger*.

Celulele gazdă adecvate pentru exprimarea constructului de anticorp glicozilat conform invenției sunt derivate din organisme multicelulare. Exemplele de celule nevertebrate includ celule de plante și insecte. Au fost identificate numeroase tulpini și variante baculovirale și celule gazdă de insecte permissive corespunzătoare de la gazde, cum ar fi *Spodoptera frugiperda* (omidă), *Aedes aegypti* (țânțar), *Aedes albopictus* (țânțar), *Drosophila melanogaster* (drosofila), și *Bombyx mori*. O varietate de tulpini virale pentru transfecție sunt disponibile public, de ex., varianta L-1 a *Autographa californica* NPV și tulpina Bm-5 a *Bombyx mori* NPV, și astfel de virusuri se pot utiliza ca virus aici conform prezentei invenții, în special pentru transfecția celulelor de *Spodoptera frugiperda*.

Culturile de celule vegetale de bumbac, porumb, cartofi, soia, petunia, roșii, *Arabidopsis* și tutun pot fi, de asemenea, folosite ca gazde. Clonarea și vectorii de exprimare utili în producția de proteine în cultura celulelor vegetale sunt cunoscute de specialiștii în domeniu. A se vedea de ex. Hiatt și colab., *Nature* (1989) 342: 76-78, Owen

și colab. (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794, Artsaenko și colab. (1995) *The Plant J* 8: 745-750, și Fecker și colab. (1996) *Plant Mol Biol* 32: 979-986.

Cu toate acestea, interesul a fost cel mai mare în celulele de vertebrate, iar propagarea celulelor de vertebrate în cultură (cultură de țesuturi) a devenit o procedură de rutină. Exemple de linii de celule gazdă de mamifere utile sunt linia CV1 de rinichi de maimuță transformată de SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linia renală embrionară umană (293 sau 293 celule subclonate pentru creștere în cultură în suspensie, Graham și colab., *J. Gen Virol.* 36: 59 (1977)); celule renale de pui de hamster (BHK, ATCC CCL 10); celule ovariene de hamster chinezesc/-DHFR/-DHFR (CHO, Urlaub și colab., *Proc. Natl. Acad. Sci. SUA* 77: 4216 (1980)); celule Sertoli de șoarece (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980)); celule renale de maimuță (CV1 ATCC CCL 70); celule renale de maimuță verde africană (VERO-76, ATCC CRL1587); celule de carcinom cervical uman (HELA, ATCC CCL 2); celule renale canine (MOCK, ATCC CCL 34); celule hepatice de șobolan buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); celule pulmonare umane (W138, ATCC CCL 75); celule hepatice umane (Hep G2, 1413 8065); tumoare mamară de șoarece (MMT 060562, ATCC CCL5 1); celule TRI (Mather și colab., *Annals N. Y Acad. Sci.* (1982) 383: 44-68); celule MRC 5; celule FS4; și o linie de hepatom uman (Hep G2).

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, un procedeu pentru producerea unui construct de anticorp conform invenției, procedeul menționat cuprinzând cultivarea unei celule gazdă a invenției în condiții care să permită exprimarea constructului de anticorp conform invenției și recuperarea constructului de anticorp produs din cultură.

Așa cum este utilizat aici, termenul "cultură" se referă la menținerea, diferențierea, creșterea, proliferarea și/sau propagarea *in vitro* a celulelor în condiții adecvate într-un mediu. Termenul "exprimare" include orice etapă implicată în producerea unui construct de anticorp conform invenției incluzând, dar fără a se limita la, transcriere, modificare post-transcripțională, translație, modificare post-translațională și secreție.

Când se utilizează tehnici de recombinare, constructul de anticorp poate fi produs intracelular, în spațiul periplasmatic sau secretat direct în mediu. Dacă constructul de anticorp este produs intracelular, ca primă etapă, resturile de particule, fie celule gazdă, fie fragmente lizate, sunt îndepărtate, de exemplu, prin centrifugare sau ultrafiltrare. Carter și colab., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) descriu o procedură pentru izolarea anticorpilor care sunt secretați în spațiul periplasmatic al *E. coli*. Pe scurt, pasta celulară este decongelată în prezența acetatului de sodiu (pH 3,5), EDTA și fenilmetilsulfonilfluorură (PMSF) timp de aproximativ 30 de minute. Resturile celulare pot

fi îndepărtate prin centrifugare. În cazul în care anticorpul este secretat în mediu, supernatanții din astfel de sisteme de exprimare sunt, în general, mai întâi concentrați utilizând un filtru de concentrație de proteine disponibil comercial, de exemplu, o unitate de ultrafiltrare Amicon sau Millipore Pellicon. Un inhibitor de protează, cum ar fi PMSF, poate fi inclus în oricare dintre etapele anterioare pentru inhibarea proteolizei și pot fi incluse antibiotice pentru a preveni creșterea contaminanților accidentali.

Constructul de anticorp conform invenției preparat din celulele gazdă poate fi recuperat sau purificat utilizând, de exemplu, cromatografie cu hidroxilapatită, electroforeză pe gel, dializă și cromatografie de afinitate. Alte tehnici de purificare a proteinelor, cum ar fi fracționarea pe o coloană schimbătoare de ioni, precipitarea cu etanol, HPLC cu fază inversă, cromatografia pe silice, cromatografia pe heparină SEPHAROSE™, cromatografia pe o rășină schimbătoare de anioni sau cationi (cum ar fi o coloană de acid poliaspartic), focalizarea cromatografică, SDS-PAGE și precipitarea cu sulfat de amoniu sunt, de asemenea, disponibile în funcție de anticorpul care trebuie recuperat. În cazul în care constructul de anticorp conform invenției cuprinde un domeniu CH3, rășina Bakerbond ABX (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) este utilă pentru purificare.

Cromatografia de afinitate este o tehnică preferată de purificare. Matricea de care este atașat ligandul de afinitate este cel mai adesea agaroză, dar sunt disponibile și alte matrice. Matricele stabile mecanic, cum ar fi sticla cu pori controlați sau poli(stirendivinil)benzenul, permit viteze de curgere mai rapide și timpi de procesare mai scurți decât se poate obține cu agaroză.

Mai mult, invenția furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde un construct de anticorp conform invenției. Este de preferat pentru compoziția farmaceutică a invenției ca omogenitatea constructului de anticorp să fie $\geq 80\%$, mai preferabil $\geq 81\%$, $\geq 82\%$, $\geq 83\%$, $\geq 84\%$ sau $\geq 85\%$, mai preferabil $\geq 86\%$, $\geq 87\%$, $\geq 88\%$, $\geq 89\%$ sau $\geq 90\%$, mai preferabil $\geq 91\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$ sau $\geq 95\%$ și cel mai preferabil $\geq 96\%$, 97% , $\geq 98\%$ sau $\geq 99\%$.

Așa cum este utilizat aici, termenul "compoziție farmaceutică" se referă la o compoziție care este adecvată pentru administrare la un pacient, de preferință la un pacient uman. Compoziția farmaceutică preferată în mod deosebit a acestei invenții cuprinde unul sau mai multe structuri de anticorpi conform invenției, de preferință într-o cantitate eficientă terapeutică. De preferință, compoziția farmaceutică mai cuprinde formulări adecvate ale unuia sau mai multor purtători, stabilizatori, excipienți, diluanți, solubilizatori, surfactanți, emulgatori, conservanți și/sau adjuvanți (eficienți farmaceutici).

Constituenții acceptabili ai compoziției sunt de preferință netoxici pentru destinatari la dozele și concentrațiile utilizate. Compozițiile farmaceutice conform invenției includ, dar nu se limitează la, compoziții lichide, congelate și liofilizate.

Compozițiile inventive pot cuprinde un purtător acceptabil farmaceutic. În general, așa cum este utilizat aici, "purtător acceptabil farmaceutic" înseamnă orice soluție apoasă și neapoasă, soluții sterile, solvenți, tampoane, de ex. soluții saline tamponate cu fosfat (PBS), apă, suspensii, emulsii, cum ar fi emulsii ulei/apă, diferite tipuri de agenți de umectare, lipozomi, medii de dispersie și acoperiri, care sunt compatibile cu administrarea farmaceutică, în special cu administrarea parenterală. Utilizarea unor astfel de medii și agenți în compoziții farmaceutice este bine-cunoscută în domeniu, iar compozițiile care cuprind astfel de purtători pot fi formulate prin metode convenționale bine-cunoscute.

Anumite exemple de realizare furnizează compoziții farmaceutice care cuprind constructul de anticorp conform invenției și în plus unul sau mai mulți excipienți, cum ar fi cei descriși ilustrativ în această secțiune și în altă parte aici. Excipienții pot fi utilizați în invenție în acest sens pentru o mare varietate de scopuri, cum ar fi ajustarea proprietăților fizice, chimice sau biologice ale formulărilor, cum ar fi ajustarea vâscozității, sau a proceselor invenției pentru a îmbunătăți eficacitatea și/sau pentru a stabiliza astfel de formulări și procese împotriva degradării și deteriorării datorate, de exemplu, stresurilor care apar în timpul fabricației, transportului, depozitării, pregătirii înainte de utilizare, administrării și ulterior.

În anumite exemple de realizare, compoziția farmaceutică poate conține materiale de formulare în scopul modificării, menținerii sau conservării, de ex., a pH-ului, osmolarității, vâscozității, clarității, culorii, izotonicității, mirosului, sterilității, stabilității, vitezei de dizolvare sau eliberare, adsorbției sau penetrării compoziției (a se vedea, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Ediția 18", (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company). În astfel de exemple de realizare, materialele de formulare adecvate pot include, dar nu se limitează la:

- aminoacizi, cum ar fi glicina, alanina, glutamina, asparagina, treonina, prolina, 2-fenilalanina, inclusiv aminoacizii încărcăți, de preferință lizina, acetatul de lizină, arginina, glutamatul și/sau histidina
- antimicrobiene, cum ar fi agenți antibacterieni și antifungici
- antioxidanți, cum ar fi acidul ascorbic, metionina, sulfitul de sodiu sau hidrogensulfitul de sodiu;

- tampoane, sisteme tampon și agenți de tamponare care sunt utilizați pentru a menține compoziția la pH fiziologic sau la un pH ușor mai scăzut, de obicei într-un interval de pH de la aproximativ 5 la aproximativ 8 sau 9; exemple de soluții tampon sunt borat, bicarbonat, Tris-HCl, citrați, fosfați sau alți acizi organici, succinat, fosfat, histidină și acetat; de exemplu, tampon Tris de aproximativ pH 7,0-8,5, sau tampon acetat de aproximativ pH 4,0-5,5;
- solvenți neapoși, cum ar fi propilenglicolul, polietilenglicolul, uleiuri vegetale, cum ar fi uleiul de măsline și esteri organici injectabili, cum ar fi oleatul de etil;
- purtători apoși incluzând apă, soluții alcoolice/apoase, emulsii sau suspensii, inclusiv soluții saline și medii tamponate;
 - polimeri biodegradabili, cum ar fi poliesterii;
 - agenți de încărcare, cum ar fi manitolul sau glicina;
 - agenți de chelare, cum ar fi acidul etilendiaminotetraacetic (EDTA);
 - agenți izotonici și de întârziere a absorbției;
 - agenți de complexare, cum ar fi cafeina, polivinilpirolidona, beta-ciclodextrina sau hidroxipropil-beta-ciclodextrina)
- materiale de umplutură;
- monozaharide; dizaharide; și alți carbohidrați (cum ar fi glucoza, manoză sau dextrinele); carbohidrații pot fi zaharuri nereducătoare, de preferință trehaloză, zaharoză, octasulfat, sorbitol sau xilitol;
- proteine, polipeptide sau purtători proteici (cu greutate moleculară mică), cum ar fi albumina serică umană sau bovină, gelatina sau imunoglobulinele, de preferință de origine umană;
- coloranți și aromatizanți;
- agenți reducători care conțin sulf, cum ar fi glutationul, acidul tioctic, tioglicolatul de sodiu, tioglicerolul, [alfa]-monotioglicerolul și tiosulfatul de sodiu
- agenți de diluare;
- agenți de emulsionare;
- polimeri hidrofilici, cum ar fi polivinilpirolidona)
- contraioni care formează sare, cum ar fi sodiul;
- conservanți, cum ar fi antimicrobieni, antioxidanți, agenți de chelare, gaze inerte și altele asemenea; exemple sunt: clorură de benalconiu, acid

benzoic, acid salicilic, timerosal, alcool fenetic, metilparaben, propilparaben, clorhexidină, acid sorbic sau peroxid de hidrogen);

- complexe metalice, cum ar fi complexe Zn-proteină;
- solvenți și co-solvenți (cum ar fi glicerina, propilenglicolul sau polietilenglicolul);
- zaharuri și alcooli de zahăr, cum ar fi trehaloză, zaharoză, octasulfat, manitol, sorbitol sau xilitol, stahioză, manoză, sorboză, xiloză, riboză, mioinizitoză, galactoză, lactitol, ribitol, mioinizitol, galactitol, glicerol, ciclitoli (de ex., inozitol), polietilenglicol; și alcooli de zahăr polihidrici;
- agenți de suspendare;
- surfactanți sau agenți de umectare, cum ar fi pluronici, PEG, esteri de sorbitan, polisorbați, cum ar fi polisorbat 20, polisorbat, triton, trometamină, lecitină, colesterol, tiloxapal; surfactanții pot fi detergenți, de preferință cu o greutate moleculară > 1,2 KD și/sau un polieter, de preferință cu o greutate moleculară > 3 KD; exemple nelimitative pentru detergenții preferați sunt Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 și Tween 85; exemple nelimitative de polieteri preferați sunt PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 și PEG 5000;
- agenți de îmbunătățire a stabilității, cum ar fi zaharoza sau sorbitolul;
- agenți de creștere a tonicității, cum ar fi halogenuri de metale alcaline, de preferință clorură de sodiu sau potasiu, manitol sorbitol;
- vehicule de livrare parenterală, inclusiv soluție de clorură de sodiu, dextroză Ringer, dextroză și clorură de sodiu, Ringer lactat sau uleiuri fixe;
- vehicule de administrare intravenoasă, incluzând substanțe de completare cu fluide și nutrienți, agenți de completare cu electroliți (cum ar fi cele pe bază de dextroză Ringer).

Este evident pentru specialiștii în domeniu că diferiții constituenți ai compoziției farmaceutice (de ex., cei enumerați mai sus) pot avea efecte diferite, de exemplu, iar aminoacidul poate acționa ca un tampon, un stabilizator și/sau un antioxidant; manitolul poate acționa ca un agent de încărcare și/sau un agent de creștere a tonicității; clorura de sodiu poate acționa ca vehicul de livrare și/sau agent de creștere a tonicității; etc.

Este avut în vedere că compoziția conform invenției poate cuprinde, în plus față de polipeptida conform invenției definită aici, alți agenți activi biologic, în funcție de utilizarea intenționată a compoziției. Astfel de agenți pot fi medicamente care acționează asupra sistemului gastro-intestinal, medicamente care acționează ca citostatice,

medicamente care previn hiperuricemia, medicamente care inhibă imunoreacțiile (de ex. corticosteroizi), medicamente care modulează răspunsul inflamator, medicamente care acționează asupra sistemului circulator și/sau agenți, cum ar fi citokinele cunoscute în domeniu. Este avut în vedere, de asemenea, ca constructul de anticorp din prezenta invenție să fie aplicat într-o co-terapie, *adică*, în combinație cu un alt medicament anti-cancer.

În anumite exemple de realizare, compoziția farmaceutică optimă va fi determinată de un specialist în domeniu în funcție, de exemplu, de calea de administrare intenționată, formatul de livrare și doza dorită. A se vedea, de exemplu, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, *supra*. În anumite exemple de realizare, astfel de compoziții pot influența starea fizică, stabilitatea, viteza eliberarea *in vivo* și rata de eliminare *in vivo* a constructului de anticorp conform invenției. În anumite variante de realizare, vehiculul primar sau purtătorul dintr-o compoziție farmaceutică poate fi fie apos, fie neapos. De exemplu, un vehicul sau purtător adecvat poate fi apă pentru preparate injectabile, soluție salină fiziologică sau lichid cefalorahidian artificial, eventual suplimentat cu alte materiale comune în compoziții pentru administrare parenterală. Soluția salină tamponată neutră sau soluția salină amestecată cu albumină serică sunt alte vehicule cu titlu de exemplu. În anumite exemple de realizare, constructul de anticorp al compozițiilor invenției poate fi preparat pentru depozitare prin amestecarea compoziției selectate având gradul dorit de puritate cu agenți de formulare opționali (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, *supra*) sub formă de turtă liofilizată sau soluție apoasă. Mai mult, în anumite exemple de realizare, constructul de anticorp conform invenției poate fi formulat ca un liofilizat utilizând excipienți adecvați, cum ar fi zaharoza.

Când se are în vedere administrarea parenterală, compozițiile terapeutice pentru utilizare în această invenție pot fi furnizate sub formă de soluție apoasă apirogenă, acceptabilă parenteral, cuprinzând constructul de anticorp dorit al invenției într-un vehicul acceptabil farmaceutic. Un vehicul deosebit de potrivit pentru injecția parenterală este apa distilată sterilă în care constructul de anticorp conform invenției este formulat ca o soluție sterilă, izotonică, conservată corespunzător. În anumite exemple de realizare, preparatul poate implica formularea moleculei dorite cu un agent, cum ar fi microsfere injectabile, particule bio-erodabile, compuși polimerici (cum ar fi acidul polilactic sau acidul poliglicolic), perle sau lipozomi, care pot furniza eliberarea controlată sau susținută a produsului care poate fi livrat prin injecție depozit. În anumite exemple de realizare, acidul hialuronic poate fi de asemenea utilizat, având ca efect promovarea unei durate

susținute în circulație. În anumite exemple de realizare, dispozitivele de eliberare a medicamentelor implantabile pot fi utilizate pentru a introduce constructul de anticorp dorit.

Compozițiile farmaceutice suplimentare vor fi evidente pentru specialiștii în domeniu, incluzând formulări care implică constructul de anticorp conform invenției în formulări cu livrare/eliberare susținută sau controlată. Tehnicile pentru formularea unei varietăți de alte mijloace de livrare susținută sau controlată, cum ar fi purtători de lipozomi, microparticule bioerodabile sau granule poroase și injecții depozit, sunt, de asemenea, cunoscute specialiștilor în domeniu. A se vedea, de exemplu, cererea internațională de brevet nr. WO93/15722, care descrie eliberarea controlată a microparticulelor polimerice poroase pentru livrarea compozițiilor farmaceutice. Preparatele cu eliberare susținută pot include matrice polimerice semipermeabile sub formă de articole modelate, de ex., filme sau microcapsule. Matricele cu eliberare susținută pot include poliesteri, hidrogeluri, polilactide (așa cum sunt dezvăluite în Brevetul SUA Nr. 3.773.919 și publicația cererii de brevet european nr. EP 058481), copolimeri de acid L-glutamic și gamma etil-L-glutamat (Sidman și colab., 1983, *Biopolymers* 2:547-556), poli (2-hidroxietil-metacrilat) (Langer și colab., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 și Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), etilen-acetat de vinil (Langer și colab., 1981, *supra*) sau acid poli-D(-)-3-hidroxibutiric (publicația cererii de brevet european nr. EP 133.988). Compozițiile cu eliberare susținută pot include, de asemenea, lipozomi care pot fi preparați prin oricare dintre mai multe metode cunoscute în domeniu. A se vedea, de ex., Eppstein și colab., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. S.U.A.* 82:3688-3692; publicațiile cererilor de brevet european nr. EP 036.676; EP 088.046 și EP 143.949.

Constructul de anticorp poate fi, de asemenea, prins în microcapsule preparate, de exemplu, prin tehnici de coacervare sau prin polimerizare interfacială (de exemplu, hidroximetilceluloză sau microcapsule de gelatină și, respectiv, microcapsule de poli(metilmecacilat), în sisteme de administrare coloidală a medicamentelor (de exemplu, lipozomi), microsfele de albumină, microemulsii, nanoparticule și nanocapsule), sau în macroemulsii. Astfel de tehnici sunt dezvăluite în Remington's Pharmaceutical Sciences, ediția a 16-a, Oslo, A., Ed., (1980).

Compoziții farmaceutice utilizate pentru administrarea *in vivo* sunt de obicei furnizate ca preparate sterile. Sterilizarea poate fi realizată prin filtrare prin membrane de filtrare sterile. Când compoziția este liofilizată, sterilizarea utilizând această metodă poate fi efectuată fie înainte, fie după liofilizare și reconstituire. Compozițiile pentru administrare

parenterală pot fi stocate sub formă liofilizată sau într-o soluție. Compozițiile parenterale sunt, în general, amplasate într-un recipient având un orificiu de acces steril, de exemplu, o pungă de soluție intravenoasă sau un flacon având un dop de străpuns de un ac hipodermic de injecție.

Un alt aspect al invenției include constructul de anticorp auto-tamponant al formulărilor invenției, care poate fi utilizat drept compoziții farmaceutice, așa cum este descris în cererea de brevet internațional WO 06138181A2. Sunt disponibile o varietate de expuneri privind stabilizarea proteinelor și materialele de formulare și metodele utile în acest sens, cum ar fi Arakawa și colab., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," *Pharm Res.* 8(3): 285-91 (1991); Kendrick și colab., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" în: *RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE*, Carpenter and Manning, ed. *Pharmaceutical Biotechnology*. 13: 61-84 (2002), și Randolph și colab., "Surfactant-protein interactions", *Pharm Biotechnol.* 13: 159-75 (2002), a se vedea în special părțile relevante pentru excipienți și procese ale acestora pentru formulări de proteine auto-tamponante în conformitate cu prezenta invenție, în special în ceea ce privește produsele farmaceutice proteice și procedeele pentru utilizări medicale veterinare și/sau umane.

Sărurile pot fi utilizate în conformitate cu anumite exemple de realizare ale invenției, de exemplu, pentru a ajusta puterea ionică și/sau izotonicitatea unei formulări și/sau pentru a îmbunătăți solubilitatea și/sau stabilitatea fizică a unei proteine sau a altui ingredient al unei compoziții în conformitate cu invenția. După cum se știe, ionii pot stabiliza starea nativă a proteinelor prin legarea la reziduurile încărcate de pe suprafața proteinei și prin protejarea grupărilor încărcate și polare din proteină și prin reducerea rezistenței interacțiunilor lor electrostatice, a interacțiunilor atractive și de respingere. Ionii pot stabiliza, de asemenea, starea denaturată a unei proteine prin legarea, în special, la legăturile peptidice denaturate ($--CONH$) ale proteinei. Mai mult, interacțiunea ionică cu grupările încărcate și polare dintr-o proteină poate reduce, de asemenea, interacțiunile electrostatice intermoleculare și, prin urmare, poate preveni sau reduce agregarea și insolubilitatea proteinelor.

