

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036737**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.12.14**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201790087**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.06.19**

---

**(54) КОВАЛЕНТНО СВЯЗАННЫЕ ДИАТЕЛА, ОБЛАДАЮЩИЕ  
ИММУНОРЕАКТИВНОСТЬЮ С PD-1 И LAG-3, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

**(31)** **62/017,467**

**(56)** WO-A1-2014012479

**(32)** **2014.06.26**

WO-A2-2012162068

**(33)** **US**

WO-A2-2011159877

**(43)** **2017.04.28**

US-A1-20090060910

**(86)** **PCT/US2015/036634**

**(87)** **WO 2015/200119 2015.12.30**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**МАКРОДЖЕНИКС, ИНК (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Бонвини Эцио, Джонсон Лесли С.,  
Шан Калпана, Ла Мотте-Мос Росс,  
Мур Пол А., Койениг Скотт (US)**

**(74)** Представитель:  
**Карпенко О.Ю., Лыу Т.Н., Угрюмов  
В.М., Дементьев В.Н., Глухарёва  
А.О., Клюкин В.А., Строкова О.В.,  
Христофоров А.А. (RU)**

---

**(57)** Изобретение относится к биспецифичным диателам, которые содержат две или более полипептидных цепей и которые обладают по меньшей мере одним эпитоп-связывающим сайтом, который является иммуноспецифичным к эпитопу PD-1, и по меньшей мере одним эпитоп-связывающим сайтом, который является иммуноспецифичным к эпитопу LAG-3 (т. е. "биспецифичному диателу PD-1 × LAG-3"). Более предпочтительно настоящее изобретение относится к биспецифичным диателам, которые содержат четыре полипептидные цепи и которые обладают двумя эпитоп-связывающими сайтами, которые являются иммуноспецифичными к одному (или двум) эпитопу(-ам) PD-1, и двумя эпитоп-связывающими сайтами, которые являются иммуноспецифичными к одному (или двум) эпитопу(-ам) LAG-3 (т. е. "биспецифичному тетравалентному диателу PD-1 × LAG-3"). Настоящее изобретение также относится к таким диателам, которые дополнительно содержат иммуноглобулиновый Fc-домен ("биспецифичным Fc-диателам" и "биспецифичным тетравалентным Fc-диателам"). Диатела по настоящему изобретению способны одновременно связываться с PD-1 и с LAG-3, в частности поскольку такие молекулы расположены на поверхностях клеток человека. Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат такие диатела, и к способам, предусматривающим применение таких диател для лечения злокачественной опухоли и других заболеваний и состояний.

---

**036737 B1**

**036737 B1**

### Ссылка на родственные заявки

В соответствии с настоящей заявкой испрашивается приоритет согласно заявке на выдачу патента США № 62/017467 (поданной 26 июня 2014 года и находящейся на рассмотрении), содержание которой, таким образом, включено в настоящий документ с помощью ссылки в полном ее объеме.

### Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка включает один или несколько перечней последовательностей в соответствии с разделом 37 Свода Федеральных Правил, пунктом 1.821 и далее, которые сохранены на машиночитаемом носителе (имя файла: 1301\_0115PCT\_Sequence\_Listing\_ST25.txt, создан 2 июня 2015 года и имеет размер 50015 байт), при этом содержание файла включено в настоящий документ с помощью ссылки в полном его объеме.

### Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

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

Настоящее изобретение относится к биспецифичным диателям, которые содержат две или более полипептидных цепей и которые обладают по меньшей мере одним эпитоп-связывающим сайтом, который является иммуноспецифичным к эпитопу PD-1, и по меньшей мере одним эпитоп-связывающим сайтом, который является иммуноспецифичным к эпитопу LAG-3 (т. е. "биспецифичному диателу PD-1 × LAG-3"). Более предпочтительно настоящее изобретение относится к биспецифичным диателям, которые содержат четыре полипептидных цепи и которые обладают двумя эпитоп-связывающими сайтами, которые являются иммуноспецифичными к одному (или двум) эпитопу(-ам) PD-1, и двумя эпитоп-связывающими сайтами, которые являются иммуноспецифичными к одному (или двум) эпитопу(-ам) LAG-3 (т. е. "биспецифичному тетравалентному диателу PD-1 × LAG-3"). Настоящее изобретение также относится к таким диателям, которые дополнительно содержат иммуноглобулиновый Fc-домен ("биспецифичным Fc-диателям" и "биспецифичным тетравалентным Fc-диателям"). Диатела по настоящему изобретению способны одновременно связываться с PD-1 и с LAG-3, в частности поскольку такие молекулы расположены на поверхностях клеток человека. Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат такие диатела, и к способам, предусматривающим применение таких диател для лечения злокачественной опухоли и других заболеваний и состояний.