Speciile ionice diferă semnificativ în ceea ce privește efectele lor asupra proteinelor. Au fost dezvoltate mai multe clasificări categorice ale ionilor și efectelor acestora asupra proteinelor, care pot fi utilizate în formularea compozițiilor farmaceutice în conformitate cu invenția. Un exemplu este seria Hofmeister, care clasifică dizolvați ionici și polari neionici prin efectul lor asupra stabilității conformaționale a proteinelor în

soluție. Dizolvații stabilizatori sunt denumiți „kosmotropici”. Dizolvații destabilizanți sunt denumiți „chaotropici”. Kosmotropii sunt utilizați în mod obișnuit la concentrații mari (de ex., >1 molar sulfat de amoniu) pentru a precipita proteinele din soluție ("salifiere"). Chaotropii sunt utilizați în mod obișnuit pentru a denatura și/sau pentru a solubiliza proteinele ("solubilizare salină"). Eficacitatea relativă a ionilor de "salifiere" și "solubilizare salină" definește poziția lor în seria Hofmeister.

Aminoacizii liberi pot fi utilizați în constructul de anticorp al formulărilor din invenție în conformitate cu diferite exemple de realizare ale invenției ca agenți de încărcare, stabilizatori și antioxidanți, precum și alte utilizări standard. Lizina, prolina, serina și alanina pot fi utilizate pentru stabilizarea proteinelor într-o formulare. Glicina este utilă în liofilizare pentru a asigura structura și proprietățile corecte ale turtei. Arginina poate fi utilă pentru a inhiba agregarea proteinelor, atât în formulări lichide, cât și în formulări liofilizate. Metionina este utilă ca antioxidant.

Polioli includ zaharuri, de ex., manitol, zaharoză și sorbitol și alcooli polihidroxilici, cum ar fi, de exemplu, glicerol și propilenglicol și, în scopul discutării aici, polietilenglicol (PEG) și substanțe înrudite. Polioli sunt kosmotropici. Sunt agenți stabilizatori utili atât în formulări lichide, cât și în formulări liofilizate pentru a proteja proteinele de procesele de degradare fizică și chimică. Polioli sunt, de asemenea, utili pentru ajustarea tonicității formulărilor. Printre polioli utili în anumite exemple de realizare ale invenției se numără manitolul, utilizat în mod obișnuit pentru a asigura stabilitatea structurală a turtei în formulările liofilizate. Asigură stabilitatea structurală a turtei. Este utilizat în general cu un lioprotector, de ex., zaharoză. Sorbitolul și zaharoza sunt printre agenții preferați pentru ajustarea tonicității și ca stabilizatori pentru a proteja împotriva tensiunilor de îngheț-dezghet în timpul transportului sau preparării volumelor în timpul procesului de fabricație. Zaharurile reducătoare (care conțin grupări de aldehydă sau cetonă libere), cum ar fi glucoza și lactoza, pot glica reziduuri de lizină și arginină de suprafață. Prin urmare, în general nu se numără printre polioli preferați pentru utilizare în conformitate cu invenția. În plus, zaharurile care formează astfel de specii reactive, cum ar fi zaharoza, care este hidrolizată în fructoză și glucoză în condiții acide și, în consecință, generează glicare, nu sunt, de asemenea, printre polioli preferați ai invenției în acest sens. PEG este util pentru stabilizarea proteinelor și ca crioprotector și poate fi utilizat în invenție în acest sens.

Exemplele de realizare a constructului de anticorp al formulărilor din invenție cuprind în plus surfactanți. Moleculele de proteine pot fi susceptibile la adsorbție pe suprafețe și la denaturare și agregare consecventă la interfețele aer-lichid, solid-lichid și

lichid-lichid. Aceste efecte se amplifică în general invers cu concentrația de proteine. Aceste interacțiuni dăunătoare cresc în general invers cu concentrația de proteine și de obicei sunt exacerbate de agitația fizică, cum ar fi cea generată în timpul transportului și manipulării unui produs. Surfactanții sunt utilizați în mod obișnuit pentru a preveni, minimiza sau reduce adsorbția la suprafață. Surfactanții utili din invenție în această privință includ polisorbat 20, polisorbat 80, alți esteri ai acizilor grași ai polietoxilaților de sorbitan și poloxamer 188. Surfactanții sunt, de asemenea, utilizați în mod obișnuit pentru a controla stabilitatea conformațională a proteinelor. Utilizarea surfactanților în acest sens este specifică proteinelor, deoarece orice surfactant dat va stabiliza de obicei unele proteine și le va destabiliza pe altele.

Polisorbații sunt susceptibili la degradarea oxidativă și adesea, așa cum sunt furnizați, conțin cantități suficiente de peroxizi pentru a provoca oxidarea lanțurilor laterale ale reziduurilor de proteine, în special metionina. În consecință, polisorbații trebuie utilizați cu atenție și, atunci când sunt folosiți, trebuie utilizați la cea mai mică concentrație eficientă. În acest sens, polisorbații exemplifică regula generală conform căreia excipienții trebuie utilizați în concentrațiile lor eficiente cele mai scăzute.

Exemplele de realizare a constructului de anticorp al formulărilor invenției cuprind în plus unul sau mai mulți antioxidanți. Într-o oarecare măsură oxidarea dăunătoare a proteinelor poate fi prevenită în formulările farmaceutice prin menținerea nivelurilor adecvate de oxigen și temperatură ambientală și evitarea expunerii la lumină. Excipienții antioxidanți pot fi folosiți și pentru a preveni degradarea oxidativă a proteinelor. Printre antioxidanții utili în această privință se numără agenții reducători, captatorii de oxigen/radicali liberi și agenții de chelare. Antioxidanții pentru utilizare în formulări de proteine terapeutice în conformitate cu invenția sunt de preferință solubili în apă și își mențin activitatea pe toată durata de valabilitate a unui produs. EDTA este un antioxidant preferat în conformitate cu invenția în acest sens. Antioxidanții pot deteriora proteinele. De exemplu, agenții reducători, cum ar fi glutathionul în special, pot perturba legăturile disulfură intramoleculare. Astfel, antioxidanții pentru utilizare în invenție sunt selectați, printre altele, să elimine sau să reducă suficient posibilitatea de a deteriora proteinele în formulare.

Formulările în conformitate cu invenția pot include ioni metalici care sunt co-factori proteici și care sunt necesari pentru a forma complexe de coordonare a proteinelor, cum ar fi zincul necesar pentru a forma anumite suspensii de insulină. Ionii metalici pot, de asemenea, inhiba unele procese care degradează proteinele. Cu toate acestea, ionii

metalici catalizează și procesele fizice și chimice care degradează proteinele. Ionii de magneziu (10-120 mM) pot fi folosiți pentru a inhiba izomerizarea acidului aspartic în acid izoaspartic. Ionii Ca^{+2} (până la 100 mM) pot crește stabilitatea dezoxiribonucleazei umane. Mg^{+2} , Mn^{+2} , și Zn^{+2} , de altfel, pot destabiliza rhDNaza. În mod similar, Ca^{+2} și Sr^{+2} pot stabiliza Factorul VIII, poate fi destabilizat de Mg^{+2} , Mn^{+2} și Zn^{+2} , Cu^{+2} și Fe^{+2} , iar agregarea sa poate fi crescută de ionii Al^{+3} .

Exemplele de realizare a constructului de anticorp al formulărilor din invenție cuprind în plus unul sau mai mulți conservanți. Conservanții sunt necesari atunci când se dezvoltă formulări parenterale cu doze multiple care implică mai multe extracții din același recipient. Funcția lor principală este de a inhiba creșterea microbiană și de a asigura sterilitatea produsului pe toată durata de valabilitate sau pe durata utilizării produsului medicamentos. Conservanții utilizați în mod obișnuit includ alcool benzilic, fenol și m-crezol. Deși conservanții au o istorie lungă de utilizare cu parenteralele cu molecule mici, dezvoltarea formulărilor de proteine care includ conservanți poate fi o provocare. Conservanții au aproape întotdeauna un efect destabilizator (agregare) asupra proteinelor, iar acest lucru a devenit un factor major în limitarea utilizării lor în formulări de proteine cu doze multiple. Până în prezent, cele mai multe medicamente proteice au fost formulate numai pentru o singură utilizare. Cu toate acestea, atunci când sunt posibile formulări cu mai multe doze, acestea au avantajul suplimentar de a permite confortul pacientului și o comercializare crescută. Un bun exemplu este cel al hormonului de creștere uman (hGH) în care dezvoltarea formulărilor conservate a condus la comercializarea unor prezentări mai convenabile, cu stilou de injecție multi uz. Cel puțin patru astfel de dispozitive stilou care conțin formulări conservate de hGH sunt disponibile în prezent pe piață. Norditropin (lichid, Novo Nordisk), Nutropin AQ (lichid, Genentech) și Genotropin (liofilizat - cartuș cu cameră dublă, Pharmacia & Upjohn) conțin fenol în timp ce Somatropo (Eli Lilly) este formulat cu m-crezol. Mai multe aspecte trebuie luate în considerare în timpul formulării și dezvoltării formelor de dozare conservate. Concentrația eficientă de conservant în produsul medicamentos trebuie optimizată. Acest lucru necesită testarea unui conservant dat sub formă de dozare cu intervale de concentrație care conferă eficacitate antimicrobiană fără a compromite stabilitatea proteinelor.

După cum ar fi de așteptat, dezvoltarea formulărilor lichide care conțin conservanți este mai dificilă decât a formulărilor liofilizate. Produsele liofilizate pot fi liofilizate fără conservant și reconstituite cu un conservant care conține diluant în momentul utilizării. Acest lucru scurtează timpul în care un conservant este în contact cu proteina,

minimizând semnificativ riscurile de stabilitate asociate. Cu formulările lichide, eficacitatea și stabilitatea conservanților trebuie menținute pe întreaga durată de valabilitate a produsului (aproximativ 18 până la 24 de luni). Un punct important de remarcat este că eficacitatea conservantului trebuie demonstrată în formularea finală care conține medicamentul activ și toate componentele de excipient.

Constructele de anticorpi dezvăluite aici pot fi, de asemenea, formulate ca imuno-lipozomi. Un "lipozom" este o veziculă mică compusă din diferite tipuri de lipide, fosfolipide și/sau surfactant, care este utilă pentru livrarea unui medicament la un mamifer. Componentele lipozomului sunt aranjate în mod obișnuit într-o formațiune bistratificată, similară cu aranjamentul lipidic al membranelor biologice. Lipozomii care conțin constructul de anticorp sunt preparați prin metode cunoscute în domeniu, cum sunt cele descrise în Epstein și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. SUA, 82: 3688 (1985); Hwang și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. SUA, 77: 4030 (1980); Brevetele SUA Nr. 4.485.045 și 4.544.545; și WO 97/38731. Lipozomii cu timp de circulație îmbunătățit sunt dezvăluiți în Brevetul SUA Nr. 5.013. 556. Lipozomii deosebit de utili pot fi generați prin metoda de evaporare în fază inversă cu o compoziție lipidică cuprinzând fosfatidilcolină, colesterol și fosfatidiletanolamină derivată de PEG (PEG-PE). Lipozomii sunt extrudați prin filtre cu dimensiunea definită a porilor pentru a produce lipozomi cu diametrul dorit. Fragmentele Fab' ale constructului de anticorp din prezenta invenție pot fi conjugate la lipozomi așa cum este descris în Martin și colab. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) printr-o reacție de schimb de disulfuri. Un agent chimioterapeutic este opțional conținut în lipozom. A se vedea Gabizon și colab. J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

Odată ce compoziția farmaceutică a fost formulată, aceasta poate fi păstrată în flacoane sterile sub formă de soluție, suspensie, gel, emulsie, solid, cristal sau sub formă de pulbere deshidratată sau liofilizată. Astfel de formulări pot fi depozitate fie într-o formă gata de utilizare, fie într-o formă (*de ex.*, liofilizată) care este reconstituită înainte de administrare.

Activitatea biologică a compoziției farmaceutice definită aici poate fi determinată, de exemplu, prin teste de citotoxicitate, așa cum este descris în următoarele exemple, în WO 99/54440 sau de Schlereth și colab. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12). "Eficacitate" sau "eficacitate *in vivo*" așa cum este utilizată aici se referă la răspunsul la terapie prin compoziția farmaceutică a invenției, folosind, de ex., criterii de răspuns NCI standardizate. Succesul sau eficacitatea *in vivo* a terapiei folosind o compoziție farmaceutică a invenției se referă la eficacitatea compoziției pentru scopul propus, *adică*

capacitatea compoziției de a provoca efectul dorit, adică epuizarea celulelor patologice, de ex. celulelor tumorale. Eficacitatea *in vivo* poate fi monitorizată prin metode standard stabilite pentru entitățile bolii respective, incluzând, dar fără a se limita la numărătoarea de globule albe, diferențiale, sortarea celulelor activate prin fluorescență, aspirația măduvei osoase. În plus, pot fi utilizați diferiți parametri chimici clinici specifici bolii și alte metode standard stabilite. În plus, se pot utiliza tomografia asistată de computer, raze X, tomografie prin rezonanță magnetică nucleară (de ex. pentru evaluarea răspunsului pe baza criteriilor Institutului Național al Cancerului [Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Raportul unui grup de lucru internațional pentru standardizarea criteriilor de răspuns pentru limfoamele non-Hodgkin. Grupul de lucru internațional sponsorizat de NCI. J Clin Oncol. 1999 apr;17(4):1244]), scanarea prin tomografie cu emisie de pozitroni, numărarea globulelor albe, diferențiale, sortarea celulelor activate prin fluorescență, aspirația măduvei osoase, biopsiile/histologiile ganglionilor limfatici și diverși parametri de chimie clinică specifici limfomului (de exemplu, lactat dehidrogenază) și alte metode standard stabilite.

O altă provocare majoră în dezvoltarea medicamentelor, cum ar fi compoziția farmaceutică a invenției, este modularea predictibilă a proprietăților farmacocinetice. În acest scop, poate fi stabilit un profil farmacocinetic al medicamentului candidat, adică un profil al parametrilor farmacocinetici care afectează capacitatea unui anumit medicament de a trata o afecțiune dată. Parametrii farmacocinetici ai medicamentului care influențează capacitatea unui medicament de a trata o anumită entitate de boală includ, dar nu se limitează la: timpul de înjumătățire, volumul de distribuție, metabolismul hepatic de prim pasaj și gradul de legare a serului sanguin. Eficacitatea unui medicament dat poate fi influențată de fiecare dintre parametrii menționați mai sus.

"Timp de înjumătățire" înseamnă timpul în care 50% dintr-un medicament administrat sunt eliminate prin procese biologice, de ex. metabolism, excreție etc. Prin "metabolismul hepatic de prim pasaj" se înțelege tendința unui medicament de a fi metabolizat la primul contact cu ficatul, adică în timpul primei sale treceri prin ficat. "Volumul de distribuție" înseamnă gradul de reținere a unui medicament în diferite compartimente ale corpului, cum ar fi de ex. spații intracelulare și extracelulare, țesuturi și organe etc. și distribuția medicamentului în aceste compartimente. "Gradul de legare a serului sanguin" înseamnă tendința unui medicament de a interacționa cu și de a se lega

de proteinele serice din sânge, cum ar fi albumina, ducând la o reducere sau pierdere a activității biologice a medicamentului.

Parametrii farmacocinetici includ, de asemenea, biodisponibilitatea, timpul de întârziere (T_{lag}), T_{max} , ratele de absorbție, concentrație mai mare de debut și/sau C_{max} pentru o anumită cantitate de medicament administrată. "Biodisponibilitate" înseamnă cantitatea de medicament din compartimentul de sânge. "Timp de întârziere" înseamnă întârzierea dintre administrarea medicamentului și detectarea și capacitatea acestuia de a fi măsurat în sânge sau plasmă. " T_{max} " este timpul după care se atinge concentrația maximă în sânge a medicamentului, iar " C_{max} " este concentrația din sânge maxim obținută cu un anumit medicament. Timpul pentru atingerea unei concentrații în sânge sau țesuturi a medicamentului care este necesară pentru efectul său biologic este influențat de toți parametrii. Parametrii farmacocinetici ai constructelor de anticorpi bispecfici care prezintă specificitate între specii, care pot fi determinați în testele preclinice pe animale la primate non-cimpanzeu, așa cum s-a subliniat mai sus, sunt de asemenea prezentați, de ex. în publicația de către Schlereth și colab. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12).

Un exemplu de realizare furnizează constructul de anticorp conform invenției pentru utilizare în prevenirea sau tratamentul unei boli cu tumoare solidă sau a unei boli cu cancer metastatic.

Formulările descrise aici sunt utile drept compoziții farmaceutice în tratamentul, ameliorarea și/sau prevenirea afecțiunii medicale patologice descrise aici la un pacient care are nevoie de aceasta. Termenul "tratament" se referă atât la tratamentul terapeutic, cât și la măsurile profilactice sau preventive. Tratamentul include aplicarea sau administrarea formulării pe corp, un țesut izolat sau o celulă de la un pacient care are o boală/tulburare, un simptom al unei boli/tulburări sau o predispoziție către o boală/tulburare, cu scopul de a trata, vindeca, alina, ușura, modifica, remedia, ameliora, îmbunătăți sau afecta boala, simptomul bolii sau predispoziția spre boală.

Termenul "ameliorare", așa cum este utilizat aici, se referă la orice îmbunătățire a stării de boală a unui pacient care are o tumoare sau cancer sau un cancer metastatic, așa cum este specificat mai jos, prin administrarea unui construct de anticorp conform invenției la un subiect care are nevoie de acesta. O astfel de îmbunătățire poate fi văzută și ca o încetinire sau oprire a progresiei p a tumorii sau a cancerului sau cancerului metastatic al pacientului. Termenul "prevenire", așa cum este utilizat aici, înseamnă evitarea apariției sau reapariției la un pacient care are o tumoare sau cancer sau un

cancer metastatic, așa cum este specificat mai jos, prin administrarea unui construct de anticorp conform invenției la un subiect care are nevoie de aceasta.

Termenul "boală" se referă la orice condiție care ar beneficia de tratamentul cu constructul de anticorp sau compoziția farmaceutică descrisă aici. Aceasta include tulburări sau boli cronice și acute, inclusiv acele condiții patologice care predispun mamiferul la boala în cauză.

Un "neoplasm" este o creștere anormală a țesutului, de obicei, dar nu întotdeauna, formând o masă. Atunci când se formează și o masă, este denumită în mod obișnuit "tumoare". Neoplasmele sau tumorile sau pot fi benigne, potențial maligne (precanceroase) sau maligne. Neoplasmele maligne sunt denumite în mod obișnuit cancer. De obicei, invadează și distrug țesutul înconjurător și pot forma metastaze, adică se răspândesc în alte părți, țesuturi sau organe ale corpului. Prin urmare, termenul "cancer metastatic" cuprinde metastaze la alte țesuturi sau organe decât cel al tumorii originale. Limfoamele și leucemiile sunt neoplasme limfoide. În scopul prezentei invenții, acestea sunt cuprinse, de asemenea, de termenii "tumoare" sau "cancer".

Într-un exemplu de realizare preferat al invenției, boala cu tumoare solidă și boala cu cancer metastatic pot fi derivate din oricare dintre cele de mai sus.

Bolile cu tumoare preferate în legătură cu această invenție sunt selectate dintr-un grup constând din cancer de sân, carcinoid, cancer de col uterin, cancer colorectal, cancer endometrial, cancer gastric, cancer de cap și gât, mezoteliom, cancer de ficat, cancer pulmonar, cancer ovarian, cancer pancreatic, cancer de prostată, cancer de piele, cancer renal și cancer de stomac. Mai preferabil, boala cu tumoare sau cancer, care este de preferință o boală cu tumoare solidă, poate fi selectată din grupul constând din cancer ovarian, cancer pancreatic, mezoteliom, cancer pulmonar, cancer gastric și cancer de sân triplu negativ. Boala cu cancer metastatic poate fi derivată din oricare dintre cele de mai sus.

De asemenea, este dezvăluită o metodă pentru tratamentul sau ameliorarea bolii cu tumoare sau cancer sau a unei boli cu cancer metastatic, cuprinzând etapa de administrare la un subiect care are nevoie de aceasta a constructului de anticorp conform invenției sau a constructului de anticorp produs conform metodei invenției.

Termenii "subiect care are nevoie" sau cei "care au nevoie de tratament" îi includ pe cei care suferă deja de tulburare, precum și pe cei la care tulburarea trebuie să fie prevenită. Subiectul care are nevoie sau "pacient" include subiecți umani și alte mamifere care primesc fie tratament profilactic, fie terapeutic.

Constructul de anticorp conform invenției va fi proiectat în general pentru căi și metode specifice de administrare, pentru doze și frecvențe specifice de administrare, pentru tratamente specifice ale bolilor specifice, cu intervale de biodisponibilitate și persistență, printre altele. Materialele compoziției sunt de preferință formulate în concentrații care sunt acceptabile pentru situsul de administrare.

Formulările și compozițiile pot fi astfel concepute în conformitate cu invenția pentru eliberare prin orice cale de administrare adecvată. În contextul prezentei invenții, căile de administrare includ, dar nu se limitează la acestea

- căi topice (cum ar fi epicutanată, inhalatorie, nazală, oftalmică, auriculară/aurală, vaginală, mucozală);
- căi enterale (cum ar fi orală, gastrointestinală, sublinguală, sublabială, bucală, rectală); și
- căi parenterale (cum ar fi intravenoasă, intraarterială, intraos, intramusculară, intracerebrală, intracerebroventriculară, epidurală, intratecală, subcutanată, intraperitoneală, extra-amniotică, intraarticulară, intracardiacă, intradermică, intralezională, intrauterină, intravezicală, intravitreală, transdermică, intranazală, transmucozală, intrasinovială, intraluminală).

Compozițiile farmaceutice și constructul de anticorp din această invenție sunt deosebit de utile pentru administrare parenterală, de ex., administrare subcutanată sau intravenoasă, de exemplu prin injectare, cum ar fi injecția în bolus sau prin perfuzie, cum ar fi perfuzia continuă. Compozițiile farmaceutice pot fi administrate folosind un dispozitiv medical. Exemple de dispozitive medicale pentru administrarea compozițiilor farmaceutice sunt descrise în Brevetele SUA Nr. 4.475.196; 4.439.196; 4.447.224; 4.447.233; 4.486.194; 4.487.603; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 5.064.413; 5.312.335; 5.312.335; 5.383.851; și 5.399.163.

În special, prezenta invenție asigură o administrare neîntreruptă a compoziției adecvate. Ca exemplu nelimitativ, administrarea neîntreruptă sau substanțial neîntreruptă, *adică* continuă, poate fi realizată printr-un mic sistem de pompare purtat de pacient pentru măsurarea afluxului de agent terapeutic în corpul pacientului. Compoziția farmaceutică care cuprinde constructul de anticorp conform invenției poate fi administrată prin utilizarea respectivelor sisteme de pompare. Astfel de sisteme de pompare sunt în general cunoscute în domeniu și se bazează în mod obișnuit pe schimbul periodic de cartușe care conțin agentul terapeutic care trebuie perfuzat. Când se schimbă cartușul într-un astfel de sistem de pompare, poate apărea o întrerupere temporară a fluxului de

altfel neîntrerupt al agentului terapeutic în corpul pacientului. Într-un astfel de caz, faza de administrare anterioară înlocuirii cartușului și faza de administrare care urmează înlocuirii cartușului ar fi totuși luate în considerare în sensul mijloacelor farmaceutice și metodelor conform invenției care alcătuiesc împreună o "administrare neîntreruptă" a unui astfel de agent terapeutic.

Administrarea continuă sau neîntreruptă a constructelor de anticorpi conform invenției poate fi intravenoasă sau subcutanată prin intermediul unui dispozitiv de livrare a fluidului sau a unui mic sistem de pompare incluzând un mecanism de antrenare a fluidului pentru antrenarea fluidului dintr-un rezervor și un mecanism de acționare pentru acționarea mecanismului de antrenare. Sistemele de pompare pentru administrare subcutanată pot include un ac sau o canulă pentru penetrarea pielii unui pacient și livrarea compoziției adecvate în corpul pacientului. Respectivile sisteme de pompare pot fi fixate sau atașate direct la pielea pacientului independent de o venă, arteră sau un vas de sânge, permițând astfel un contact direct între sistemul de pompare și pielea pacientului. Sistemul de pompare poate fi atașat la pielea pacientului timp de 24 de ore până la câteva zile. Sistemul de pompare poate fi de dimensiuni mici, cu un rezervor pentru volume mici. Ca exemplu nelimitativ, volumul rezervorului pentru compoziția farmaceutică adecvată, care trebuie administrată, poate fi între 0,1 și 50 ml.

Administrarea continuă poate fi, de asemenea, transdermică prin intermediul unui plastru purtat pe piele și înlocuit la intervale. Un specialist în domeniu este conștient de sistemele de plasturi pentru livrarea de medicamente adecvate în acest scop. Este de remarcat faptul că administrarea transdermică este deosebit de susceptibilă de administrare neîntreruptă, deoarece schimbul unui prim plastru epuizat poate fi realizat în mod avantajos simultan cu amplasarea unui nou, al doilea plastru, de exemplu pe suprafața pielii imediat adiacentă primului plastru epuizat, și imediat înainte de îndepărtarea primului plastru epuizat. Nu apar probleme de întrerupere a fluxului sau de defectare a celulei de alimentare.

În cazul în care compoziția farmaceutică a fost liofilizată, materialul liofilizat este mai întâi reconstituit într-un lichid adecvat înainte de administrare. Materialul liofilizat poate fi reconstituit în, de ex., apă bacteriostatică pentru preparate injectabile (BWFI), soluție salină fiziologică, soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) sau aceeași formulare în care se afla proteina înainte de liofilizare.

Compozițiile din prezenta invenție pot fi administrate subiectului într-o doză adecvată care poate fi determinată de ex. prin studii de creștere a dozei prin

administrarea de doze crescând din constructul de anticorp conform invenției care prezintă specificitate între specii descrisă aici pentru primatele non-cimpanzei, de exemplu macaci. Așa cum s-a arătat mai sus, constructul de anticorp conform invenției care prezintă specificitatea între specii descrisă aici poate fi utilizat în mod avantajos în formă identică în testarea preclinică la primatele non-cimpanzei și ca medicament la om. Regimul de dozare va fi determinat de medicul curant și de factorii clinici. Așa cum este bine-cunoscut în domeniul medical, dozele pentru orice pacient depind de mulți factori, inclusiv dimensiunea pacientului, suprafața corpului, vârsta, compusul specific care trebuie administrat, sexul, timpul și calea de administrare, starea generală de sănătate și alte medicamente care sunt administrate concomitent.

Termenul "doză eficientă" sau "dozaj eficient" este definit ca o cantitate suficientă pentru a obține sau cel puțin a obține parțial efectul dorit. Termenul "doză eficientă terapeutic" este definit ca o cantitate suficientă pentru a vindeca sau cel puțin a stopa parțial boala și complicațiile acesteia la un pacient care suferă deja de boală. Cantitățile sau dozele eficiente pentru această utilizare vor depinde de condiția de tratat (indicația), de constructul de anticorp livrat, de contextul terapeutic și obiective, de severitatea bolii, de terapia anterioară, de istoricul clinic al pacientului și de răspunsul la agentul terapeutic, calea de administrare, dimensiunea (greutatea corpului, suprafața corpului sau dimensiunea organului) și/sau starea (vârsta și starea generală de sănătate) a pacientului și starea generală a sistemului imunitar propriu al pacientului. Doza adecvată poate fi ajustată în funcție de judecata medicului curant astfel încât să poată fi administrată pacientului o dată sau într-o serie de administrări și pentru a obține efectul terapeutic optim.

O doză tipică poate varia de la aproximativ 0,1 $\mu\text{g/kg}$ până la aproximativ 30 mg/kg sau mai mult, în funcție de factorii menționați mai sus. În exemple de realizare specifice, doza poate varia de la 1,0 $\mu\text{g/kg}$ până la aproximativ 20 mg/kg , opțional de la 10 $\mu\text{g/kg}$ până la aproximativ 10 mg/kg sau de la 100 $\mu\text{g/kg}$ până la aproximativ 5 mg/kg .

O cantitate eficientă terapeutic dintr-un construct de anticorp conform invenției are ca rezultat, de preferință, o scădere a severității simptomelor bolii, o creștere a frecvenței sau duratei perioadelor fără simptome ale bolii sau o prevenire a afectării sau dizabilității cauzate de boală. Pentru tratarea tumorilor care exprimă MSLN, o cantitate eficientă terapeutic din constructul de anticorp conform invenției, de ex. un construct de anticorp anti-MSLN/anti-CD3, de preferință inhibă creșterea celulară sau creșterea tumorii cu cel puțin aproximativ 20%, cel puțin aproximativ 40%, cel puțin aproximativ 50%, cel puțin

aproximativ 60%, cel puțin aproximativ 70%, la cel puțin aproximativ 80%, sau cel puțin aproximativ 90% față de pacienții netratați. Capacitatea unui compus de a inhiba creșterea tumorii poate fi evaluată într-un model animal predictiv al eficacității în tumorile umane.

Compoziția farmaceutică poate fi administrată ca unic agent terapeutic sau în combinație cu terapii suplimentare, cum ar fi terapiile anti-cancer, după cum este necesar, de ex. alte medicamente proteice și neproteice. Aceste medicamente pot fi administrate simultan cu compoziția care cuprinde constructul de anticorp conform invenției așa cum este definit aici sau separat înainte sau după administrarea respectivului construct de anticorp la intervale și doze definite în timp util.

Termenul "doză eficientă și netoxică", așa cum este utilizat aici, se referă la o doză tolerabilă dintr-un construct de anticorp inventiv care este suficient de mare pentru a provoca epuizarea celulelor patologice, eliminarea tumorii, contracția tumorii sau stabilizarea bolii fără sau în esență fără efecte toxice majore. Astfel de doze eficiente și netoxice pot fi determinate de exemplu prin studii de creștere a dozei descrise în stadiul tehnicii și ar trebui să fie sub doza care să inducă efecte adverse severe (toxicitate care limitează doza, DLT).

Termenul "toxicitate" așa cum este utilizat aici se referă la efectele toxice ale unui medicament manifestate în efecte adverse sau efecte adverse severe. Aceste efecte secundare se pot referi la o lipsă de tolerabilitate a medicamentului în general și/sau o lipsă de toleranță locală după administrare. Toxicitatea poate include, de asemenea, efecte teratogene sau cancerigene cauzate de medicament.

Termenul "siguranță", "siguranță *in vivo*" sau "tolerabilitate", așa cum este utilizat aici, definește administrarea unui medicament fără a induce efecte adverse severe direct după administrare (toleranță locală) și pe o perioadă mai lungă de aplicare a medicamentului. "Siguranța", "siguranța *in vivo*" sau "tolerabilitatea" pot fi evaluate, de ex., la intervale regulate în timpul perioadei de tratament și de urmărire. Măsurătorile includ evaluarea clinică, de ex. manifestări ale organelor și screeningul anomaliilor de laborator. Se poate efectua evaluarea clinică și se pot înregistra/codifica abateri la constatările normale în conformitate cu standardele NCI-CTC și/sau MedDRA. Manifestările organelor pot include criterii, cum ar fi alergii/imunologie, sânge/măduvă osoasă, aritmie cardiacă, coagulare și altele asemenea, așa cum este stabilit de ex. în Criteriile terminologice comune pentru efecte adverse v3.0 (CTCAE). Parametrii de laborator care pot fi testați includ, de exemplu, hematologia, chimia clinică, profilul de

coagulare și analiza urinei și examinarea altor fluide corporale precum ser, plasmă, lichid limfoid sau spinal, seroase și altele asemenea. Siguranța poate fi astfel evaluată de ex. prin examinare fizică, tehnici imagistice (adică ultrasunete, raze X, scanări CT, imagistică prin rezonanță magnetică (RMN), alte măsuri cu dispozitive tehnice (adică electrocardiogramă), semne vitale, prin măsurarea parametrilor de laborator și înregistrarea efectelor adverse. De exemplu, efectele adverse la primatele non-cimpanzeu în utilizările și metodele conform invenției pot fi examinate prin metode histopatologice și/sau histochimice.

Se face referire și la termenii de mai sus, *de ex.* în Evaluarea preclinică a siguranței produselor farmaceutice derivate din biotehnologie S6; Ghid tripartit armonizat ICH; Întâlnirea Comitetului Director al ICH din 16 iulie 1997.

Într-un alt exemplu de realizare, invenția furnizează un kit care cuprinde un construct de anticorp conform invenției și/sau o celulă gazdă a invenției.

În contextul prezentei invenții, termenul "kit" înseamnă două sau mai multe componente - dintre care una corespunzând constructului de anticorp, compoziției farmaceutice, vectorului sau celulei gazdă a invenției - ambalate împreună într-o cutie, un recipient sau în alt fel. Prin urmare, un kit poate fi descris ca un set de produse și/sau ustensile care sunt suficiente pentru a atinge un anumit obiectiv, care poate fi comercializat ca o singură unitate.

Kitul poate cuprinde unul sau mai multe recipiente (cum ar fi flacoane, fiole, recipiente, seringi, sticle, pungi) de orice formă, dimensiune și material adecvate (de preferință impermeabile, *de ex.* plastic sau sticlă) care conține constructul de anticorp sau compoziția farmaceutică a prezentei invenții într-o doză adecvată pentru administrare (a se vedea mai sus). Kitul poate conține în plus instrucțiuni de utilizare (*de ex.* sub forma unui prospect sau manual de instrucțiuni), mijloace pentru administrarea constructului de anticorp conform prezentei invenții, cum ar fi o seringă, pompă, un perfuzor sau altele asemenea, mijloace pentru reconstituirea constructului de anticorp conform invenției și/sau mijloace pentru diluarea constructului de anticorp conform invenției.

Invenția furnizează, de asemenea, kituri pentru o unitate de administrare cu doză unică. Kitul conform invenției poate conține, de asemenea, un prim recipient care cuprinde un construct de anticorp uscat/liofilizat și un al doilea recipient care cuprinde o formulare apoasă. În anumite exemple de realizare ale acestei invenții, sunt furnizate kituri care conțin seringi preumplute cu o singură cameră și cu mai multe camere (*de ex.*, seringi cu lichid și lioseringi).

Figurile arată:**Figura 1:**

Reprezentare schematică a himerei MSLN umană-șoarece. Himerele MSLN au fost generate cu 6 schimburi distincte de întindere de secvență de la MSLN umană la MSLN de șoarece. Variantele respective au fost exprimate pe suprafața clonelor de celule CHO (E1-E6). A se vedea Exemplul 1.

Figura 2

Reactivitatea încrucișată a constructelor de anticorpi anti-MSLN detectate prin citometrie în flux: legarea la MSLN și CD3 umane și de macac. A se vedea Exemplul 4.

Figura 3

Analiza constructelor de anticorpi anti-MSLN prin citometrie în flux: legarea la variantele umane v2 și v6. A se vedea Exemplul 4.

Figura 4

Potența constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 în redirecționarea celulelor T efectoare CD8+ umane stimulate împotriva celulelor CHO transfectate cu MSLN umană a fost măsurată într-un test de eliberare a ^{51}Cr de 18 ore (raport efector-țintă 10:1).

Figura 5

Potența constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 în redirecționarea celulelor T efectoare CD8+ umane stimulate împotriva OVCAR-8 pozitiv la MSLN a fost măsurată într-un test de eliberare a ^{51}Cr de 18 ore (raport efector-țintă 10:1).

Figura 6

Potența constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 în redirecționarea celulelor T în PBMC umane nestimulate ($\text{CD14}^-/\text{CD56}^+$) împotriva celulelor CHO transfectate cu MSLN umană în absența și prezența MSLN solubile a fost măsurată într-un test de citotoxicitate bazat pe FACS de 48 de ore (raport efector-țintă 10:1).

Figura 7

Potența constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 în redirecționarea celulelor T în PBMC umane nestimulate ($\text{CD14}^-/\text{CD56}^+$) împotriva liniei de celule umane MSLN pozitive OVCAR-8 a fost măsurată într-un test de citotoxicitate bazat pe FACS de 48 de ore.

Figura 8

Confirmarea constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 cu reactivitate încrucișată sunt capabile să redirecționeze celulele T de macac împotriva celulelor CHO transfectate cu MSLN de macac, un test de citotoxicitate bazat pe FACS de 48 de ore a fost efectuat cu o linie de celule T de macac LnPx4119 ca celule T efectoare (raport efector-țintă 10:1).

Figura 9

Diferența de potență dintre izoformele monomerice și dimerice ale constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 în redirecționarea celulelor T în celulele T efectoare CD8+ umane stimulate împotriva celulelor CHO umane transfectate cu MSLN a fost măsurată într-un test de eliberare a ^{51}Cr de 18 ore (raport efector-țintă 10:1).

Figura 10

Stabilitatea constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 după incubare timp de 96 de ore în plasmă umană. Test pe bază de ^{51}Cr de 18 ore. Celule efectoare: celule T CD8 umane îmbogățite stimulate. Celule țintă: celule CHO transfectate cu MSLN umană. Raportul dintre celula efector și țintă (E:T): 10:1. Proteina BiTE așa cum este indicat.

Figura 11

Omogenitatea proteinei constructelor de anticorpi ale invenției analizată prin cromatografie cu schimb de cationi de înaltă rezoluție CIEX

Figura 12

Hidrofobicitatea de suprafață a constructelor de anticorpi bispecfici din invenție testată prin cromatografie de interacțiune hidrofobă HIC în modul flux

Figura 13

Conversia monomer în dimer după trei cicluri de îngheț/dezgheț.

Figura 14

Conversia monomer în dimer după 7 zile de incubare la 250 $\mu\text{g/ml}$

Figura 15: Evaluarea activării celulelor T independente de țintă prin constructe de anticorpi HLE BiTE[®] mezotelină (MS). 2(a) construct de anticorp conform invenției în testul de activare de 48 de ore cu PBMC umane (3x); diluții în serie HLE BiTE[®] (inițial 20 nM; 1:5, 7x+martor); fără sau cu blocarea FcR [10 mg/ml hulgG (Kiovog, Baxter)]; Măsurarea FACS a exprimării CD69 și CD25 [nu este prezentată] pe celulele T D4⁺, CD8⁺. 2(b) construct de anticorp hetero-Fc în testul de activare de 48 de ore cu PBMC umane și PBMC epuizate de celule

CD14⁺/CD33⁺ (3x); diluții în serie HLE BiTE[®] (inițial 20 nM; 1:5, 7x+martor); Măsurarea FACS a exprimării CD69 și CD25 [nu este prezentată] pe celulele T D4⁺, CD8⁺.

Figura 16: Evaluarea activării celulelor T independente de țintă prin constructe de anticorpi HLE BiTE[®] CDH19. 3(a) construct de anticorp conform invenției în testul de activare de 48 de ore cu PBMC umane (3x); diluții în serie HLE BiTE[®] (inițial 20 nM; 1:5, 7x+martor); fără sau cu blocarea FcR [10 mg/mL hulG (Kiovog, Baxter)]; Măsurarea FACS a exprimării CD69 și CD25 [nu este prezentată] pe celulele T D4⁺, CD8⁺. 3(b) construct de anticorp hetero-Fc în testul de activare de 48 de ore cu PBMC umane și PBMC epuizate de celule CD14⁺/CD33⁺ (3x); diluții în serie HLE BiTE[®] (inițial 20 nM; 1:5, 7x+martor); Măsurarea FACS a exprimării CD69 și CD25 [nu este prezentată] pe celulele T D4⁺, CD8⁺. 3(c) construct de anticorp X în testul de activare de 48 de ore cu PBMC umane și PBMC epuizate de celule CD14⁺/CD33⁺ (3x); diluții în serie HLE BiTE[®] (inițial 20 nM; 1:5, 7x+martor); Măsurarea FACS a exprimării CD69 și CD25 [nu este prezentată] pe celulele T D4⁺, CD8⁺.

Figura 17: Legarea complementului C1q a constructelor de anticorpi de fuziune Fc BiTE[®]. Constructele de anticorpi de fuziune Fc BiTE[®] (Fc BiTE[®] cu lanț unic (triunghi), Fc BiTE[®] hetero (pătrate), BiTE[®] canonic (cerc)) au fost acoperite pe o placă Maxisorp (în serii de diluție), înainte de incubarea cu ser uman combinat și de incubarea cu anticorpul murin policlonal anti-CC1q uman, vizualizat cu conjugatul Fc-AP anti-șoarece de capră.

Figura 18: Profilurile PK medii ale patru perechi de proteine de fuziune BiTE[®]-HLE după administrarea unei singure doze la maimuțele cynomolgus. Din motive de comparabilitate, concentrațiile serice au fost normalizate în funcție de doză la 15 μg/kg și indicate în nmol.

Figura 19: Profilurile PK medii ale cinci constructe diferite de anticorpi BiTE[®], fiecare fuzionat la un fragment de extindere a timpului de înjumătățire al scFc. Din motive de comparabilitate, concentrațiile serice au fost normalizate în funcție de doză la 15 μg/kg și indicate în nmol.

Exemple:

Următoarele exemple ilustrează invenția. Aceste exemple nu ar trebui interpretate ca limitând cadrul acestei invenții. Prezenta invenție este limitată numai de revendicări.

Exemplul 1

Generarea de celule CHO care exprimă MSLN de tip sălbatic și himerică

Antigenul MSLN poate fi subdivizat în șase subdomenii sau regiuni diferite care sunt definite, în scopurile exemplurilor 1 și 2. Secvența aa a acestor șase subdomenii este descrisă în SECV ID NR: 238-243.

Au fost generate următoarele molecule; a se vedea și Figura 1:

• hu orl MSLN-E1 mu	SECV ID NR: 246
• hu orl MSLN-E2 mu	SECV ID NR: 247
• hu orl MSLN-E3 mu	SECV ID NR: 248
• hu orl MSLN-E4 mu	SECV ID NR: 249
• hu orl MSLN-E5 mu	SECV ID NR: 250
• hu orl MSLN-E6 mu	SECV ID NR: 251
• hu orl MSLN- complet umană	SECV ID NR: 231

Pentru generarea de celule CHO care exprimă MSLN umană, de macac cynomolgus ("cyno") și umană trunchiată marcată N-terminal V5 , secvențele de codificare respective pentru MSLN umană (SEQ ID NR: 231; a se vedea, de asemenea, numărul de acces GeneBank NM_005823), cyno MSLN (SECV ID NR: 234, a se vedea LMR C52457) și cele șase versiuni MSLN umană/murină himerice (a se vedea mai sus) au fost donate într-o plasmidă denumită pEF-DHFR (pEF-DHFR este descrisă în Raum și colab. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150). Pentru exprimarea la suprafața celulară a MSLN umană și cyno a fost utilizată peptida semnal inițială. Toate procedurile de clonare au fost efectuate conform protocoalelor standard (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, ediția a 3-a, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001)). Pentru fiecare construct, o plasmidă corespunzătoare a fost transfectată în celule CHO cu deficit de DHFR pentru exprimarea eucariotă, așa cum este descris de Kaufman R.J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566. Exprimarea MSLN umană, himerică și cyno pe celulele CHO a fost verificată într-un test FACS utilizând un anticorp monoclonal de șoarece IgG2b anti-MSLN umană. Drept control negativ, celulele au fost incubate cu anticorp de control izotip în locul primului anticorp. Probele au fost măsurate prin citometrie în flux.

Exemplul 2

Cartografierea epitopilor constructelor de anticorpi anti-MSLN

Celulele transfectate cu molecule MSLN umană și MSLN umană himerică (a se vedea Exemplul 1) au fost colorate cu extract periplasmic brut, nediluat, care conține constructe de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 (cu domeniul de legare CD3 fiind denumit I2C) fuzionat cu o albumină umană (varianta 1), în PBS/1,5%FCS. Moleculele legate au fost detectate cu un anticorp monoclonal de șoarece anti-CD3 cu domeniu de legare (50 μ l) urmat de un IgG anti-șoarece Fc-gamma-PE (1:100, 50 μ l; Jackson ImmunoResearch # 115-116-071) Toți anticorpilor au fost diluați în PBS/1,5% FCS. Drept control negativ, celulele au fost incubate cu PBS/2% FCS în locul extractului periplasmatic. Probele au fost măsurate prin citometrie în flux.

Regiunile care au fost recunoscute de domeniile de legare MSLN respective sunt indicate în tabelul de secvențe (Tabelul 2). Pierderea semnalului FACS în constructele MSLN himerice respective care cuprind clusterul de epitopi murin a fost citită pentru relevanța clusterului respectiv pentru legare. În cazul în care semnalul FACS a fost afectat negativ pentru mai mult de una, respectiv două clone MSLN himerică, s-a ajuns la concluzia că ambele clusteruri sunt relevante.

Tabelul 2: Cartografierea clusterelor de epitopi pentru MS-1 până la MS-8

Cluster de epitopi	Liant
E 1+2	MS-1
E 2+3	MS-2
E 2+3	MS-3
E 2+3	MS-4
E 2+3	MS-5
E 2+3	MS-6
E 4	MS-7
E 1+2	MS-8

Exemplul 3

Analiza Scatchard a afinității constructului de anticorp bispecific MSLNxCD3 pentru MSLN umană și de macac pe celulele pozitive la antigenul țintă și determinarea diferenței de afinitate interspecii

Afinitățile constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 pentru celulele CHO transfectate cu MSLN umană sau de macac au fost, de asemenea, determinate prin analiza Scatchard ca metoda cea mai fiabilă pentru măsurarea decalajelor de afinitate potențiale dintre MSLN umană și de macac. Pentru analiza Scatchard, experimentele de legare la saturați sunt efectuate folosind un sistem de detectare monovalentă pentru a determina cu precizie legarea monovalentă a constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 la linia celulară respectivă.

2×10^4 celule din linia celulară respectivă (linia celulară CHO cu exprimare MSLN umană recombinantă, linia celulară CHO cu exprimare MSLN de macac recombinantă) au fost incubate fiecare cu câte 50 μ l dintr-o serie de diluții triplete (douăsprezece diluții la 1:2) ale respectivului construct de anticorp bispecific MSLNxCD3 (până la atingerea saturației), începând de la 10-20 nM, urmate de o incubare de 16 ore la 4°C sub agitare și o etapă de spălare reziduală. Apoi, celulele au fost incubate încă o oră cu 30 μ l dintr-o soluție conjugată CD3xALEXA488. După o etapă de spălare, celulele au fost resuspendate în 150 μ l de soluție tampon FACS conținând 3,5 % formaldehidă, incubate timp de încă 15 minute, centrifugate, resuspendate în soluție tampon FACS și analizate cu ajutorul unui aparat FACS Cantoll și al software-ului FACS Diva. Datele au fost generate din două seturi independente de experimente, fiecare folosind triplicate. Analiza Scatchard respectivă a fost calculată pentru a extrapola legarea maximă (B_{max}). Concentrațiile de constructe de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 la legarea a jumătate din maxim au fost determinate reflectând KD-urile respective. Valorile măsurătorilor triplicate au fost reprezentate grafic sub formă de curbe hiperbolice și sub formă de curbe în formă de S pentru a demonstra variații de concentrație adecvate de la legarea minimă la cea optimă.