#### Описание уровня техники

##### I. Клеточные иммунные ответы.

Иммунная система у людей и других млекопитающих отвечает за обеспечение защиты от инфекции и заболевания. Такая защита обеспечивается как при помощи гуморального иммунного ответа, так и при помощи клеточного иммунного ответа. Гуморальный ответ приводит в результате к выработке антител и других биомолекул, которые способны распознавать и нейтрализовать чужеродные цели (антигены). В отличие от этого, клеточный иммунный ответ включает активацию макрофагов, натуральных киллеров (NK) и антиген-специфичных цитотоксических Т-лимфоцитов при помощи Т-клеток и высвобождение различных цитокинов в ответ на распознавание антигена (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules" *Immunolog. Res.* 28(1):39-48).

Способность Т-клеток оптимально опосредовать иммунный ответ к антигену нуждается в двух различных сигнальных взаимодействиях (Viglietta, V. et al. (2007) "Modulating Co-Stimulation" *Neurotherapeutics* 4:666-675; Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy" *Adv. Immunol.* 90:297-339). Во-первых, антиген, который расположен на поверхности антиген-презентирующих клеток (APC), должен быть презентируван антиген-специфичной наивной CD4<sup>+</sup> Т-клетке. В ходе такой презентации доставляется сигнал с помощью Т-клеточного рецептора (TCR), что заставляет Т-клетку инициировать иммунный ответ, который будет специфичным к презентируемому антигену. Во-вторых, серия костимулирующих и ингибирующих сигналов, опосредуемых взаимодействиями между APC и различными молекулами на поверхности Т-клеток, запускает сначала активацию и пролиферацию Т-клеток, а в конце их ингибирование. Таким образом, первый сигнал придает специфичность иммунному ответу, тогда как второй сигнал служит для определения природы, величины и продолжительности ответа.

Иммунная система жестко контролируется при помощи костимулирующих и коингибирующих лигандов и рецепторов. Такие молекулы обеспечивают второй сигнал для Т-клеточной активации и обеспечивают сбалансированную сеть положительных и отрицательных сигналов для максимизации иммунных ответов на инфекцию, при этом ограничивая иммунитет к собственному организму (Wang, L. et al. (March 7, 2011) "VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses" *J. Exp. Med.* 10.1084/jem.20100619:1-16; Lepenies, B. et al. (2008) "The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections," *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 8:279-288). Особую важность представляет связывание между лигандами B7.1 (CD80) и B7.2 (CD86) у антиген-презентирующей клетки и рецепторами CD28 и CTLA-4 у CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцита (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules," *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation" *Immunol. Rev.* 229:307-321). Связывание B7.1 или B7.2 с CD28 стимулирует Т-клеточную активацию; связывание B7.1 или B7.2 с CTLA-4 ингибирует такую активацию (Dong, C.

et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules" *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation" *Immunol. Rev.* 229:307-321; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited," *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548). CD28 постоянно экспрессируется на поверхности Т-клеток (Gross, J., et al. (1992) "Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse," *J. Immunol.* 149:380-388), тогда как экспрессия CTLA4 подвергается быстрой положительной регуляции после Т-клеточной активации (Linsley, P. et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement" *Immunity* 4:535-543). Поскольку CTLA4 является рецептором с более высокой аффинностью (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily" *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126), связывание сначала инициирует Т-клеточную пролиферацию (посредством CD28), а затем ингибирует ее (посредством начинающейся экспрессии CTLA4), тем самым ослабляя эффект, если пролиферация более не нужна.