Valorile prezentate în Tabelul 3 au fost derivate din două experimente independente per construct de anticorp bispecific MSLNxCD3. Analiza Scatchard pe bază de celule a confirmat că constructele de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 ale invenției sunt subnanomolare în afinitatea pentru MSLN umană și MSLN de macac și prezintă un mic decalaj de afinitate interspecie cyno/umană de aproximativ 1.

Tabelul 3: Afinitățile (KD) ale constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 așa cum au fost determinate în analiza Scatchard bazată pe celule cu decalajul de afinitate calculat KD MSLN de macac / KD MSLN umană. Constructele de anticorpi au fost măsurate în două experimente independente, fiecare folosind triplicate.

Anticorp BiTE MS × I2C-HALB	Afinitate bazată pe celule MSLN* um [nM]	Afinitate bazată pe celule MSLN* mac [nM]	Decalaj de afinitate MSLN KD ^{mac} / KD ^{um}
MS-1	1,25 ± 0,8	13,86 ± 2,9	11,08
MS-8	4,68 ± 0,4	85,86 ± 16,7	18,35
MS-2	1,40 ± 0,9	10,16 ± 3,5	7,28
MS-3	0,74 ± 0,8	0,82 ± 0,5	1,12
MS-4	0,91 ± 1,0	0,77 ± 0,7	0,85
MS-5	0,39 ± 0,3	2,31 ± 3,7	5,91
MS-6	0,60 ± 0,3	9,03 ± 3,7	15,04
MS-7	1,06 ± 0,5	4,07 ± 1,0	3,86

Exemplul 4

Legare bispecifică și reactivitate încrucișată între specii

Pentru confirmarea legării la MSLN și CD3 umană și la MSLN și CD3 cyno, constructele de anticorpi bispecifici ale invenției au fost testate prin citometrie în flux folosind

- celule CHO transfectate cu MSLN umană, cu izoforma MSLN umană (NM_013404=SECV ID NR:232 și AY743922=SECV ID NR:233), respectiv cu MSLN de macac,
- linie celulară umană pozitivă la MSLN umană OVCAR-8,
- linie de celule de leucemie cu celule T umane care exprimă CD3 HPB-all (DSMZ, Braunschweig, ACC483) și
- linie de celule T care exprimă CD3 cynomolgus LnPx 4119

Pentru citometria în flux, 200.000 de celule din liniile celulare respective au fost incubate timp de 60 min la 4°C cu 50 µl de construct de anticorp bispecific purificat la o concentrație de 5 µl/ml. Celulele au fost spălate de două ori în PBS/2% FCS și apoi incubate cu un anticorp intern de șoarece (2 µg/ml) specific pentru partea de legare CD3 a constructelor de anticorpi bispecifici timp de 30 de minute la 4°C. După spălare, anticorpii de șoarece legați au fost detectați cu un Fcy-PE anti-șoarece de capră (1:100)

timp de 30 de minute la 4°C. Probele au fost măsurate prin citometrie în flux. Celulele CHO netransfectate au fost utilizate ca martor negativ.

Rezultatele sunt prezentate în figurile 2 și 3. Constructele de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 ale invenției au colorat celulele CHO transfectate cu MSLN umană, izoforma MSLN artificială și cu MSLN cyno și, de asemenea, au colorat linia de celule umane pozitive pentru MSLN umană OVCAR-8 (expresor natural). Liniile de celule T umane și cyno care exprimă CD3 au fost, de asemenea, recunoscute de constructele de anticorpi bispecfici. Mai mult, nu a existat nicio colorare a celulelor de control negativ (CHO netransfectate).

Exemplul 5

Activitate citotoxică

Potența constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 ale invenției de a redirecționa celulele T efectoare împotriva celulelor țintă care exprimă MSLN a fost analizată în cinci teste de citotoxicitate *in vitro*:

- Potența constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 de a redirecționa celulele T efectoare CD8+ umane stimulate împotriva celulelor CHO transfectate cu MSLN umană a fost măsurată într-un test de eliberare a ^{51}Cr de 18 ore (raport efector-țintă 10:1). Figura 4 și Tabelul 4

- Potența constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 de a redirecționa celulele T efectoare CD8+ umane stimulate împotriva liniei celulare pozitive la MSLN OVCAR-8 a fost măsurată într-un test de eliberare a ^{51}Cr de 18 ore (raport efector-țintă 10:1). Figura 5 Tabelul 5

- Potența constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 de a redirecționa celulele T în PBMC umane nestimulate (CD14⁻/CD56⁻) împotriva celulelor CHO transfectate cu MSLN umană în absența și prezenta MSLN solubile a fost măsurată într-un test de citotoxicitate bazat pe FACS de 48 ore (raport efector-țintă 10:1). Figura 6 și Tabelul 6

- Potența constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 de a redirecționa celulele T în PBMC umane nestimulate (CD14⁻/CD56⁻) împotriva liniei celulare umane pozitive la MSLN OVCAR-8 a fost măsurată într-un test de citotoxicitate bazat pe FACS de 48 ore. Figura 7

- Pentru confirmarea faptului că constructele de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 cu reactivitate încrucișată sunt capabile să redirecționeze celulele T de macac împotriva celulelor CHO transfectate cu MSLN de macac, a fost efectuat

un test de citotoxicitate bazat pe FACS timp de 48 de ore cu o linie de celule T de macac LnPx4119 ca celule T efectoare (raport efector-țintă 10:1). Figura 8

- Diferența de potență dintre izoformele monomerice și dimerice ale constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 în redirectionarea celulelor T din celulele T efectoare CD8⁺ umane stimulate împotriva celulelor CHO transfectate cu MSLN umană a fost măsurată într-un test de eliberare a ⁵¹Cr de 18 ore (raport efector-țintă 10:1). Figura 9

Exemplul 5.1

Test de eliberare a cromului cu celule T umane stimulate

Celule T stimulate îmbogățite pentru celule T CD8⁺ au fost obținute așa cum este descris în cele ce urmează. Un vas Petri (145 mm diametru, Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster) a fost acoperit cu un anticorp specific anti-CD3 disponibil comercial (OKT3, Orthoclone) într-o concentrație finală de 1 μg/ml timp de 1 oră la 37°C. Proteina nelegată a fost îndepărtată printr-o etapă de spălare cu PBS. 3-5 × 10⁷ PBMC umane au fost adăugate la vasul Petri preacoperit în 120 ml de RPMI 1640 cu glutamină stabilizată / 10% FCS / IL-2 20 U/ml (Proleukin®, Chiron) și stimulate timp de 2 zile. În a treia zi, celulele au fost colectate și spălate o dată cu RPMI 1640. IL-2 a fost adăugat la o concentrație finală de 20 U/ml și celulele au fost cultivate din nou timp de o zi în același mediu de cultură celulară ca mai sus. Limfocitele T citotoxice (CTL) CD8⁺ au fost îmbogățite prin epuizarea celulelor T CD4⁺ și celulelor NK CD56⁺ folosind Dynal-Beads conform protocolului producătorului. Celulele țintă CHO transfectate cu MSLN cyno sau MSLN umană au fost spălate de două ori cu PBS și marcate cu 11,1 MBq ⁵¹Cr într-un volum final de 100 μl RPMI cu 50% FCS timp de 60 de minute la 37°C. Ulterior, celulele țintă marcate au fost spălate de 3 ori cu 5 ml RPMI și apoi utilizate în testul de citotoxicitate. Testul a fost efectuat într-o placă cu 96 de godeuri într-un volum total de 200 μl RPMI suplimentat cu un raport E:T de 10:1. S-a utilizat o concentrație inițială de 0,01 - 1 μg/ml de construct de anticorp bispecific purificat și diluții de trei ori ale acestuia. Timpul de incubație pentru test a fost de 18 ore. Citotoxicitatea a fost determinată ca valori relative ale cromului eliberat în supernatant în raport cu diferența de liză maximă (adăugarea de Triton-X) și liză spontană (fără celule efectoare). Toate măsurătorile au fost efectuate în patru exemplare. Măsurarea activității cromului în supernatanți a fost efectuată într-un contor gamma Wizard 3" (Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Köln, Germania). Analiza rezultatelor a fost efectuată cu Prism 5 pentru Windows (versiunea 5.0, GraphPad Software Inc., San Diego, California, SUA). Valorile CE50 calculate prin

programul de analiză din curbele sigmoide de răspuns la doză au fost utilizate pentru compararea activității citotoxice.

Exemplul 5.2

Potența de redirecționare a celulelor T efectoare umane stimulate împotriva celulelor CHO transfectate cu MSLN umană

Activitatea citotoxică a constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 conform invenției a fost analizată într-un test de citotoxicitate cu eliberare de 51-crom (^{51}Cr) folosind celule CHO transfectate cu MSLN umană ca celule țintă și celule T CD8+ umane stimulate ca celule efectoare. Experimentul a fost realizat așa cum este descris în Exemplul 8.1.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 4. Constructele de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 au arătat o activitate citotoxică foarte puternică împotriva celulelor CHO transfectate cu MSLN umană în intervalul picomolar cu 1 cifră.

Tabelul 4: Valorile CE50 [pM] ale constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 analizate într-un test de citotoxicitate cu eliberare de 51-crom (^{51}Cr) folosind celule CHO transfectate cu MSLN umană ca celule țintă și celule T CD8 umane stimulate ca celule efectoare.

BiTE × I2C-HALB	EC50 [pM]
MS 1	1,5
MS 8	6,5
MS 2	2,0
MS 3	0,2
MS 4	0,1
MS 5	0,2
MS 6	0,5
MS 7	6,0

Exemplul 5.3

Potența de redirecționare a celulelor T efectoare umane stimulate împotriva liniei celulare umane MSLN-pozitive OVCAR-8

Activitatea citotoxică a constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 a fost analizată într-un test de citotoxicitate cu eliberare de 51-crom (^{51}Cr) utilizând linia celulară umană MSLN-pozitivă OVCAR-8 ca sursă de celule țintă și celulele T CD8+ umane stimulate ca celule efectoare. Testul a fost efectuat așa cum este descris în Exemplul 8.1.

În conformitate cu rezultatele testelor de eliberare de 51-crom cu limfocite T CD8+ umane îmbogățite stimulate ca celule efectoare și celule CHO transfectate cu MSLN umană ca celule țintă, constructele de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 din prezenta invenție sunt, de asemenea, potente cu privire la activitatea citotoxică împotriva celulelor țintă expresoare naturale (a se vedea Tabelul 5).

Tabelul 5: Valorile CE50 [pM] ale constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 analizate într-un test de citotoxicitate cu eliberare de 51-crom (^{51}Cr) de 18 ore cu linia celulară umană MSLN-pozitivă OVCAR-8 ca sursă de celule țintă și celule T CD8 umane îmbogățite stimulate ca celule efectoare.

BiTE x I2C-HALB	CE50 [pM]
MS 1	0,2
MS 8	1,3
MS 2	0,8
MS 3	0,1
MS 4	0,1
MS 5	0,3
MS 6	0,2
MS 7	0,5

Exemplul 5.4

Test de citotoxicitate bazat pe FACS cu PBMC umane nestimulate

Izolarea celulelor efectoare

Celulele mononucleare din sângele periferic uman (PBMC) au fost preparate prin centrifugare în gradient de densitate Ficoll din preparate limfocitare îmbogățite (straturi leucocitare), un produs secundar al băncilor de sânge care colectează sânge pentru transfuzii. Straturile leucocitare au fost furnizate de o bancă locală de sânge, iar PBMC au fost preparate în aceeași zi de recoltare a sângelui. După centrifugarea la densitate

Ficoll și spălări extinse cu PBS Dulbecco (Gibco), eritrocitele rămase au fost îndepărtate din PBMC prin incubare cu tampon de liză eritrocitară (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 100 μM EDTA). Trombocitele au fost îndepărtate prin intermediul supernatantului în urma centrifugării PBMC la $100 \times g$. Limfocitele rămase cuprind în principal limfocite B și T, celule NK și monocite. PBMC au fost ținute în cultură la $37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$ în mediu RPMI (Gibco) cu 10% FCS (Gibco).

Epuizarea celulelor CD14^+ și CD56^+

Pentru epuizarea celulelor CD14^+ , s-au utilizat microperle CD14 umane (Milteny Biotec, MACS, #130-050-201), iar pentru epuizarea celulelor NK s-au utilizat microperle CD56 umane (MACS, #130-050-401). PBMC au fost numărate și centrifugate timp de 10 minute la temperatura camerei cu $300 \times g$. Supernatantul a fost aruncat, iar peletul celular a fost resuspendat în tamponul de izolare MACS [80 $\mu\text{l}/10^7$ celule; PBS (Invitrogen, #20012-043), 0,5% (v/v) FBS (Gibco, #10270-106), 2 mM EDTA (Sigma-Aldrich, #E-6511)]. S-au adăugat microperle CD14 și microperle CD56 (20 $\mu\text{l}/10^7$ celule) și s-au incubat timp de 15 minute la $4 - 8^\circ\text{C}$. Celulele au fost spălate cu tampon de izolare MACS (1 - 2 $\text{ml}/10^7$ celule). După centrifugare (a se vedea mai sus), supernatantul a fost aruncat și celulele au fost resuspendate în tampon de izolare MACS (500 $\mu\text{l}/10^8$ celule). Celulele negative $\text{CD14}/\text{CD56}$ au fost apoi izolate folosind coloane LS (Miltenyi Biotec, # 130-042-401). PBMC fără celule $\text{CD14}^+/\text{CD56}^+$ au fost cultivate în mediu complet RPMI adică RPMI1640 (Biochrom AG, # FG1215) suplimentat cu 10% FBS (Biochrom AG, # S0115), 1x aminoacizi neesențiali (Biochrom AG, # K0293), Tampon 10 mM Hepes (Biochrom AG, # L1613), piruvat de sodiu 1 mM (Biochrom AG, # L0473) și 100 U/ml penicilină/streptomycină (Biochrom AG, # A2213) la 37°C într-un incubator cât a fost necesar.

Etichetarea celulelor țintă

Pentru analiza lizei celulare în testele de citometrie în flux, s-a utilizat colorantul fluorescent de membrană DiOC_{18} (DiO) (Molecular Probes, #V22886) pentru a marca celulele CHO transfectate cu MSLN umană sau MSLN de macac ca celule țintă și pentru a le distinge de celulele efectoare. Pe scurt, celulele au fost recoltate, spălate o dată cu PBS și ajustate la 10^6 celule/ml în PBS conținând 2 % (v/v) FBS și colorantul de membrană DiO (5 $\mu\text{l}/10^6$ celule). După incubare timp de 3 minute la 37°C , celulele au fost spălate de două ori în mediu RPMI complet și numărul de celule a fost ajustat la $1,25 \times 10^5$ celule/ml. Vitalitatea celulelor a fost determinată folosind 0,5% (v/v) soluție izotonică de EosinG (Roth, # 45380).

Test bazat pe citometrie de flux

Acest test a fost conceput pentru a cuantifica liza celulelor CHO transfectate cu MSLN cyno sau umană în prezența unor diluții seriale de constructe de anticorpi bispecifici MSLN. S-au amestecat volume egale de celule țintă marcate cu DiO și de celule efectoare (adică PBMC fără celule CD14⁺), rezultând un raport de celule E:T de 10:1. 160 μl din această suspensie au fost transferați în fiecare godeu al unei plăci cu 96 de godeuri. S-au adăugat 40 μl de diluții seriale ale constructelor de anticorpi bispecifici MSLNxCD3 și un control negativ bispecific (un construct de anticorp bispecific bazat pe CD3 care recunoaște un antigen țintă irelevant) sau mediu complet RPMI ca un control negativ suplimentar. Reacția citotoxică mediată de anticorpi bispecifici s-a desfășurat timp de 48 de ore într-un incubator umidificat cu 7% CO₂. Apoi celulele au fost transferate pe o nouă placă cu 96 de godeuri și pierderea integrității membranei celulare țintă a fost monitorizată prin adăugarea de iodură de propidiu (PI) la o concentrație finală de 1 μg/ml. PI este un colorant impermeabil de membrană care în mod normal este exclus din celulele viabile, în timp ce celulele moarte îl preiau și devin identificabile prin emisie fluorescentă.

Probele au fost măsurate prin citometrie în flux pe un instrument FACSCanto II și analizate cu software-ul FACSDiva (ambele de la Becton Dickinson). Celulele țintă au fost identificate ca fiind celule DiO-pozitive. Celulele țintă PI-negative au fost clasificate drept celule țintă vii. Procentul de citotoxicitate a fost calculat conform următoarei formule:

$$\text{Citotoxicitate } [\%] = \frac{n_{\text{celule țintă moarte}}}{n_{\text{celule țintă}}} \times 100$$

n = numărul de evenimente

Folosind software-ul GraphPad Prism 5 (Graph Pad Software, San Diego), procentul de citotoxicitate a fost reprezentat grafic în raport cu concentrațiile de construct de anticorp bispecific corespunzătoare. Curbele de răspuns la doză au fost analizate cu cele patru modele de regresie logistică parametrică pentru evaluarea curbelor de răspuns la doză sigmoidă cu panta fixă pe vârf și au fost calculate valorile CE50.

Exemplul 5.5

Potența de redirecționare a PBMC umane nestimulate împotriva celulelor CHO transfectate cu MSLN umană în absența și în prezența MSLN solubilă

Activitatea citotoxică a constructelor de anticorpi bispecifici MSLNxCD3 a fost analizată într-un test de citotoxicitate bazat pe FACS utilizând celule CHO transfectate

cu MSLN umană ca celule țintă și PBMC umane nestimulate ca celule efectoare. Testul a fost efectuat așa cum este descris în Exemplul 8.4 de mai sus.

Rezultatele testelor de citotoxicitate bazate pe FACS cu PBMC umane nestimulate ca celule efectoare și celule CHO transfectate cu MSLN umană ca ținte sunt prezentate în Tabelul 7.

Tabelul 6: Activitatea citotoxică a PBMC umane nestimulate împotriva celulelor CHO transfectate cu MSLN umană în absența și prezența MSLN solubilă

	fără sMSLN	cu 50 ng/ml sMSLN	cu 400 ng/ml sMSLN
BiTE x I2C-HALB	CE50 [pM]	CE50 [pM]	CE50 [pM]
MS-1	12	53	215
MS-8	3,4	8,3	39
MS-2	2,4	2,9	6,3
MS-3	1,2	3,0	16
MS-4	1,5	3,9	11
MS-5	1,0	2,2	11
MS-6	1,1	2,6	12
MS-7	8,1	28	166

De așteptat, valorile CE50 au fost în general mai mari în testele de citotoxicitate cu PBMC nestimulate ca celule efectoare în comparație cu testele de citotoxicitate folosind celule T CD8+ umane stimulate (a se vedea Exemplul 8.2).

Exemplul 5.6

Potența de redirecționare a PBMC umane nestimulate împotriva celulelor liniei de celule MSLN-pozitive OVCAR-8

Activitatea citotoxică a constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 a fost analizată în plus într-un test de citotoxicitate bazat pe FACS utilizând linia celulară umană MSLN-pozitivă OVCAR-8 ca sursă de celule țintă și PBMC umane nestimulate ca celule efectoare. Testul a fost efectuat așa cum este descris în Exemplul 8.4 de mai sus. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 7.

Tabelul 7: Valorile CE50 [pM] ale constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 măsurate într-un test de citotoxicitate bazat pe FACS de 48 de ore cu PBMC umane nestimulate ca celule efectoare și linia celulară umană OVCAR-8 ca sursă de celule țintă.

BiTE x I2C-HALB	CE50 [pM]
MS 1	5,9
MS 8	13
MS 2	18
MS 3	1,5
MS 4	2,0
MS 5	1,9
MS 6	2,3
MS 7	9,7

Exemplul 5.7

Potența de redirecționare a celulelor T de macac împotriva celulelor CHO care exprimă MSLN de macac

Activitatea citotoxică a constructelor de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 a fost analizată într-un test de citotoxicitate bazat pe FACS utilizând celule CHO transfectate cu MSLN de macac (cyno) ca celule țintă și linia de celule T de macac 4119LnPx (Knappe și colab. Blood 95:3256-61 (2000)) ca sursă de celule efectoare. Marcarea ca celule țintă a celulelor CHO transfectate cu MSLN de macac și testul activității citotoxice bazat pe citometrie de flux au fost efectuate așa cum este descris mai sus.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 8. Celulele T de macac din linia celulară 4119LnPx au fost determinate să omoare eficient celulele CHO transfectate cu MSLN de macac prin constructele de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 ale invenției.

Tabelul 8: Valorile CE50 [pM] ale MSLNxCD3 bispecifice măsurate într-un test de citotoxicitate bazat pe FACS de 48 de ore cu linia de celule T de macac 4119LnPx ca celule efectoare și celule CHO transfectate cu MSLN de macac ca celule țintă.

BiTE x I2C-HALB	CE50 [pM]
MS 1	434

BiTE x I2C-HALB	CE50 [pM]
MS 8	1589
MS 2	583
MS 3	56
MS 4	67
MS 5	85
MS 6	100
MS 7	1791

Exemplul 5.8

Decalaj de potență între izoforma monomerică și dimerică a constructelor de anticorpi bispecfici

Pentru a determina diferența de activitate citotoxică dintre izoforma monomerică și dimerică a constructelor individuale de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 (denumită decalaj de potență), a fost efectuat un test de citotoxicitate cu eliberare de 51-crom timp de 18 ore așa cum este descris mai sus (Exemplul 8.1) cu monomer și dimer de construct de anticorp bispecific purificat. Celulele efectoare au fost celule T CD8 + umane îmbogățite stimulate. Celulele țintă au fost celule CHO transfectate cu MSLN um. Raportul efector-celulă țintă (E:T) a fost de 10:1. Decalajul de potență a fost calculat ca raport între valorile EC50.

Rezultatele testelor cu celule T CD⁺ umane îmbogățite stimulate ca celule efectoare și celule CHO transfectate cu MSLN umană ca ținte sunt prezentate în Tabelul 9.