Дальнейшие исследования лигандов рецептора CD28 привели к выявлению и описанию характеристик набора родственных молекул B7 ("суперсемейство B7") (Coyle, A.J. et al. (2001) "The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T-Cell Function" *Nature Immunol.* 2(3):203-209; Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited," *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548; Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," *Genome Biol.* 6:223.1-223.7; Loke, P. et al. (2004) "Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T-Cells" *Arthritis Res. Ther.* 6:208-214; Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy" *Adv. Immunol.* 90:297-339; Flies, D.B. et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity" *J. Immunother.* 30(3):251-260; Agarwal, A. et al. (2008) "The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance" *Curr. Opin. Organ Transplant.* 13:366-372; Lenschow, D.J. et al. (1996) "CD28/B7 System of T-Cell Costimulation," *Ann. Rev. Immunol.* 14:233-258; Wang, S. et al. (2004) "Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses," *Microbes Infect.* 6:759-766). В настоящее время известно несколько представителей этого семейства: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), индуцируемый костимулирующий лиганд (ICOS-L), лиганд запрограммированной гибели клеток 1 (PD-L1; B7-H1), лиганд запрограммированной гибели клеток 2 (PD-L2; B7-DC), B7-H3, B7-H4 и B7-H6 (Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands" *Genome Biol.* 6:223.1-223.7; Flajnik, M.F. et al. (2012) "Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC" *Immunogenetics* epub doi.org/10.1007/s00251-012-0616-2).

## II. PD-1.

Белок запрограммированной гибели клеток 1 ("PD-1") представляет собой мембранный белок I типа с массой примерно 31 кДа, являющийся представителем обширного семейства CD28/CTLA4 Т-клеточных регуляторов, которые участвуют в обширной отрицательной регуляции иммунных ответов (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death" *EMBO J.* 11:3887-3895; публикации заявки на выдачу патента США № 2007/0202100, 2008/0311117, 2009/00110667, патенты США № 6808710, 7101550, 7488802, 7635757, 7722868, РСТ публикация № WO 01/14557). По сравнению с CTLA4, PD-1 - больше.

PD-1 экспрессируется на активированных Т-клетках, В-клетках и моноцитах (Agata, Y. et al. (1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes" *Int. Immunol.* 8(5):765-772; Yamazaki, T. et al. (2002) "Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells And APC" *J. Immunol.* 169:5538-5545) и на низких уровнях у натуральных Т-киллеров (NK) (Nishimura, H. et al. (2000) "Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice," *J. Exp. Med.* 191:891-898; Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298).

Внеклеточный участок PD-1 состоит из отдельного иммуноглобулинового (Ig) домена V с 23% идентичностью с эквивалентным доменом в CTLA4 (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity" *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298). Внеклеточный домен IgV находится за трансмембранным участком и внутриклеточным концом. Внутриклеточный конец содержит два сайта фосфорилирования, расположенных в иммунорецепторном тирозиновом ингибирующем мотиве и иммунорецепторном тирозиновом переключающем мотиве, что свидетельствует, что PD-1 оказывает отрицательную регуляцию на сигналы TCR (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death," *EMBO J.* 11:3887-3895; Blank, C. et al. (Epub 2006 Dec 29) "Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer," *Immunol. Immunother.* 56(5):739-745).

PD-1 опосредует ингибирование иммунной системы при помощи связывания с B7-H1 и B7-DC (Flies, D.B. et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity" *J. Immunother.* 30(3):251-260; патенты США № 6803192, 7794710, публикации заявок на выдачу патентов США № 2005/0059051, 2009/0055944, 2009/0274666, 2009/0313687, РСТ публикации № WO 01/39722, WO 02/086083).

B7-H1 и B7-DC представляют собой связывающиеся лиганды, которые обширно экспрессируются на поверхностях мышечных и человеческих тканей, таких как сердечная, плацентарная, мышечная ткань,

ткани эмбриональной печени, селезенки, лимфоузлов и тимуса, а также мышины печени, легкого, почки, на островковых клетках поджелудочной железы и ткани тонкого кишечника (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298). У людей экспрессия белка B7-H1 была обнаружена в эндотелиальных клетках (Chen, Y. et al. (2005) "Expression of B7-H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells" *Nephron. Exp. Nephrol.* 102:e81-e92; de Haij, S. et al. (2005) "Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell Responses Via ICOS-L And B7-H1" *Kidney Int.* 68:2091-2102; Mazanet, M.M. et al. (2002) "B7-H1 Is Expressed By Human Endothelial Cells And Suppresses T-Cell Cytokine Synthesis" *J. Immunol.* 169:3581-3588), миокарде (Brown, J.A. et al. (2003) "Blockade Of Programmed Death-1 Ligands On Dendritic Cells Enhances T-