Tabelul 9: Activitatea citotoxică a PBMC umane nestimulate împotriva celulelor CHO transfectate cu MSLN umană folosind constructe de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 monomerice și dimerice

BiTE x I2C-HALB	<i>CE₅₀ [pM] Monomer Dimer</i>		<i>Raport monomer la dimer (CE₅₀ Monomer / CE₅₀ Dimer)</i>
MS 1	1,5	1,7	0,9
MS 8	6,5	9,5	0,7

BiTE x I2C-HALB	<i>CE₅₀ [pM] Monomer Dimer</i>		<i>Raport monomer la dimer (CE₅₀ Monomer / CE₅₀ Dimer)</i>
MS 2	2,0	2,0	1,0
MS 3	0,2	0,7	0,3
MS 4	0,1	0,9	0,1
MS 5	0,2	1,1	0,2
MS 6	0,5	3,4	0,1
MS 7	6,0	21	0,3

Exemplul 6

Stabilitate după incubare timp de 24 de ore în plasmă umană

Construcțiile de anticorpi bispecfici purificate au fost incubate într-un raport de 1:5 într-un fond de plasmă umană la 37°C timp de 96 de ore la o concentrație finală de 2-20 µg/ml. După incubarea cu plasmă, construcțiile de anticorpi au fost comparate într-un test de eliberare de 51-crom cu celule T CD8+ umane îmbogățite stimulate și celule CHO transfectate cu MSLN umană la o concentrație inițială de 0,01-0,1 µg/ml și cu un raport celulă efector-țintă (E:T) de 10:1 (test după cum este descris în Exemplul 8.1). Construcțiile de anticorpi bispecfici proaspăt dezghețate neincubate au fost incluse ca martori.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 10 de mai jos; Toate construcțiile de anticorpi testate au avut o stabilitate plasmatică foarte favorabilă (CE₅₀ plasmă / CE₅₀ control) de ≤ 4,.

Tabelul 10: Valorile EC₅₀ ale constructelor de anticorpi cu și fără incubare plasmatică și valoarea calculată plasmă/control

BiTE x I2C-HALB	<i>CE₅₀ [pM]</i>		<i>Raport plasmă la martor (CE₅₀ Plasmă / CE₅₀ Martor)</i>
	<i>cu plasmă</i>	<i>fără plasmă</i>	
MS 1	3,0	1,5	2,0
MS 8	4,8	6,5	0,7
MS 2	6,7	2,0	3,4

BiTE x I2C-HALB	CE ₅₀ [pM]		Raport plasmă la martor (CE ₅₀ Plasmă ICE ₅₀ Martor)
	cu plasmă	fără plasmă	
MS 3	0,3	0,2	1,5
MS 4	0,4	0,1	4
MS 5	0,3	0,2	1,5
MS 6	0,6	0,5	1,2
MS 7	11,4	6,0	1,9

Exemplul 7

Omogenitatea proteinelor prin cromatografie cu schimb de cationi de înaltă rezoluție

Omogenitatea proteinelor constructelor de anticorpi conform invenției a fost analizată prin cromatografie cu schimb de cationi de înaltă rezoluție CIEEX.

50 µg de monomer de construct de anticorp au fost diluați cu 50 ml tampon de legare A (20 mM fosfat dihidrogen de sodiu, 30 mM NaCl, 0,01% octanat de sodiu, pH 5,5) și 40 ml din această soluție au fost aplicați pe o coloană BioPro SP-F de 1 ml (YMC, Germania) conectată la un dispozitiv Äkta Micro FPLC (GE Healthcare, Germania). După legarea probei, a fost efectuată o etapă de spălare cu tampon de legare suplimentară. Pentru eluarea proteinelor, s-a aplicat un gradient de sare în creștere liniară folosind tampon B (20 mM dihidrogen fosfat de sodiu, 1000 mM NaCl, 0,01% octanat de sodiu, pH 5,5) până la 50% procent tampon B pe 10 volume de coloane. Întreaga rulare a fost monitorizată la 280, 254 și 210 nm absorbantă optică. Analiza a fost făcută prin integrarea maximă a semnalului de 280 nm înregistrat în foaia de evaluare a rulării software-ului Äkta Unicorn.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 11 de mai jos. Aproape toate constructele de anticorpi testate au o omogenitate foarte favorabilă de $\geq 80\%$ (aria de sub curbă (= ASC) a vârfului principal). Singura excepție este constructul bispecific MS-2xCD3-HALB cu doar 67% omogenitate.

Tabelul 11: Omogenitatea proteinelor în constructele de anticorpi (% ASC a vârfului principal)

MSLN HALB BiTE	ASC a Vârfului Principal [%]
MS 1	100
MS 8	93
MS 2	67
MS 3	87
MS 4	80
MS 5	89
MS 6	81
MS 7	100

Exemplul 8

Hidrofobicitatea suprafeței măsurată prin butil HIC

Hidrofobicitatea de suprafață a constructelor de anticorpi bispecifici ale invenției a fost testată în cromatografie prin interacțiune hidrofobă HIC în modul de flux.

50 µg de monomer de construct de anticorp au fost diluați cu tampon de formulare generic până la un volum final de 500 µl (10 mM acid citric, 75 mM lizină HCl, 4% trehaloză, pH 7,0) și aplicați pe o coloană butil sefaroză FF de 1 ml (GE Healthcare, Germania) conectată la un sistem Äkta Purifier FPLC (GE Healthcare, Germania). Întreaga rulare a fost monitorizată la 280, 254 și 210 nm absorbantă optică. Analiza a fost făcută prin integrarea maximă a semnalului de 280 nm înregistrat în foaia de evaluare a rulării software-ului Äkta Unicorn. Comportamentul de eluare a fost evaluat prin compararea ariei și vitezei de creștere și declin a semnalului proteic, indicând astfel puterea de interacțiune a fuziunii de albumină BiTE cu matricea.

Constructele de anticorpi au avut un comportament de eluție bun, care a fost în mare parte rapidă și completă; a se vedea Tabelul 12.

Tabelul 12: Hidrofobicitatea de suprafață a constructelor de anticorpi bispecifici

MSLN HALB BiTE	Comportament de eluție pe butil în HIC
MS 1	1
MS 8	1
MS 2	1

MSLN HALB BiTE	Comportament de eluție pe butil în HIC
MS 3	1
MS 4	1
MS 5	1
MS 6	1
MS 7	1

Exemplul 9

Conversia monomerului în dimer după (i) trei cicluri de îngheț/dezgheț și (ii) 7 zile de incubare la 250 µg/ml

Constructul monomeric de anticorp bispecific MSLNxCD3 a fost supus la diferite condiții de stres urmate de SEC de înaltă performanță pentru a determina procentul de construct de anticorp monomeric inițial, care a fost transformat în construct de anticorp dimeric.

1. (i) 25 µg de construct de anticorp monomeric au fost ajustate la o concentrație de 250 µg/ml cu tampon de formulare generic și apoi congelate la -80°C timp de 30 min urmate de decongelare timp de 30 min la temperatura camerei. După trei cicluri de îngheț/dezgheț, conținutul de dimer a fost determinat prin HP-SEC.

2. (ii) 25 µg de construct de anticorp monomeric au fost ajustate la o concentrație de 250 µg/ml cu tampon generic de formulare urmat de incubare la 37°C timp de 7 zile. Conținutul de dimeri a fost determinat prin HP-SEC.

O coloană SEC TSK Gel G3000 SWXL de înaltă rezoluție (Tosoh, Tokyo-Japonia) a fost conectată la un Äkta Purifier 10 FPLC (GE Lifesciences) echipat cu un autosampler A905. Echilibrarea coloanei și tamponul de funcționare au constatat din 100 mM KH₂PO₄ - 200 mM Na₂SO₄ ajustat la pH 6,6. Soluția de anticorp (25 µg proteină) a fost aplicată pe coloana echilibrată și eluarea a fost efectuată la un debit de 0,75 ml/min la o presiune maximă de 7 MPa. Întreaga rulare a fost monitorizată la 280, 254 și 210 nm absorbantă optică. Analiza a fost făcută prin integrarea maximă a semnalului de 210 nm înregistrat în foaia de evaluare a rulării software-ului Äkta Unicorn. Conținutul de dimeri a fost calculat prin împărțirea ariei vârfului dimerului la aria totală a monomerului plus vârful dimerului.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 13 de mai jos. Constructele de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 conform invenției au prezentat procente de dimeri de 0,0% după trei cicluri de îngheț/dezgheț și procente de dimeri de $\leq 2,2\%$ după 7 zile de incubație la 37°C.

Tabelul 13: Procentul de construct de anticorp bispecific MSLNxCD3 monomeric versus dimeric, determinat prin cromatografie de excludere pe baza mărimii de înaltă performanță (HP-SEC).

MSLN HALB BiTE	Conversie dimer BiTE [%]
MS 1	0,2
MS 8	1,6
MS 2	0,0
MS3	1,7
MS 4	0,3
MS 5	1,2
MS 6	0,4
MS 7	2,2

Exemplul 10

Termostabilitate

Temperatura de agregare a anticorpilor a fost determinată după cum urmează: 40 μ l de soluție de construct de anticorp la 250 μ g/ml au fost transferați într-o cuvă de unică folosință și plasați într-un dispozitiv Wyatt Dynamic Light Scattering DynaPro Nanostar (Wyatt). Proba a fost încălzită de la 40°C la 70°C la o rată de încălzire de 0,5°C/min, cu achiziție constantă a razei măsurate. Creșterea razei indicând topirea proteinei și agregarea a fost utilizată de pachetul software livrat cu dispozitivul DLS pentru a calcula temperatura de agregare a constructului de anticorp.

Toate constructele de anticorpi bispecfici MSLNxCD3 testate ale invenției au arătat stabilitate termică la temperaturi de agregare $\geq 49^\circ\text{C}$, așa cum se arată în Tabelul 14 de mai jos. Grupul de constructe de anticorpi care se leagă de clusterul de epitopi 2+3 a avut chiar o stabilitate termică de $\geq 51^\circ$ și până la peste 56°C.

Tabelul 14: Termostabilitatea constructelor de anticorpi bispecfici, determinată de DLS (dispersie dinamică a luminii)

MSLN HALB BiTE	Stabilitate termică DLS T _A [°C]
MS 1	49,3
MS 8	51,0
MS 2	53,1
MS 3	51,6
MS 4	56,5
MS 5	54,4
MS 6	53,9
MS 7	51,4

Exemplul 11

Turbiditate la concentrația de anticorpi de 2500 µg/ml

1 ml de soluție de construct de anticorp purificat cu o concentrație de 250 µg/ml a fost concentrat prin unități de concentrare spin la 2500 µg/ml. După 16h de stocare la 5°C, turbiditatea soluției de anticorp a fost determinată prin măsurarea absorbției optice OD340 nm împotriva tamponului de formulare generic.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 15 de mai jos. Toate constructele de anticorpi testate au o turbiditate foarte favorabilă de $\leq 0,09$.

Tabelul 15: Turbiditatea constructelor anticorpului după concentrare la 2,5 mg/ml peste noapte

MSLN HALB BiTE	Turbiditate după 16h la 2500 µg/ml [OD340]
MS 1	0,080
MS 8	0,079
MS 2	0,070
MS 3	0,087
MS 4	0,076
MS 5	0,071

MSLN HALB BiTE	Turbiditate după 16h la 2500 µg/ml [OD340]
MS 6	0,070
MS 7	0,066

Exemplul 12: Exprimarea CD69 indusă de BiTE® pe celulele T în absența celulelor țintă

PBMC izolate de la donatori umani sănătoși au fost cultivate cu constructe de anticorpi bispecfici CDH19/CD3 sau MSLN/CD3 HLE crescând timp de 48 de ore. Exprimarea markerului de activare CD69 pe celulele T a fost determinată prin imunocolorare și citometrie în flux și conjugate mAb specifice antigenului.

Activarea celulelor T independentă de țintă în ceea ce privește reglarea ascendentă a CD69 a fost observată pentru toate constructele anti-CDH 19, dar a fost cel mai pronunțată pentru moleculele heteroFc și anticorp X. Reglarea ascendentă CD69 de către antiCDH19-scFc a avut loc la concentrații mai mari și amplitudinea a fost parțial mai mică în comparație cu celelalte două constructe pe bază de Fc.

Pentru anti-MSLN, aproape nicio activare a celulelor T independentă de țintă nu a fost observată pentru molecula care conține scFc, în timp ce constructul heteroFc a indus o reglare ascendentă puternică a CD69 pe celulele T de suprafață celulară în absența celulelor țintă.

Activarea celulelor T independentă de țintă indusă de constructele BiTE® care conțin Fc cu un singur lanț sau fuziune hetero-Fc la capătul C-terminal pentru următoarele constructe:

constructe BiTE® (diluții seriale: 0,1 pM - 2 µM)

- a. MSLN scFc; 1,14 mg/ml;
- b. MSLN Hetero Fc; 1,02 mg/

Celule efectoare PBMC umane (3 donatori; #065, #823, #836 (scFc) #401, #415, #433 (heteroFc); #590, #595, 598, #605 (anticorp X)).

48 h perioadă de incubare.

Determinarea exprimării CD69 pe celulele T CD4+ și CD8+ cu citometru de flux și conjugate mAb specifice antigenului. Pentru rezultate a se vedea Figura 15.

Activarea celulelor T independentă de țintă indusă de constructele de anticorpi BiTE® care conțin Fc cu un singur lanț, hetero-Fc sau fuziune încrucișată la capătul C-terminal au fost evaluate pentru următoarele constructe:

construite BiTE[®] (diluții seriale: 0,1 pM - 2 μM)

c. CDH19 scFc; 245,3 μg/ml

d. CDH-19 Hetero Fc; 1 mg/ml

e. CDH19 anticorp X; 6,3 mg/ml

Celule efectoare PBMC umane (3 până la 4 donatori; #386, #392, #401 (scFc) #282, #284, #287 (heteroFc)).

48 h perioadă de incubare.

Determinarea exprimării CD69 pe celulele T CD4⁺ și CD8⁺ cu citometru de flux și conjugate mAb specifice antigenului. Pentru rezultate a se vedea Figura 16.

Exemplul 13:

Construcțiile de anticorpi BiTE[®] purificate au fost acoperite pe o placă Maxisorb în concentrație descrescătoare (100nM, diluții 1:4). După spălare de 3 ori cu PBS-T și blocare cu PBS/3% (g/v) BSA (60 min, 37°C), plasmă umană reunită a fost incubată timp de 60 min, 80 rpm la temperatura camerei. După spălare de 3x, a fost adăugat un anticorp monoclonal de șoarece specific pentru subunitatea A C1q umană (CC1q) (Thermo MA1-83963, 1:500) timp de 60 min, 80 rpm, temperatura camerei, după etapele de spălare descrise, un mAb Fc-POX de capră anti-șoarece (1:5.000) a fost incubat timp de 60 min, 80 rpm, temperatura camerei. După spălare suplimentară, substratul TMB a fost incubat și oprit după reacția colorimetrică prin adăugare de H₂SO₄. Absorbția a fost determinată la 450 nm.

Rezultat: După cum se arată în figura 17, la concentrații mari, constructul hetero Fc BiTE[®] (pătrate) a arătat semnale de legare mai mari pentru CC1q uman în comparație cu un construct Fc cu un singur lanț BiTE[®] (triunghi). Drept control negativ a fost utilizat un BiTE[®] canonic (cerc), care nu a arătat nicio legare semnificativă de CC1q.

Exemplul 14: Farmacocinetica constructelor de anticorpi BiTE[®] fuzionate cu proteine Fc-(scFc) și hetero-Fc (hetFc) cu un singur lanț

Diverși anticorpi de legare la țintă BiTE[®] au fost fuzionați la două fragmente diferite de extindere a timpului de înjumătățire. Cele două variante HLE diferite per anticorp BiTE[®], denumit ulterior BiTE[®]-scFc și BiTE[®]-hetFc, au fost testate la maimuța cynomolgus în contextul studiilor farmacocinetice (PK). Nomenclatura corespunzătoare a acestor molecule este rezumată pe scurt în Tabelul 16 de mai jos.

Tabelul 16 Nomenclatura compușilor pentru nouă constructe de anticorpi HLE BiTE[®] cu doză unică

sinonim compus	denumire compus de test
Compus 1a	CD33cc-scFc
Compus 1b	CD33cc-hetFc
Compus 2a	MSLN-scFc
Compus 2b	MSLN-hetFc
Compus 3a	CDH19-scFc
Compus 3b	CH19-hetFc
Compus 4	CD20-scFc
Compus 5a	DLL3-scFc
Compus 5b	DLL3-hetFc

Constructul de anticorp HLE BiTE[®] a fost administrat ca bolus intravenos (compușii 1b-5b) și perfuzie intravenoasă (compusul 1a, 30 min) la 6 μg/kg (compus 2b), 12 μg/kg (compușii 2a și 3a-5b) și 15 μg/kg (compușii 1a și, respectiv, 1b). Pentru fiecare dintre compușii denumiți mai sus a fost utilizat un grup de cel puțin două până la trei animale. S-au recoltat probe de sânge și s-a preparat ser pentru determinarea concentrațiilor serice. Nivelurile serice de construct de anticorp BiTE[®] au fost măsurate utilizând un imunotest. Testul este realizat prin capturarea BiTE[®] prin intermediul fragmentului său țintă, în timp ce un anticorp direcționat împotriva părții de legare a CD3 a constructului a fost utilizat pentru detectare. Profilurile serice de concentrație-timp au fost utilizate pentru a determina parametrii PK. Punctele de timp pentru prelevarea de sânge sunt enumerate în Tabelul 17 de mai jos.

Tabelul 17 Momentele de prelevare a probelor de sânge în timpul studiului PK

momente de prelevare a probelor de sânge comp. 1a [h]	momente de prelevare a probelor de sânge comp. 1b [h]	momente de prelevare a probelor de sânge comp. 2a-5b [h]
0,085	0,085	0,05
4,00	1	0,25
24,00	4	0,5

momente de prelevare a probelor de sânge comp. 1a [h]	momente de prelevare a probelor de sânge comp. 1b [h]	momente de prelevare a probelor de sânge comp. 2a-5b [h]
48,00	12	1
72,00	24	4
96,00	48	8
120,00	72	24
144,00	96	48
168	144	72
	168	168
		240
		336

Farmacocinetica a patru perechile de constructe de anticorpi BiTE®-HLE sunt prezentate, cu titlu de exemplu, în Figura 18. Fiecare pereche reprezintă aceeași proteină BiTE® fuzionată fie cu o extensie scFc sau cu o extensie hetFc. Pentru toate proteinele, nivelurile serice au fost cuantificabile pentru toate momentele de timp la toate animalele după administrarea BiTE®-HLE. Profilurile PK descriu un declin bifazic, exponențial după fiecare dintre administrările cu un singur element de testare.

Parametrii farmacocinetici au fost determinați folosind metode standard de analiză non-compartimentală (NCA). Utilizând analiza necompartimentală, s-au estimat următorii parametri PK: ASCinf (Aria de sub curba concentrației serice-timp), Vss (volum de distribuție la starea de echilibru), CL (eliminare sistemică) și t1/2 terminal (timp de înjumătățire terminal).

Parametrii PK pentru fiecare compus testat sunt rezumați ca medie a n=2 și respectiv n=3, în Tabelul 18 de mai jos.

Tabelul 18 Parametrul farmacocinetic al variantelor scFc și heteroFc din diferiți lianți BiTE®-țintă la maimuțele cynomolgus.

element de test	t _{1/2} terminal [h]	ASC _{inf} [h*ng/ml]	CL [ml/h/kg]	Vss [mL/kg]
Compus 1a	167	6645	1,4	256
Compus 1b	95	4955	2,6	261
Compus 2a	213	12072	0,73	179
Compus 2b	116	6971	0,8	78
Compus 3a	61	3293	3,6	129
Compus 3b	59	3633	3,3	79
Compus 4	97	6266	1,9	180
Compus 5a	234	24769	0,48	144
Compus 5b	173	14639	0,82	166

În general, ASC_{inf} pentru diferitele perechi BiTE[®] -HLE de lianți țintă fuzionați fie cu fragmentul scFc, fie cu hetFc, respectiv, au variat între 3293 h*ng/ml și 24769 h*ng/ml, în funcție de contextul țintă BiTE[®]. Toate fuziunile HLE analizate au atins valori ale eliminării sistemice de 0,48 până la 3,6 ml/h/kg. Volumele corespunzătoare de distribuție au variat între 78 și 261 ml/kg.

Exemplul 15:

Substanțele medicamentoase preformulate care conțin MSLN-HALB, MSLN-hFc și, respectiv, MSLN-scFc purificate au fost schimbate cu tampon prin ultrafiltrare/diafiltrare folosind membrane cu o limită de greutate moleculară (MWCO) de 10 kDa. Formularea finală a fost obținută prin adăugarea de soluții stoc concentrate. Formulările rezultate pentru fiecare construct sunt enumerate în Tabelul 19 și cuprind K60RTrT compus 20 mM din fosfat de potasiu, 150 mM clorhidrat de L-arginină, trehaloză dihidrat 6% (g/v), polisorbit 80 0,01% (g/v) la pH 6,0 și G40MSuT compus din 10 mM glutamat, 4% (g/v) manitol, 2% (g/v) zaharoză, 0,01% (g/v) polisorbit 80 la pH 4,0. Concentrația țintă a proteinei a fost de 1,0 mg/ml. Constructele MSLN formulate au fost umplute până la 1 ml în flacoane de sticlă de tip I care au fost astupate cu dopuri din cauciuc butilic și sertizate cu garnituri de aluminiu. Flacoanele umplute au fost incubate la -20, 5, 25 și 37°C. Un flacon din fiecare versiune a fost supus la cinci cicluri de îngheț

și dezgheț (F/T). Temperatura țintă de îngheț a fost de -29°C. Temperatura țintă de dezgheț a fost de 2°C. Viteza de generare a fost de aproximativ 0,3 K/min.

Particulele vizuale au fost evaluate în conformitate cu metoda descrisă de Ph Eur 2.9.20 de către operatori instruiți. Numărătorile de particule vizuale per flacon sunt prezentate în Tabelul 7. Numărul de particule proteice vizuale (mai mare de 125 μm) a fost mai mare pentru MSLN-hFc în comparație atât cu MSLN-hALB cât și cu MSLN-scFc.

Tabelul 19: Numărul de particule proteice vizuale pe flacon pentru probele stresate și nestresate (T0) care conțin diferite constructe BiTE® anti-mezotelină (MSLN) cu timp de înjumătățire prelungit. K60RTrT indică o formulare care conține 20 mM fosfat de potasiu, 150 mM clorhidrat de L-arginină, 6% (g/v) trehaloză dihidrat, 0,01 % (g/v) polisorbitat 80, pH 6,0. G40MSuT indică o formulare care conține 10 mM glutamat, 4% (g/v) manitol, 2% (g/v) zaharoză, 0,01% (g/v) polisorbitat 80, pH 4,0

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
Număr de particule proteice vizibile (>125μm) per flacon					
T0	0	0	1	0	0
5 cicluri F/T	0	2	2	0	1
2w 5°C	0	2	2	0	0
2w 25°C	0	2	1	0	0
2w 37°C	0	2	2	0	0
4w -20°C	0	2	1	0	0
4w 5°C	0	1	2	0	0
4w 25°C	0	2	2	0	0
4w 37°C	0	2	2	0	0

Probele descrise mai sus au fost, de asemenea, analizate prin cromatografie cu excludere pe baza mărimii de performanță ultra-înaltă (SE-UPLC) pentru a cuantifica conținutul procentual de specii cu greutate moleculară mare (HMWS). SE-UPLC a fost efectuată pe un sistem UPLC AcquityH-Class (Waters) folosind o coloană Acquity UPLC BEH200 SEC de 150 mm (Waters). Temperatura coloanei a fost setată la 25°C.

Separarea variantelor de mărime a fost realizată prin aplicarea unei metode izocratice cu un debit de 0,4 ml/min. Faza mobilă a fost compusă din fosfat de sodiu 100 mM, NaCl 250 mM la pH 6,8. Durata totală a ciclului este de 6,0 minute. Probele au fost ținute la 8°C în autosampler până la analiză. S-a injectat o cantitate totală de 3 µg proteină. Pentru a evita transferul, a fost efectuată o injecție intermediară cu 40% acetonitril după fiecare probă. Detectarea s-a bazat pe emisia de fluorescență (excitație la 280 nm, emisie la 325 nm). Integrarea maximă a fost realizată folosind software-ul Empower®. A fost raportată aria de sub curbă relativă HMWS (Tabelul 20).

Constructele pe bază de Fc au prezentat conținuturi mai mici de HMWS în varianta de formulare G40MSuT decât în K60RTrT independent de condiția de stres. A devenit evident că MSLN-scFc conținea mai puține HMWS decât MSLN-hFc atât în preparatele G40MSuT, cât și în K60RTrT. MSLN-scFc în formularea sa preferată (G40MSuT) a fost mai puțin predispus la formarea HMWS decât MSLN-hALB formulat în K60RTrT. În experimentele anterioare, acest tampon a arătat un potențial de stabilizare îmbunătățit pentru constructele pe bază de hALB în comparație cu formulările cu valori mai acide ale pH-ului.

Tabelul 20: Privire de ansamblu asupra conținutului de HMWS în preparatele MSLN-hALB, -hFc și -scFc stresate și nestresate (T0) determinat prin SE-UPLC

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%HMWS					
T0	1,8	6,7	3,3	2,5	1,3
5 cicluri F/T	2,0	7,2	4,1	3,0	1,5
2w 5°C	n.t.	n.t.	n.t.	2,9	1,1
2w 25°C	n.t.	6,6	2,7	2,4	0,5
2w 37°C	2,6	6,3	2,1	2,7	0,3
4w -20°C	5,9	8,7	1,6	6,6	0,3
4w 5°C	2,0	8,2	2,8	3,6	0,6
4w 25°C	2,2	6,8	2,6	2,7	0,4
4w 37°C	3,5	7,6	1,9	4,3	0,3

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%HMWS					
n.t. = netestat					

Abundența modificărilor chimice la stresul termic (incubare la 37°C) a fost monitorizată prin cartografierea peptidelor. Probele de proteine au fost digerate enzimatic și peptidele rezultate au fost separate utilizând cromatografia în fază inversă. Eluatul coloanei a fost injectat direct în sursa de ioni a unui spectrometru de masă pentru identificarea și cuantificarea peptidelor.

Pentru a obține o acoperire maximă, au fost efectuate două digestii enzimatic separate: o dată cu tripsină și o dată cu chimotripsină. În fiecare caz, proteinele au fost denaturate cu clorură de guanidină și apoi reduse cu ditiotritol (DTT). După incubare în DTT, resturile de cisteină liberă au fost alchilate prin adăugarea de acid iodoacetic. Probele au fost apoi schimbate cu tampon în Tris 50 mM pH 7,8 pentru digestie. Tripsina și chimotripsina au fost adăugate în tuburi de reacție separate într-un raport de 1:10 (probă:enzimă) fiecare. Probele au fost digerate timp de 30 de minute la 37°C și reacția a fost stinsă prin adăugarea de acid trifluoracetic.

O încărcătură de 5 µg din fiecare digestat a fost injectată separat pe o coloană cu fază inversă Zorbax SB-C18 (Agilent #859700-902) echilibrată în acid formic (FA) 0,1% (v/v). Un gradient de 156 de minute de până la 90% acetonitril care conține 0,1% FA a fost utilizat pentru a elua peptidele direct în sursa de ioni de electronebulizare a unui spectrometru de masă Q-Exactive Plus (Thermo Scientific). Datele au fost colectate în modul dependent de date utilizând o metodă a primilor 12 precursori în care o scanare completă (rezoluție 70 000; interval de scanare 200-2000 m/z) a fost urmată de disociere indusă de coliziune de mare energie (HCD) a celor 12 ioni cei mai abundenți (rezoluție 17 500).

Peptidele au fost identificate pe baza spectrului de masă precis și a spectrului de masă tandem folosind software-ul intern. Identificările au fost verificate manual. Cantitățile relative de peptide modificate și nemodificate au fost calculate pe baza abundenței ionilor folosind software-ul Pinpoint (Thermo Scientific).

Procentele modificărilor chimice ale regiunilor de determinare a complementarității (CDR) și ale porțiunii de extindere a timpului de înjumătățire (fie hALB, fie Fc) detectate

În preparatele MSLN-HALB, -hFc și -scFc sunt indicate în Tabelul 21. Când s-au comparat condiții similare de formulare, a devenit evident că, în general, modificările chimice au fost cel mai puțin abundente în constructele scFc.

Tabelul 21: Privire de ansamblu asupra modificărilor chimice din preparatele MSLN-hALB, -hFc și -scFc stresate și nestresate (T0) determinate prin cartografierea peptidelor

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%N101 deamidare (CDR)					
T0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
2w 37°C	0,7	0,8	3,0	0,7	3,2
4w 37°C	1,3	n.t.	8,5	n.t.	6,4
%N162 deamidare (CDR)					
T0	3,0	1,7	1,9	2,3	2,5
2w 37°C	15,9	11,6	2,7	15,0	3,3
4w 37°C	26,8	n.t.	3,7	n.t.	4,1

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%M279 oxidare (CDR)					
T0	0,6	1,4	1,6	0,6	1,0
2w 37°C	1,2	0,8	0,8	0,6	1,0
4w 37°C	0,9	n.t.	0,8	n.t.	0,6
%N348 deamidare (CDR)					
T0	0,5	3,2	3,3	0,5	0,9
2w 37°C	20,5	21,6	1,9	9,4	1,3
4w 37°C	22,8	n.t.	2,0	n.t.	2,9

%N351 deamidare (CDR)					
T0	0,2	2,9	2,6	0,5	1,0
2w 37°C	6,6	12,7	0,9	3,8	0,4
4w 37°C	8,7	n.t.	0,8	n.t.	0,8
%M530 oxidare (Fc)					
T0	n.a.	3,9	4,1	2,6	3,2
2w 37°C	n.a.	9,0	3,1	4,0	4,3
4w 37°C	n.a.	n.t.	3,4	n.t.	3,5

%N603 deamidare (Fc)					
T0	n.a.	1,3	1,9	1,3	1,4
2w 37°C	n.a.	7,9	4,6	7,0	5,6
4w 37°C	n.a.	n.t.	6,9	n.t.	8,1
%M706 oxidare (Fc)					
T0	n.a.	3,2	3,6	1,5	2,1
2w 37°C	n.a.	6,0	2,8	2,1	2,5
4w 37°C	n.a.	n.t.	2,6	n.t.	2,0
%M587 oxidare (hALB)					
T0	1,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2w 37°C	2,2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4w 37°C	2,3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

%M623 oxidare (hALB)					
T0	1,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2w 37°C	2,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4w 37°C	3,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
%M798 oxidare (hALB)					

%M623 oxidare (hALB)					
T0	1,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2w 37°C	3,3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4w 37°C	3,5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

%M829 oxidare (hALB)					
T0	8,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2w 37°C	42,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4w 37°C	44,1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
n.a. = nu se aplică; n.t. = netestat					

Exemplul 16:

MSLN-HALB, -hFc, -scFc formulate așa cum este descris în Exemplul 15 au fost supuse unui experiment cu salt de pH. Concentrația materiilor prime a fost de 1,0 mg/ml. Un volum de 0,38 ml din fiecare materie primă a fost introdus într-un flacon de sticlă. După preconditionare la 37°C, soluțiile au fost îmbogățite cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) de 20 de ori care a fost compusă din fosfat de potasiu 0,090 M, fosfat de sodiu 0,480 M (ambii dibazici), clorură de potasiu 0,052 M și NaCl 2,76 M. Probele îmbogățite au fost incubate la 37°C timp de două săptămâni. După incubare, acestea au fost analizate prin SE-UPLC utilizând metoda descrisă în Exemplul 15 și a fost raportat conținutul procentual de HMWS (Tabelul 22). Când s-au comparat toate constructele formulate în K60RTrT, conținutul de HMWS a crescut în următoarea ordine: hALB < scFc < hFc. MSLN-scFc a arătat, de asemenea, un conținut mai scăzut de HMWS decât MSLN-hFc atunci când a fost formulat în G40MSuT.

Tabelul 22: Privire de ansamblu asupra conținutului de HMWS în preparatele MSLN-HALB, - hFc și -scFc stresate (salt pH + 2w 37°C) determinat prin SE-UPLC

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%HMWS					
2w 37°C	1,5	8,3	7,1	5,4	5,1

Exemplul 17:

MSLN-HALB, -hFc și -scFc formulate așa cum este descris în Exemplul 15 au fost supuse la stres prin agitare. Concentrația materiilor prime a fost de 1,0 mg/ml. Un volum de 0,5 ml din fiecare soluție a fost filtrat printr-un filtru adecvat de 0,22 μm și introdus în flacoane de sticlă de 3cc. Flacoanele au fost amplasate într-o cutie de plastic, asigurându-se că flacoanele nu au fost deplasate în interiorul cutiei în timpul agitării. Cutia a fost amplasată pe un agitator orbital. Probele au fost agitate la 500 rpm timp de 65 de ore. Particulele vizuale au fost evaluate în conformitate cu metoda descrisă de Ph Eur 2.9.20. Metoda a fost efectuată de operatori instruiți. Numărătorile de particule vizuale per flacon sunt prezentate în Tabelul 23. Particulele proteice vizibile au fost observate numai în preparatele MSLN-hFc.

Tabelul 23: Numărul de particule proteice vizibile per flacon în probe agitate

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
Număr de particule proteice vizibile (>125 μm) per flacon					
65h, 500 rpm	0	1	1	0	0

Probele de mai sus au fost, de asemenea, analizate prin cromatografie de performanță ultra-înaltă cu excludere pe baza mărimii (SE-UPLC) pentru a cuantifica conținutul procentual de specii cu greutate moleculară mare (HMWS). S-a aplicat aceeași metodă ca cea descrisă în Exemplul 15. Conținutul de HMWS al probelor agitate este subliniat în Tabelul 24. Formarea de HMWS a fost cea mai pronunțată în MSLN-hFc când s-au comparat preparatele K60RTrT. Pentru constructele pe bază de Fc, conținutul de HMWS ar putea fi redus prin scăderea pH-ului formulării (G40MSuT). Dar din nou, HMWS au fost mai abundente în MSLN-hFc decât în MSLN-scFc.

Tabelul 24: Privire de ansamblu asupra conținutului de HMWS în preparatele MSLN-HALB, - hFc și -scFc stresate (salt pH + 2w 37°C) determinat prin SE-UPLC

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%HMWS					
65h, 500 rpm	1,8	5,8	2,4	1,8	0,3

Exemplul 17:

MSLN-HALB, -hFc și -scFc formulate așa cum este descris în Exemplul 15 au fost expuse la lumină vizibilă și UVA (fotostres). Concentrația de proteine a totalizat 1 mg/ml în toate preparatele. Soluțiile de proteine au fost filtrate printr-un filtru cu dimensiunea porilor de 0,22 μm și umplute la 0,5 ml în flacoane de sticlă de tip I. MSLN-hALB și -scFc au fost supuse la două teste diferite, inclusiv lumină vizibilă 0,2 MLux / lumină UVA 25 W*h/m² și lumină vizibilă 1,2MLux / 173 W*h/m² respectiv. MSLN-hFc a fost supus la două teste diferite, inclusiv lumină vizibilă 0,2 MLux fără lumină UVA și lumină vizibilă 1,2 MLux / lumină UVA 30 W*h/m² respectiv. Temperaturile camerei au fost ajustate la 25°C. După expunerea la lumină, probele au fost analizate prin inspecție vizibilă (Tabelul 25), SE-UPLC (Tabelul 26) și cartografierea peptidelor (Tabelul 27). Metodele menționate mai sus au fost efectuate conform procedurilor descrise în Exemplul 15. Deși MSLN-HALB și -scFc au fost expuse la doze mai mari de lumină UVA, nu au fost observate particule proteice vizibile, în timp ce probele de MSLN-hFc au prezentat o particulă proteică vizibilă per flacon pentru ambele teste, indiferent de formulare.

Tabelul 25: Privire de ansamblu asupra numărului de particule proteice vizibile per flacon în preparate MSLN-hALB, -hFc și scFc determinat după expunerea la lumină

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
Număr de particule proteice vizibile (>125 μm) per flacon					
T0	0	0	1	0	0
Test 1	0 ¹⁾	1 ²⁾	1 ²⁾	0 ¹⁾	0 ¹⁾
Test 2	0 ³⁾	1 ⁴⁾	1 ⁴⁾	0 ³⁾	0 ³⁾
1) lumină vizibilă 0,2 MLux / lumină UVA 25 W*h/m ² , 2) lumină vizibilă 0,2 MLux fără					

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
Număr de particule proteice vizibile ($>125\mu\text{m}$) per flacon					
lumină UVA, ³⁾ lumină vizibilă 1,2 MLux / 173 W*h/m ² , ⁴⁾ lumină vizibilă 1,2 MLux / 30 W*h/m ²					

HMWS au crescut în următoarea ordine MSLN-hALB < -scFc < -hFc când proteina a fost formulată în K60RTrT. HMWS ar putea fi reduse pentru constructele pe bază de Fc atunci când este formulată în G40MSuT. Cu toate acestea, HMWS au fost din nou mai puțin pronunțate pentru MSLN-scFc. MSLN-hFc s-a dovedit a fi deosebit de sensibil la expunerea la lumină UVA.

Tabelul 26: Privire de ansamblu asupra conținutului de HMWS în preparatele MSLN-HALB, -hFc și -scFc determinat după expunerea la lumină prin SE-UPLC

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%HMWS					
T0	1,8	6,7	3,3	2,5	1,3
Test 1	1,8 ¹⁾	6,3 ²⁾	2,5 ²⁾	2,1 ¹⁾	0,4 ¹⁾
Test 2	2,0 ³⁾	11,0 ⁴⁾	2,1 ⁴⁾	2,4 ³⁾	0,3 ³⁾
¹⁾ lumină vizibilă 0,2 MLux / lumină UVA 25 W*h/m ² , ²⁾ lumină vizibilă 0,2 MLux fără lumină UVA, ³⁾ lumină vizibilă 1,2 MLux / 173 W*h/m ² , ⁴⁾ lumină vizibilă 1,2 MLux / 30 W*h/m ²					

Procentele modificărilor chimice ale regiunilor de determinare a complementarității (CDR) și ale porțiunii de extindere a timpului de înjumătățire (fie hALB, fie Fc) detectate în preparatele MSLN-HALB, -hFc și -scFc sunt indicate în Tabelul 27. Când s-au comparat condiții similare de formulare, a devenit evident că, în general, modificările chimice au fost cel mai puțin abundente în constructele scFc.

Tabelul 27: Privire de ansamblu asupra modificărilor chimice în preparate MSLN-HALB, -hFc, și -scFc determinate după expunere la lumină prin cartografierea peptidelor

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
%N101 deamidare (CDR)					
T0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
Test 1	0,2 ¹⁾	n.t.	0,3 ²⁾	n.t.	0,5 ¹⁾
Test 2	0,2 ³⁾	n.t.	0,6 ⁴⁾	n.t.	0,7 ⁴⁾
%N162 deamidare (CDR)					
T0	3,0	1,7	1,9	2,3	2,5
Test 1	3,0 ¹⁾	n.t.	2,1 ²⁾	n.t.	2,7 ¹⁾
Test 2	3,6 ³⁾	n.t.	3,1 ⁴⁾	n.t.	2,8 ³⁾

%M279 oxidare (CDR)					
T0	0,6	1,4	1,6	0,6	1,0
Test 1	0,8 ¹⁾	n.t.	2,6 ²⁾	n.t.	0,6 ¹⁾
Test 2	1,0 ³⁾	n.t.	6,3 ⁴⁾	n.t.	0,7 ⁴⁾
%N348 deamidare (CDR)					
T0	0,5	3,2	3,3	0,5	0,9
Test 1	0,4 ¹⁾	n.t.	2,7 ²⁾	n.t.	0,2 ¹⁾
Test 2	0,9 ³⁾	n.t.	3,9 ⁴⁾	n.t.	0,2 ⁴⁾

%N3b1 deamidare (CDR)					
T0	0,2	2,9	2,6	0,5	1,0
Test 1	0,4 ¹⁾	n.t.	2,0 ²⁾	n.t.	0,3 ¹⁾
Test 2	0,5 ³⁾	n.t.	2,6 ⁴⁾	n.t.	0,3 ⁴⁾
%M530 oxidare (Fc)					
T0	n.a.	3,9	4,1	2,6	3,2
Test 1	n.a.	n.t.	7,6 ²⁾	n.t.	3,1 ¹⁾

Construct	hALB	hFc		scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT	K60RTrT	G40MSuT
Test 2	n.a.	n.t.	21,8 ⁴⁾	n.t.	4,1 ³⁾
%M706 oxidare (Fc)					
T0	n.a.	3,2	3,6	1,5	2,1
Test 1	n.a.	n.t.	6,5 ²⁾	n.t.	1,8 ¹⁾
Test 2	n.a.	n.t.	17,8 ⁴⁾	n.t.	2,7 ³⁾

%M587 oxidare (hALB)					
T0	1,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Test 1	1,5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Test 2	2,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
%M623 oxidare (hALB)					
T0	1,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Test 1	4,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Test 2	4,1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

%M796 oxidare (hALB)					
T0	1,4	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Test 1	2,1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Test 2	3,1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
%M829 oxidare (hALB)					
T0	8,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Test 1	31,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Test 2	25,2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. = nu se aplică; n.t. = netestat

Exemplul 18:

MSLN-hALB a fost formulat în K60RTrT și MSLN-scFc a fost formulat în G40MSuT conform procedurii descrise în Exemplul 15. Concentrațiile de proteine au totalizat 0,05 mg/ml. Recipientele din sticlă (borosilicat, tip I, flacon de 13 mm 3cc de la West, nr. art. 68000375) și recipientele de test din polipropilenă (2 ml cu inel O, de ex. de la Sarstedt, nr. art. 72.694.005) sunt umplute cu 500 μ l de soluție de testare. Soluția de testare a fost lăsată timp de cinci minute în primul recipient de testare. Apoi a fost eșantionată o alicotă de 150 μ l pentru analiză. Soluția de testare rămasă (350 μ l) a fost transferată secvențial dintr-un recipient de testare în altul (cinci recipiente în total). În fiecare flacon, soluția a fost lăsată timp de cinci minute înainte de următorul transfer. A fost folosit același vârf de pipetă pentru fiecare etapă de transfer. Același test a fost efectuat folosind sticle de polycarbonat de 30 ml (Nalgene, PCS-000295 cu închidere, PP/20-415/ZTPE). Pentru acest tip de recipient, primul recipient a fost umplut cu 5 ml. După ce a fost eșantionată o alicotă de 150 μ l, volumul rezidual a fost transferat dintr-un recipient de testare în altul (conform procedurii descrise mai sus). Probele extrase din recipientul #1 și #5 au fost analizate prin SE-UPLC (metoda așa cum este descrisă în Exemplul 15). În plus, detectarea proteinei a fost efectuată cu un detector PDA (280 nm) pentru a determina concentrațiile de proteine. Recuperarea procentuală a proteinei din fiecare recipient de testare este indicată de Tabelul 28. S-a arătat că recuperarea proteinei a fost mai pronunțată pentru MSLN-scFc decât pentru MSLN-hALB, indiferent de tipul de recipient.

Tabelul 28: Recuperarea proteinelor din diferite tipuri de recipiente pentru MSLN-HALB și -scFc determinată prin SE-UPLC

Construct	hALB	scFc
Formulare	K60RTrT	G40MSuT
% recuperare proteine (de la val. nominală)		
Sticlă de tip I	80,0	92,0
Polipropilenă	87,0	97,3
Polycarbonat	87,0	96,0

Exemplul 19:

MSLN-hALB a fost formulat în K60RTrT și MSLN-scFc a fost formulat în K60RTrT și G40MSuT conform procedurii descrise în Exemplul 15. Concentrația de proteină a totalizat 1,0 mg/ml. 1950 μ l din fiecare soluție de testare au fost adăugați cu 50 μ l dintr-o soluție standard de siliciu de 1000 ppm (Specpure de la AlfaAesar, nr. art. 38717) rezultând o îmbogățire de 25 ppm. O soluție de testare neîmbogățită a servit ca probă de control. Soluția de testare îmbogățită precum și proba de control au fost introduse în flacoane de sticlă de tip I de 3cc și au fost incubate la 37°C timp de 24 de ore. Toate probele au fost analizate prin SE-UPLC conform metodei descrise în Exemplul 15 pentru a cuantifica cantitatea de HMWS (Tabelul 29). Când au fost formulate în K60RTrT, MSLN-hALB și -scFc au prezentat creșteri similare ale HMWS la îmbogățirea cu siliciu. Pentru constructul scFc s-a putut demonstra că această creștere ar putea fi redusă prin scăderea pH-ului formulării la 4,0. Conform experimentelor preliminare, această abordare nu a fost fezabilă pentru MSLN-hALB, deoarece s-a dovedit a suferi fragmentare la valori ale pH-ului formulării de 5,0 și mai mici.

Tabelul 29: Privire de ansamblu asupra conținuturilor de HMWS în preparate MSLN-hALB, lu -scFc determinate prin SE-UPLC după îmbogățire cu 25 ppm silicon

Construct	hALB	scFc	
Formulare	K60RTrT	K60RTrT	G40MSuT
Δ %HMWS (comparativ cu martorul fără îmbogățire)			
25 ppm îmbogățire	1,0	1,0	0,2

Tabelul 30: Lista secvențelor

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
1.	Lin ker pe pti dic	arti fici ală	GGGG
2.	Lin	arti	GGGGS

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	ker pe pti dic	fici ală	
3.	Lin ker pe pti dic	arti fici ală	GGGGQ
4.	Lin ker pe pti dic	arti fici ală	PGGGGS
5.	Lin ker pe pti dic	arti fici ală	PGGDGS
6.	Lin ker pe pti dic	arti fici ală	SGGGGS
7.	Lin ker pe pti	arti fici ală	GGGGSGGGS

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	dic		
8.	Lin ker pe pti dic	arti fici ală	GGGGSGGGGS
9.	Lin ker pe pti dic	arti fici ală	GGGGSGGGGSGGGGS
10.	He xa his tidi nă	arti fici ală	HHHHHH
11.	CD R- L1 a F6 A	arti fici ală	GSSTGAVTSGYYPN
12.	CD R- L2 a F6 A	arti fici ală	GTKFLAP

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
13 . R- L3 a F6 A	CD R- H1 a F6 A	arti fici ală	ALWYSNRWV
14 . R- H1 a F6 A	CD R- H1 a F6 A	arti fici ală	IYAMN
15 . R- H2 a F6 A	CD R- H2 a F6 A	arti fici ală	RIRSKYNNYATYYADSVKS
16 . R- H3 a F6 A	CD R- H3 a F6 A	arti fici ală	HGNFGNSYVSFFAY
17 . al F6 A	VH al F6 A	arti fici ală	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN IYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFFAYWGQGLVTVSS

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
18 .	VL al F6 A	arti fici ală	QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
19 .	VH - VL a F6 A	arti fici ală	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNIYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFFAYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGQTVVTQEPSTVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGYYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWV FGGGTKLTVL
20 .	CD R- L1 a H2 C	arti fici ală	GSSTGAVTSGYYPN
21 .	CD R- L2 a H2 C	arti fici ală	GTKFLAP
22 .	CD R- L3 a H2 C	arti fici ală	ALWYSNRWV

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
23 .	CD R- H1 a H2 C	arti fici ală	KYAMN
24 .	CD R- H2 a H2 C	arti fici ală	RIRSKYNNYATYYADSVKD
25 .	CD R- H3 a H2 C	arti fici ală	HGNFGNSYISYWAY
26 .	VH al H2 C	arti fici ală	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS
27 .	VL al H2 C	arti fici ală	QTVVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
28 .	VH -	arti fici	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	VL a H2 C	ală	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSTVVTQEPSTLTVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGKKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVF GGGTKLTVL
29 .	CD R- L1 a HI E	arti fici ală	GSSTGAVTSGYYPN
30 .	CD R- L2 a HI E	arti fici ală	GTKFLAP
31 .	CD R- L3 a HI E	arti fici ală	ALWYSNRWV
32 .	CD R- H1 a HI E	arti fici ală	SYAMN

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
33 .	CD R- H2 a HI E	arti fici ală	RIRSKYNNYATYYADSVKG
34 .	CD R- H3 a HI E	arti fici ală	HGNFGNSYLSFWAY
35 .	VH al HI E	arti fici ală	EVQLVESGGGLEQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSFWAYWGQGLTVTVSS
36 .	VL al HI E	arti fici ală	QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
37 .	VH - VL ale HI E	arti fici ală	EVQLVESGGGLEQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSFWAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGGQTVVTQEPSTVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWV GGGGTKLTVL
38 .	CD R- fici	arti fici	GSSTGAVTSGYYPN

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	L1 a G4 H	ală	
39 .	CD R- L2 a G4 H	arti fici ală	GTKFLAP
40 .	CD R- L3 a G4 H	arti fici ală	ALWYSNRWV
41 .	CD R- H1 a G4 H	arti fici ală	RYAMN
42 .	CD R- H2 a G4 H	arti fici ală	RIRSKYNNYATYYADSVKG

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
43 . R- H3 a G4 H	CD arti fici ală		HGNFGNSYLSYFAY
44 . al G4 H	VH arti fici ală		EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSYFAYWGQGLTVTVSS
45 . al G4 H	VL arti fici ală		QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
46 . - VL ale G4 H	VH arti fici ală		EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNRYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSYFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSTLVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVF GGGTKLTVL
47 . R- L1 a A2 J	CD arti fici ală		RSSTGAVTSGYYPN
48 . R- fici	CD arti fici		ATDMRPS

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	L2 a A2 J	ală	
49 .	CD R- L3 a A2 J	arti fici ală	ALWYSNRWV
50 .	CD R- H1 a A2 J	arti fici ală	VYAMN
51 .	CD R- H2 a A2 J	arti fici ală	RIRSKYNNYATYYADSVKK
52 .	CD R- H3 a A2 J	arti fici ală	HGNFGNSYLSWWAY

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
53 .	VH al A2 J	arti fici ală	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFENVYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKKRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWWAYWGQGLTVTVSS
54 .	VL al A2 J	arti fici ală	QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGATDMRPSGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGKLTVL
55 .	VH - VL ale A2 J	arti fici ală	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFENVYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKKRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSWWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSTLVSPGGTVTL TCRSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGATDMRPSGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWV FGGKLTVL
56 .	CD R- L1 a E1 L	arti fici ală	GSSTGAVTSGYYPN
57 .	CD R- L2 a E1 L	arti fici ală	GTKFLAP
58 .	CD R- fici	arti fici	ALWYSNRWV

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	L3 a E1 L	ală	
59 .	CD R- H1 a E1 L	arti fici ală	KYAMN
60 .	CD R- H2 a E1 L	arti fici ală	RIRSKYNNYATYYADSVKS
61 .	CD R- H3 a E1 L	arti fici ală	HGNFGNSYTSYYAY
62 .	VH al E1 L	arti fici ală	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRFTISRDDSKNT AYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYTSYYAYWGQGTLLTVSS
63 .	VL al	arti fici	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGGV

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	E1 L	ală	
			QPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
64 .	VH - VL ale E1 L	arti fici ală	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKSRTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYTSYYAYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
65 .	CD R- L1 a E2 M	arti fici ală	RSSTGAVTSGYYPN
66 .	CD R- L2 a E2 M	arti fici ală	ATDMRPS
67 .	CD R- L3 a E2 M	arti fici ală	ALWYSNRWV

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
68 .	CD R- H1 a E2 M	arti fici ală	GYAMN
69 .	CD R- H2 a E2 M	arti fici ală	RIRSKYNNYATYYADSVKE
70 .	CD R- H3 a E2 M	arti fici ală	HRNFGNSYLSWFAY
71 .	VH al E2 M	arti fici ală	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNGYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKERFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHRNFGNSYLSWFAYWGQGLVTVSS
72 .	VL al E2 M	arti fici ală	QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTSGYYPNWWQKPGQAPRGLIGATDMRPSGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
73 .	VH -	arti fici	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	VL ale E2 M	ală	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNGYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKERFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHRNFGNSYLSWFAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLVSPGGTVTL TCRSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGATDMRPSGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVF GGGTKLTVL
74	CD R- L1 a F7 O	arti fici ală	GSSTGAVTSGYYPN
75	CD R- L2 a F7 O	arti fici ală	GTKFLAP
76	CD R- L3 a F7 O	arti fici ală	ALWYSNRWV
77	CD R- H1 a F7 O	arti fici ală	VYAMN

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
78 . R- H2 a F7 O	CD arti fici ală	RIRSKYNNYATYYADSVKK	
79 . R- H3 a F7 O	CD arti fici ală	HGNFGNSYISWWAY	
80 . F7 O	VH al fici ală	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFENVYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKKRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISWWAYWGQGLTVTVSS	
81 . F7 O	VL al fici ală	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGKTLTVL	
82 . - VL ale F7 O	VH fici ală	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFENVYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKKRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISWWAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGKTLTVL	
83 . R- fici	CD arti fici	GSSTGAVTSGNYPN	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	L1 a F1 2Q	ală	
84 .	CD R- L2 a F1 2Q	arti fici ală	GTKFLAP
85 .	CD R- L3 a F1 2Q	arti fici ală	VLWYSNRWV
86 .	CD R- H1 a F1 2Q	arti fici ală	SYAMN
87 .	CD R- H2 a F1 2Q	arti fici ală	RIRSKYNNYATYYADSVKG

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
88 . R- H3 a F1 2Q	CD arti fici ală	HGNFGNSYVSWWAY	
89 . F1 2Q	VH arti fici ală	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGLTVTVSS	
90 . F1 2Q	VL arti fici ală	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	
91 . - VL ale F 12 Q	VH - VL ale F 12 Q	arti fici ală EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	
92 . R- L1 a I2 C	CD arti fici ală	GSSTGAVTSGNYPN	
93	CD arti	GTKFLAP	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
.	R- L2 a 12 C	fici ală	
94 .	CD R- L3 a	arti fici ală	VLWYSNRWV
	I2 C		
95 .	CD R- H1 a I2 C	arti fici ală	KYAMN
96 .	CD R- H2 a I2 C	arti fici ală	RIRSKYNNYATYYADSVKD
97 .	CD R- H3 a I2	arti fici ală	HGNFGNSYISYWAY

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	C		
98 .	VH al I2 C	arti fici ală	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSS
99 .	VL al I2 C	arti fici ală	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
10 0.	VH - VL ale I2 C	arti fici ală	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVF GGGTKLTVL
10 1.	VH al F1 2q	arti fici ală	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT AYLQMNLSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGLVTVSS
10 2.	VL al F1 2q	arti fici ală	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
10 3.	F1 2q	sc Fv	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT AYLQMNLSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGLVTVSSGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVF GGGTKLTVL

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
10 4.	HA LB	um an ă	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVDLT VHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
10 5.	HA LB	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVDLT VHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAAMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
10 6.	HA LB	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVDLT VHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL
10 7.	HA LB	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVDLT VHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEDVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPHLVAASKAALGL
10 8.	HA LB	arti fici ală	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
			DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSI SSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL I KQNC ELF EQLGE YKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTES LVNRRPCFSA LGVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL
10 9.	HA LB 25 3	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSI SSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL I KQNC ELF EQLGE YKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTES LVNRRPCFSA LGVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL
11 0.	HA LB 13 1	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSI SSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL I KQNC ELF EQLGE YKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTES LVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
11 1.	HA LB 13 5	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSI SSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL I KQNC ELF EQLGE YKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTES LVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPHLVAASKAALGL
11 2.	HA LB 13 3	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSI SSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNL I KQNC ELF EQLGE YKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS DRVTKCCTES LVNRRPCFSA LEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASKAALGL

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
11 3.	HA LB 23 4	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACL LPKLDELDRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVDYVVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASKAALGL
11 4.	HA LB C3 4S	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACL LPKLDELDRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVDYVVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
11 5.	HA LB 7 C3 4S	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACL LPKLDELDRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVDYVVPKEFNAGTFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
11 6.	HA LB 09 8 C3 4S	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPPLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACL LPKLDELDRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVDYVVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL
11 7.	HA LB 11	arti fici ală	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	4 C3 4S		DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALDVEDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPHLVAASKAALGL
11 8.	HA LB 25 4 C3 4S	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALDVEDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL
11 9.	HA LB 25 3 C3 4S	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALDVEDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL
12 0.	HA LB 13 1 C3 4S	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALDVEDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPHLVAASQAALGL
12 1.	HA LB 13 5 C3	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQOSPFDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALDVEDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPHLVAASKAALGL

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	4S		
12 2.	HA LB 13 3 C3 4S	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTCECCQAADKAACL LPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGE YKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASKAALGL
12 3.	HA LB 23 4 C3 4S	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTCECCQAADKAACL LPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGE YKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASKAALGL
12 4.	HA LB C3 4A	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTCECCQAADKAACL LPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGE YKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAAFVEKCK ADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
12 5.	HA LB 7 C3 4A	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTCECCQAADKAACL LPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGE YKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAGTFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAAMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL
12 6.	HA LB 09	arti fici ală	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	8 C3 4A		DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL
12 7.	HA LB 11 4 C3 4A	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASKAALGL
12 8.	HA LB 25 4 C3 4A	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL
12 9.	HA LB 25 3 C3 4A	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL
13 0.	HA LB 13 1 C3	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIIFAQYLQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELRLDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASQAALGL

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
		4A	
13 1.	HA LB 13 5 C3 4A	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTCCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECCCKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGE YKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPHLVAASKAALGL
13 2.	HA LB 13 3 C3 4A	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTCCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECCCKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGE YKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASKAALGL
13 3.	HA LB 23 4 C3 4A	arti fici ală	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPFEDHV KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATL RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTCCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLECCCKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLY EYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGE YKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTES LVNRRPCFSALEVD ETYVPKEFNAETFTFHADI CTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCK ADDKETCFAEEGPKLVAASKAALGL
13 4.	Ab 15 6	arti fici ală	RDWDFDVFGGGTPVGG
13 5.	pe pti dă de leg are	arti fici ală	QRFVTGHFGGLXPANG

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	Fc Rn lini ară		
13 6.	pe pti dă de leg are Fc Rn lini ară Y	arti fici ală	QRFVTGHFGGLYPANG
13 7.	pe pti dă de leg are Fc Rn lini ară H	arti fici ală	QRFVTGHFGGLHPANG
13 8.	pe pti	arti fici	TGHFGGLHP

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	dă de leg are Fc Rn de ba ză H	ală	
13 9.	pe pti dă de leg are Fc Rn cicl ică H	arti fici ală	QRFCTGHFGGLHPCNG
14 0.	HC cor p de înc ruc ișa		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	re 1		
14 1.	LC cor p de înc ruc iș a re 1		GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVTLVLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSTMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
14 2.	HC cor p de înc ruc iș a re 2		ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSNFGTQT YTCNVDPKPSNTKVDKTVEPKSSDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDLNGLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSTMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
14 3.	LC cor p de înc ruc iș a re		GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWK SHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSEPKSSDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDLNGLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSTMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	2		
14 4.	He ter o- Fc lig an d Fc		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14 5.	He ter o- Fc par ten er Fc		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYDTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14 6.	Ma xic orp 1 țint ă Fc		EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQ YGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14 7.	Ma xic orp 1		EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQ YGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYDTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
		CD 3 Fc	
14 8.	Ma xic orp 2 țint ă Fc		EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGFSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14 9.	Ma xic orp 2		EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGFSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
		CD 3 Fc	DIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15 0.	Mo no Fc		APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN YDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15 1.	MS _1 D R1	VH C D R1	SSSYWYG
15 2.	MS _1 D	VH C D	SIYYSGITNYPNPSLKS

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
		R2	
15 3.	MS _1	VH C D R3	PSNYDAFDI
15 4.	MS _1	VL C D R1	TGSSSNIGAGYDVH
15 5.	MS _1	VL C D R2	GNSKRPS
15 6.	MS _1	VL C D R3	QSYDSSLGGWV
15 7.	MS _1	VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIQQPPKGLEWIGSIYYSGITNYPNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARPSNYDAFDIWGQGTMTVSS
15 8.	MS _1	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQVPGTAPKLLIYGNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGL QAEDEADYYCQSYDSSLGGWVFGGGTKLTVL
15 9.	MS _1	sc Fv	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIQQPPKGLEWIGSIYYSGITNYPNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARPSNYDAFDIWGQGTMTVSSGGGGSGGGSGGGGQSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSS SNIGAGYDVHWYQQVPGTAPKLLIYGNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGGWVFGGGT KLTVL

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
16 0.	MS _1	mo lec ulă bis pe cifi că	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIROPFGKLEWIGSIYYSGITNYPNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARPSNYDAFDIWGGTMVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSS SNIGAGYDVHWYQQVPGTAPKLLIYGNSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGGWVFGGGT KLTVLGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
16 1.	MS _2	VH C D R1	DHYMS
16 2.	MS _2	VH C D R2	YISSSGSTIYYADSVKG
16 3.	MS _2	VH	DLGPSFDY
		C D R3	
16 4.	MS _2	C D R1	RASQGISSWLA
16 5.	MS _2	VL C D R2	AASRLQS

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
16 6.	MS _2	C D R3	QQANSFPRT
16 7.	MS _2	VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQTPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDLGPSFDYWGQGS LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQG ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIDAASRLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTITSSLP
16 8.	MS _2	VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIDAASRLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTITSSLP EDFATYYCQQANSFPRTFGQGTKVEIK
16 9.	MS _2	sc Fv	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQTPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDLGPSFDYWGQGS LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQG ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIDAASRLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQANSFPRTFGQGTKVEIK
17 0.	MS _2	mo lec ulă bis pe cifi că	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQTPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDLGPSFDYWGQGS LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQG ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIDAASRLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQANSFPRTFGQGTKVEIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEPSTLVSPG GTVTITCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVL
17 1.	MS _3	C D R1	DYYMT
17 2.	MS _3	VH C D R2	YISSSGSTIYYADSVKG

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
17 3.	MS _3	VH C D R3	DRNSHFDY
17 4.	MS _3	VL C D R1	RASQGITRWLA
17 5.	MS _3	VL C D R2	AASVLQS
17 6.	MS _3	VL C D R3	QQSNSFPRT
17 7.	MS _3	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMTWIRQAPGKLEWISYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDNRNSHFDYWGQGTLLTVSS
17 8.	MS _3	VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGITRWLA WY QKPGKAPKLLIYAASVLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
			EDFATYYCQQSNSFPRTFGQGTKVEIK
17 9.	MS _3	SC Fv	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMTWIRQAPGKLEWISYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDNRNSHFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ ITRWLA WY QKPGKAPKLLIYAASVLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSNSFPRTFGQGTKVEIK

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
18 0.	MS _3	mo lec ulă bis pe cifi că	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS₃DYMTWIRQAPGKGLEWISYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARD₃RNSHFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGD₃RVTITCRASQG ITRWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASVLQSGVPSRFS₃SGSGTDFTLTIS₃SLQPEDFATYYCQ₃QSN₃SFRTFGQG₃TKVEIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS₃CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR₃D DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGT₃VVTQEP₃SLTVSPG GTVTLTCGSSTGAVTS₃GNYPNWVQKPGQAPRGLIGG₃TKFLAPGT₃PARFSGSLLGKKAALT₃LSGVQPEDEAEYYC₃VLWYS NRWVFGGGTKLTVL
18 1.	MS _4	VH C D R1	DYYMT
18 2.	MS _4	VH C D R2	YISSSGSTIYYADSVKG
18 3.	MS _4	VH C D R3	DRNSHFDY
18 4.	MS _4	VL C D R1	RASQGINTWLA
18 5.	MS _4	VL C D R2	GASGLQS

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
18 6.	MS _4 D R3	VL C D R3	QQAKSFPRT
18 7.	MS _4	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLF LQMNSLRAEDTAVYYCARDNRSHFDYWGQGLTVTVSS
18 8.	MS _4	VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINTWLAWYQQKPKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKSFPRTFGQGTKVEIK
18 9.	MS _4	sc Fv	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLF LQMNSLRAEDTAVYYCARDNRSHFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQG INTWLAWYQQKPKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKSFPRTFGQGTKVEIK
19 0.	MS _4	mo lec ulă bis pe cifi că	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIRQAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLF LQMNSLRAEDTAVYYCARDNRSHFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQG INTWLAWYQQKPKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAKSFPRTFGQGTKVEIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDREFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGQTVVVTQEPSTLVSPG GTVTITCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVL
19 1.	MS _5 D R1	VH C D R1	DHYMS
19 2.	MS _5	VH C	YISSSGGIIYYADSVKKG

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
		D R2	
19 3.	MS _5	VH C D R3	DVGSHFDY
19 4.	MS _5	VL C D R1	RASQDISRWLA
19 5.	MS _5	VL C D R2	AASRLQS
19 6.	MS _5	VL C D R3	QQAКСFPRT
19 7.	MS _5	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKLEWFSYISSSGGIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDVGSHFDYWGQGLVTVSS
19 8.	MS _5	VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISRWLAWYQQKPGKAPKLLISAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE EDFAIYYCQQAКСFPRTFGQGTKVEIK
19 9.	MS _5	sc Fv	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKLEWFSYISSSGGIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDVGSHFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQD ISRWLAWYQQKPGKAPKLLISAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAIYYCQQAКСFPRTFGQGTKVEIK

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
20 0.	MS _5	mo lec ulă bis pe cifi că	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS ₂ DHYMSWIRQAPGKGLEWFSYISSGGIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDVGSHFDYWGQGT ₁ LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQD ISRWLAWYQQKPGKAPKLLISAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ₁ ISSSLQPEDFAIYYCQQAKSFPRTEFGQGTKVEIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYISYWAYWGQGT ₁ LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGT ₁ VVTQEP ₁ SLTVSPG GT ₁ VLT ₁ CGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGG ₁ TKFLAPGT ₁ PARFSGSLLGGKAALTL ₁ SGVQPEDEAEYYC ₁ VLWYS NRWVFGGGTKLTVL
20 1.	MS _6	VH C D R1	DHYMS
20 2.	MS _6	VH C D R2	YISNSGSIIYYVDSVKG
20 3.	MS _6	VH C D R3	DVRTAFDY
20 4.	MS _6	VL C D R1	RASQSIGSWLA
20 5.	MS 6	VL	AASSLQS
		C	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
		D R2	
20 6.	MS _6	VL C D R3	QQANSFPRT
20 7.	MS _6	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS D H Y MSWIRQAPGKGLEWISYISNSGSI I IYYVDSVKGRFTISRDN A KNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDVRTAFDYWGQGLTVTVSS
20 8.	MS _6	VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTIS S LQPEDFATYYCQQANSFPRTFGQGTKVDIK
20 9.	MS _6	SC Fv	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS D H Y MSWIRQAPGKGLEWISYISNSGSI I IYYVDSVKGRFTISRDN A KNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDVRTAFDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTIS S LQPEDFATYYCQQANSFPRTFGQGTKVDIK
21 0.	MS _6	mo lec ulă bis pe cifi că	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS D H Y MSWIRQAPGKGLEWISYISNSGSI I IYYVDSVKGRFTISRDN A KNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDVRTAFDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQSIGSWLAWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTIS S LQPEDFATYYCQQANSFPRTFGQGTKVDIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEP S LTVSPG GTVTITCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVL
21 1.	MS _7	VH C D R1	SKFMT

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
21 2.	MS _7	VH C D R2	VIYSGGKTYADSVKG
21 3.	MS _7	VH C D R3	DSGGWGYFDY
21 4.	MS _7	VL C D R1	KSSQSVLYSSNNKNYLA
21 5.	MS _7	VL C D R2	WASTRES
21 6.	MS _7	VL C D R3	QQYYSTPPT
21 7.	MS _7	VH	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAVSGFTVSSKFTWVRQAPGKLEWVSVIYSGGKTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSSGGWGYFDYWGQGLVTVSS
21 8.	MS _7	VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDFRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPPTFGQGTKVEIK
21	MS	sc	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
9.	_7	Fv	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAVSGFTVSSKFMWVRQAPGKLEWVSVIYSGGKTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDSSGGWGYFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ SVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPPTFGQG TKVEIK
22 0.	MS _7	mo lec ulă bis pe cifi că	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAVSGFTVSSKFMWVRQAPGKLEWVSVIYSGGKTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDSSGGWGYFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ SVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPPTFGQG TKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGSGT VVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTL SGVQPEDEAEY YCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
22 1.	MS _8	VH C D R1	SY YWN
22 2.	MS _8	VH C D R2	RIYYNGNTYYNPSLKS
22 3.	MS _8	VH C D R3	PKLGIDAFDI
22 4.	MS _8	VI, C D R1	TGSSSNIGAGYDVH
22	MS	VL	GNSNRPS

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
5.	_8	C D R2	
22 6.	MS _8	VL C D R3	QSYDSSLSGWV
22 7.	MS _8	VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWNWIRQPPGKLEWIGRIYYNGNTYYNPSLKSrvTISGDTskNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARPKLGIDAFDIWGQGTMVTVSS
22 8.	MS _8	VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGL QAEDEADYYCQSYDSSLSGWVFGGGTKLTVL
22 9.	MS _8	sc Fv	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWNWIRQPPGKLEWIGRIYYNGNTYYNPSLKSrvTISGDTskNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARPKLGIDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSS NIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGWVFGGGTK LTVL
23 0.	MS _8	mo lec ulă bis pe cifi că	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWNWIRQPPGKLEWIGRIYYNGNTYYNPSLKSrvTISGDTskNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARPKLGIDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSS NIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGWVFGGGTK LTVLSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQTLVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVVTQEPFL TVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGTKLTVL
23 1.	MS LN um	um an ă	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	an ă v1 N M_ 00 58 23		MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPPNISSLSPRQLLGFPCEVSGLSTE RVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDADFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQ RLLPALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYGPSTW SVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPQSWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLI FYKK
			WELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLLETLKALLE VNKGHEMSPQVATLIDRFVKGGRQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPHEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKA RLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVR DWILRQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGP GPVLTVLALLLASTLA
23 2.	MS LN um ă an ă v2 N M_ 01 34 04	um an ă	MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPPNISSLSPRQLLGFPCEVSGLSTE RVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDADFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQ RLLPALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYGPSTW SVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPQSWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLI FYKK WELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLLETLKALLE VNKGHEMSPQAPRRPLPQVATLIDRFVKGGRQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPHEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQ LDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKA EERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGP GPVLTVLALLLASTLA
23 3.	MS LN um ă an ă	um an ă	MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPPNISSLSPRQLLGFPCEVSGLSTE RVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDADFSGPQACTHFFSRITKANVDLLPRGAPERQ RLLPALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYGPSTW SVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPQSWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLI FYKK WELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLLETLKALLE VNKGHEMSPQVATLIDRFVKGGRQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPHEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKA RLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVR DWILRQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSVQEALSGTPCLLGP GPVLTVLALLLASTLA

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	v6 AY 74 3 92 2		
23 4.	MS LN cy no v1 LM R C5 24 57	ma ca c	MALPMARPLSGCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRVLAGETRQEAAPLDGILTNPDIASLSPRQLLGFTCVEVSGLSTE LVQELAVALGQKNVKLSAEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDADFSGPQACTHFFSRVAKANVDLLPRGAPERQ RLLPAAALTCWGVRSLLSEADVRALGGLACDLPGRFVAESAENVLPRLVRCLGPLDQDQQAARAALQRGPPYPGPSTW SISTLDDLQSLLPVLGQPVIHSIPQGILAAWRQRSSRDPSWQQPEQTVLRPRFRRDVERTTTPPEKEVHEIDENLI FYKK RELEACVDAALLAAQMDRVDALPFTYEQLDVLKHKLDLYPQGYEPESVIRHLGHLFLKMSPEDIRKWNVTSLKALLK VSKGHEMSAQVATLIDRVVVGRLDQDKDTADTLTAFCPGCLCSLSPERLSSVPPSVIGAVRPQDLDTGPRQLDVLYPKA RLAFQNMMSGSEYFVKIRPFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRRREAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKVEEQHSPVR DWILKQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGYLILDLSVREALSGTPCLLGPVLTILALLLASTLA
23 5.	fac tor de pot enț are a me ga car ioci tel	um an ă	MALPTARPLLSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANPPNISSLSPRQLLGFPCEVSGLSTE RVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDADFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQ RLLPAAALACWGVRSLLSEADVRALGGLACDLPGRFVAESAENVLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGPPYPGPSTW SVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGI VAAWRQRSSRDPSWRQPER

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	or N M 00 58 23		
23 6.	MS LN , sci nd ată din N M_ 00 58 23	um an ă	EVEKTACPSGKKAREIDESLI FYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIOHLGYL FLKMSPEDIRKWNVTSLKALLEVNGHEMSFQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTA FYPGYLCSL SPEELSSVPFS SIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLT VAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALS
23 7.	sci nd are C- ter mi nal ă N M	um an ă	GTPCLLGPGPVLTVLALLLASTLA

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	00 58 23		
23 8.	MS LN -E 1	um an ă Y	EVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFT
23 9.	MS LN -E 2	um an ă	EQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDI
24 0.	MS LN -E 3	um an ă	RKWNVTSLETLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTL TAFYPGYLCSLSPEELSSVP
24 1.	MS LN -E 4	um an ă	PSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLG
24 2.	MS LN -E 5	um an ă	GAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGP
24 3.	MS LN -E 6	um an ă	HVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDLTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSM QEAL

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
24 4.	MS LN -E 1+ 2	um an ă	EVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFT YEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYL FLKMSPEDI
24 5.	MS LN -E 2+ 3	um an ă	EQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVKGQGLD KDTLDTLTAFFPYGLCSLSPEELSSVP
24 6.	hu orl MS LN -E 1 mu	arti fici ală	MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPPNISSLSPRQLLGFPCEVSGLSTE RVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDASFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQ RLLPAAALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYGPSTW SVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIWAARQRSSRDPSWRQPRTILRPRFRDRAEQKACPPGKEPYKVEDLIFYQN WELEACVDGTMLARQMDLVNEIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLKALLE VNKGHEMSPQVATLIDRFVKGQGLDKDTLDTLTAFFPYGLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKA RLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVR DWILRQRQDDDLTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGGPVLTVLALLLASTLA
24 7.	hu orl MS LN - E2 mu	arti fici ală	MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPPNISSLSPRQLLGFPCEVSGLSTE RVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDASFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQ RLLPAAALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYGPSTW SVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIWAARQRSSRDPSWRQPRTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKK WELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLSIFKHKLDKTYPQGYPESLIQQLGHFFRYVSPEDIRKWNVTSLKALLE VNKGHEMSPQVATLIDRFVKGQGLDKDTLDTLTAFFPYGLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKA RLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVR DWILRQRQDDDLTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGGPVLTVLALLLASTLA
24 8.	hu orl MS LN	arti fici ală	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	- E3 mu		MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPPNISSLSRQLLGFPCEVSGLSTE RVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDADFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQ RLLPAAALACWGVRSLLSEADVRALGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYGPSTW SVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIWAARQRSSRDPQSWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLI FYKK WELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIHQWNVTSPTDVTLLK VSKGQKMNQAIALVACYLRGGGQLDEDMVKALGDIPLSYLCDFSPQDLHSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKA RLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVR DWILRQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGGPGPVLTVLALLLASTLA
24 9.	hu orl MS LN - E4 mu	arti fici ală	MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPPNISSLSRQLLGFPCEVSGLSTE RVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDADFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQ RLLPAAALACWGVRSLLSEADVRALGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYGPSTW SVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIWAARQRSSRDPQSWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLI FYKK WELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLKALLE
			VNKGHEMSPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSVMWLVGPDLDKCSQRHLGLLYQKA CSAFQNVSGLEYFEKIKTFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVR DWILRQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGGPGPVLTVLALLLASTLA
25 0.	hu orl MS LN - E5 mu	arti fici ală	MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPPNISSLSRQLLGFPCEVSGLSTE RVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDADFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQ RLLPAAALACWGVRSLLSEADVRALGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYGPSTW SVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIWAARQRSSRDPQSWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLI FYKK WELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLKALLE VNKGHEMSPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKA RLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGASVKDLRALSQHNVSMDIATFKRLQVDSLVLGSVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVR DWILRQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGGPGPVLTVLALLLASTLA
25 1.	hu orl MS LN -	arti fici ală	MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPPNISSLSRQLLGFPCEVSGLSTE RVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDADFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQ RLLPAAALACWGVRSLLSEADVRALGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYGPSTW SVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIWAARQRSSRDPQSWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLI FYKK WELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLKALLE VNKGHEMSPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKA RLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPNIVDLKTEEDKSPVR DWLFRQHQLDKDLRLGLGLQGGIPNGYLVLDLNVREAFSGTPCLLGGPGPVLTVLALLLASTLA

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	E6 mu		
25 2.	Fc mo no me r-1 +c/ -g		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25 3.	Fc mo no me r-2 +c/ g/d el GK		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
25 4.	Fc mo no me r-3 -		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25 5.	Fc mo no me		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	r-4 c/+ g/d el GK		
25 6.	Fc mo no me r-5 -c/- g		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25 7.	Fc mo no me r-6 -c/- g/d el GK		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
25 8.	Fc mo no me r-7 +c/ +g		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsa	Secvența
259.	Fc mo no me r-8 +c/ +g/ del G K		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
260.	sc Fc- 1		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
261.	sc Fc- 2		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
262.	sc Fc- 3		DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGGGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
263.	sc Fc-		

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
26 8.	MS _1 xC D3 - pe sc Fc	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLQESGPGILVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIQPPGKGLEWIGSIYYSGITNYPNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARPSNYDAFDIWGQGTMTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSS SNIGAGYDVHWYQQVPGTAPKLLIYGN SKRPSGVPDRFSGSKSGTSASIAITGLQAEDEADYYCQSYDSSIGGWVFGGGT KLTVLSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYH TQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAK KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK
26 9.	MS _Ix CD 3 - bis sc Fc del GK	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLQESGPGILVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIQPPGKGLEWIGSIYYSGITNYPNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARPSNYDAFDIWGQGTMTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSS SNIGAGYDVHWYQQVPGTAPKLLIYGN SKRPSGVPDRFSGSKSGTSASIAITGLQAEDEADYYCQSYDSSIGGWVFGGGT
			KLTVLSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYH TQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK
27 0.	MS _1 _C	Mo lec ulă	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
		Cx CD 3- sc Fc E	bis pe cifi că HL E QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIROP PPGKCLEWIGSIYYSGITNYPNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARPSNYDAFDIWGQGMVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSS SNIGAGYDVHWYQQVPGTAPKLLIYGN SKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGGWVFGCGT KLTVLSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTGSSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGKTCLTVLGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNY TQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQ GNVFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPGK
27 1.	MS _1 _C Cx CD 3- sc Fc _d el GK	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIROP PPGKCLEWIGSIYYSGITNYPNPSLKSRTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARPSNYDAFDIWGQGMVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSS SNIGAGYDVHWYQQVPGTAPKLLIYGN SKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGGWVFGCGT KLTVLSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGQTVVTQEPS LTVSPGGTVTLTGSSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGKTCLTVLGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNY TQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGN VFCSCVMHEALHNYTQKSLSLSPGK
27 2.	MS _2 xC D3 - sc Fc	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	 QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQTPGKLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNLSRAEDTAVYYCARDLGPSFDYWQGQSLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQG ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIDAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPEDFATYYCQANSPFRTFGQGTKVEIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGQTVVTQEPSLTVSPG

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
			GTVTLTGSSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
27 3.	MS _2 xC D3 - sc Fc _d el GK	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQTPGKGLEWVSYSISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDLGPSTFDYWQGQSLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQG ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIDAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPTFGQGTKEIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGTQVVTQEP SLTVSPG GTVTLTGSSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
27 4.	MS _2 _C Cx CD 3- sc Fc	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQTPGKCLEWVSYSISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDLGPSTFDYWQGQSLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQG ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIDAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPTFGCGTKVEIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGTQVVTQEP SLTVSPG NRWVFGGGTKLTVLGGGDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSLKTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
27 5.	MS _2 _C Cx	Mo lec ulă bis	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQTPGKCLEWVSYSISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDLGPSTFDYWQGQSLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQG ISSWLAWYQQKPGKAPKLLIDAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPTFGCGTKVEIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGTQVVTQEP SLTVSPG GTVTLTGSSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	CD 3- sc Fc _d el GK	pe cifi că HL E	
			EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
27 6.	MS _3 xC D3 - sc Fc	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMTWIRQAPGKLEWISYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLR AEDTAVYYCARDNRSHFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDI QMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQG ITRWLAWYQQKPKAPKLLIYAASVLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPQPEDFATYYCQQSNSFPRTFGQGTKEV GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGSGQTVVTQEP SLTVSPG GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGGDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
27 7.	MS _3 xC D3 - sc Fc	Mo lec ulă bis pe cifi că	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMTWIRQAPGKLEWISYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLR AEDTAVYYCARDNRSHFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDI QMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQG ITRWLAWYQQKPKAPKLLIYAASVLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPQPEDFATYYCQQSNSFPRTFGQGTKEV GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGSGQTVVTQEP SLTVSPG GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGGDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVD HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
		_d el GK	HL E
27 8.	MS _3 _C Cx CD 3- sc Fc	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMTWIRQAPGKCLEWISYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDNRSHFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQTQSPSSVSASVGDRTITCRASQG ITRWLAWYQQKPKAPKLLIYAASVLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSNSFPRTFGCGTKVEIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGQTVVTQEPSTVSPG GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG EVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
			LSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
27 9.	MS _3 _C Cx CD 3- sc Fc _d el GK	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMTWIRQAPGKCLEWISYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDNRSHFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQTQSPSSVSASVGDRTITCRASQG ITRWLAWYQQKPKAPKLLIYAASVLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSNSFPRTFGCGTKVEIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGQTVVTQEPSTVSPG GTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG EVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28	MS	Mo	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
0.	_4 xC D3 - sc Fc	lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS ₂ SYMTWIRQAPGKLEWLSYIS ₃ SSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLF LQMNSLRAEDTAVYYCARD ₂ NSHFDYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGD ₂ RVITITCRASQG INTWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS ₃ SLQPEDFATYYCQQA ₂ KSF ₂ PTFGQGTKEI ₂ KS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS ₂ CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR ₂ D DSKNTAYLQMN ₂ NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGT ₂ VVTQEP ₂ SLTVSPG GT ₂ VTLT ₂ CGSSTCAVTS ₂ GNYPN ₂ WVQQKPGQAPRGLIGG ₂ TKFLAPGTPARFSGSLLGGKAAL ₂ TL ₂ SGVQPEDEAEYYC ₂ VLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG ₂ V EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT ₂ VLH ₂ QDWLNGKEYCKK ₂ VS ₂ NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY ₂ TLPPSREEMTKN ₂ Q VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK ₂ TPPVLDSDGSFFLY ₂ SKLTVDKSRWQQGNV ₂ FS ₂ CSVMHEALHNHYTQ ₂ KSLS LSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT ₂ VLH ₂ QDWLNGKEYCKK ₂ VS ₂ NKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVY ₂ TLPPSREEMTKN ₂ QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK ₂ TPPVLDSDGSFFLY ₂ SKLTVDKSRWQQGNV ₂ FS ₂ C SVMHEALHNHYTQ ₂ KSLSLSPGK
28 1.	MS _4 xC D3 - sc Fc _d el GK	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS ₂ SYMTWIRQAPGKLEWLSYIS ₃ SSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLF LQMNSLRAEDTAVYYCARD ₂ NSHFDYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGD ₂ RVITITCRASQG INTWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS ₃ SLQPEDFATYYCQQA ₂ KSF ₂ PTFGQGTKEI ₂ KS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS ₂ CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR ₂ D DSKNTAYLQMN ₂ NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGT ₂ VVTQEP ₂ SLTVSPG GT ₂ VTLT ₂ CGSSTCAVTS ₂ GNYPN ₂ WVQQKPGQAPRGLIGG ₂ TKFLAPGTPARFSGSLLGGKAAL ₂ TL ₂ SGVQPEDEAEYYC ₂ VLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG ₂ V EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT ₂ VLH ₂ QDWLNGKEYCKK ₂ VS ₂ NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY ₂ TLPPSREEMTKN ₂ Q VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK ₂ TPPVLDSDGSFFLY ₂ SKLTVDKSRWQQGNV ₂ FS ₂ CSVMHEALHNHYTQ ₂ KSLS LSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT ₂ VLH ₂ QDWLNGKEYCKK ₂ VS ₂ NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
			VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK ₂ TPPVLDSDGSFFLY ₂ SKLTVDKSRWQQGNV ₂ FS ₂ CSV MHEALHNHYTQ ₂ KSLSLSPGK
28 2.	MS _4 _C Cx CD 3- sc	Mo lec ulă bis pe cifi că	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS ₂ SYMTWIRQAPGKLEWLSYIS ₃ SSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLF LQMNSLRAEDTAVYYCARD ₂ NSHFDYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGD ₂ RVITITCRASQG INTWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS ₃ SLQPEDFATYYCQQA ₂ KSF ₂ PTFGCGTKEI ₂ KS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLS ₂ CAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR ₂ D DSKNTAYLQMN ₂ NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGT ₂ VVTQEP ₂ SLTVSPG GT ₂ VTLT ₂ CGSSTCAVTS ₂ GNYPN ₂ WVQQKPGQAPRGLIGG ₂ TKFLAPGTPARFSGSLLGGKAAL ₂ TL ₂ SGVQPEDEAEYYC ₂ VLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG ₂ V EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT ₂ VLH ₂ QDWLNGKEYCKK ₂ VS ₂ NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY ₂ TLPPSREEMTKN ₂ Q VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK ₂ TPPVLDSDGSFFLY ₂ SKLTVDKSRWQQGNV ₂ FS ₂ CSVMHEALHNHYTQ ₂ KSLS LSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT ₂ VLH ₂ QDWLNGKEYCKK ₂ VS ₂ NKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVY ₂ TLPPSREEMTKN ₂ QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK ₂ TPPVLDSDGSFFLY ₂ SKLTVDKSRWQQGNV ₂ FS ₂ C SVMHEALHNHYTQ ₂ KSLSLSPGK

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	Fc	HL E	
28 3.	MS _4 _C Cx bis CD pe 3- sc Fc _d el GK	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFDYMTWIRQAPGKCLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLF LQMNSLR AEDTAVYYCARDNRSHFDYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQG INTWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTISSLQPEDFATYYCQQAQKSFRTFGCGTKVEIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEP SLTVSPG GTVTLTGSGSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYC VLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG V EVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL S LSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDV S HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28 4.	MS _5 xC D3 - sc Fc	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFDHYMSWIRQAPGKGLEWFSYISSSGGIIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLY LQMNSLR AEDTAVYYCARDVGSFHDYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQD ISRWLAWYQQKPGKAPKLLISAASRLQSGVPSRFSGSGSDTFTLTISSLQPEDFAIYYCQQAQKSFRTFGQGTKEIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGTQVVTQEP SLTVSPG GTVTLTGSGSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYC VLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG V EVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL S LSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVD V SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28 5.	MS _5 xC D3 - sc	Mo lec ulă bis pe cifi	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	Fc _d el GK	că HL E	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DHYMSWIRQ APGKLEWFSYISSSGGIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDVGSHFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASV GDRVTITCRASQD ISRWLAWYQQKPGKAPKLLISAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFAIYYCQQA KSFPRTFGQGTKEIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGT VV TQEP SLTV SPG GT VT LT CGSSTG AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG V EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLH QDWLNGKEYCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKG FYP SDIAVEWESNGQ PENNYK TPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC VMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLH QDWLNGKEYCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQ VY TLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKG FYP SDIAVEWESNGQ PENNYK TPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28 6.	MS _5 _C Cx bis CD pe 3- cifi sc că Fc HL E	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DHYMSWIRQ APGKLEWFSYISSSGGIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDVGSHFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASV GDRVTITCRASQD ISRWLAWYQQKPGKAPKLLISAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFAIYYCQQA KSFPRTFGCGTKVEIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGT VV TQEP SLTV SPG GT VT LT CGSSTG AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG V EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLH QDWLNGKEYCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKG FYP SDIAVEWESNGQ PENNYK TPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC VMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLH QDWLNGKEYCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPRE PQVY TLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKG FYP SDIAVEWESNGQ PENNYK TPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28 7.	MS _5 _C Cx bis CD pe 3- cifi sc că Fc del GK	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DHYMSWIRQ APGKLEWFSYISSSGGIIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDVGSHFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASV GDRVTITCRASQD ISRWLAWYQQKPGKAPKLLISAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFAIYYCQQA KSFPRTFGCGTKVEIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGT VV TQEP SLTV SPG GT VT LT CGSSTG AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG V EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLH QDWLNGKEYCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKG FYP SDIAVEWESNGQ PENNYK TPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC VMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLH QDWLNGKEYCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQ VY TLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKG FYP SDIAVEWESNGQ PENNYK TPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28 8.	MS _6 lec	Mo lec	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DHYMSWIRQ APGKLEWISYISNSGSIYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDV RTAFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASV GDRVTITCRASQ S

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
		xC D3	ulă
	- sc Fc	bis pe cifi că HL E	IGSWLAWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOANSFPRFTFGQGTKVDIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQEP SLTVSPG GTVTLTGSSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGGDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG V EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
28 9.	MS _6 xC D3 sc Fc del GK	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKLEWISYISNSGSI IYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDVRTAFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQS IGSWLAWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOANSFPRFTFGQGTKVDIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQEP SLTVSPG GTVTLTGSSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGGDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG V EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
29 0.	MS _6 _C Cx CD 3- sc Fc	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKLEWISYISNSGSI IYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDVRTAFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQS IGSWLAWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQOANSFPRFTFGCGTKVDIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQEP SLTVSPG GTVTLTGSSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGGDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG V EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
29	MS	Mo	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
1.	_6 _C Cx CD 3- sc Fc del GK	lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIRQAPGKCLEWISYISNSGSIYYVDSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDVRTAFDYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQS IGSWLAWYQQKPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPTFGCGTKVDIKS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR
			DSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGQTVVTQEPSLTVSPG GTVTLTGSSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYS NRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
29 2.	MS _7 xC D3 - sc Fc	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAVSGFTVSSKFMTWVRQAPGKLEWVSVIYSGGKTYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDSGGWGYFDYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQ SVLYSSNNKNYLAHYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYCQYYSTPPTFGQG TKVEIKSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTILVTVSSGGGGSGGGSGGGGQTVVTQEP SLTVSPGGTTLTLCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY YCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNH YTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
29 3.	MS _7 xC D3	Mo lec ulă bis	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	sc Fc del GK	pe cifi că HL E	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAVSGFTVSSKFTWVRQAPGKLEWVSVIYSGGKTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDSSGGWGYFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ SVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPPTFGQG TKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGTQVVTQEP SLTVSPGGTIVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY YCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYDGVVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCFSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
29 4.	MS _7 _C Cx CD 3- sc Fc	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAVSGFTVSSKFTWVRQAPGKLEWVSVIYSGGKTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDSSGGWGYFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ SVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPPTFGCG TKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGTQVVTQEP SLTVSPGGTIVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY
			YCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYDGVVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCFSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK
29 5.	MS _7 _C Cx CD 3- sc	Mo lec ulă bis pe cifi că	

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
	Fc del GK	HL E	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSKFTWVRQAPGKCLEWVSIVYSGGKTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSSGGWGYFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDFRSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPPTFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTGSSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
29 6.	MS — 8x CD bis 3 - sc Fc	Mo lec ulă bis - pe cifi că HL E	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWNWIRQPPGKLEWIGRIYYNGNTYYNP SLKSRVTISGDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARPKLGIDAFDIWGQGMVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSS NIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDFRSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGWVFGGGTKLTVLSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTGSSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
29 7.	MS _8 xC D3 bis sc Fc del GK	Mo lec ulă bis pe cifi că HL E	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWNWIRQPPGKLEWIGRIYYNGNTYYNP SLKSRVTISGDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARPKLGIDAFDIWGQGMVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSS NIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDFRSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGWVFGGGTKLTVLSSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTGSSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SE CV ID NR:	De scr ier e	Su rsă	Secvența
30 1.	Lin ker pe pti dic	Lin ker (G 4S) 5	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
30 2.	Lin ker pe pti dic	Lin ker (G 4S) 6	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
30 3.	Lin ker pe pti dic	Lin ker (G 4S) 7	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
30 4.	Lin ker pe pti dic	Lin ker (G 4S) 8	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS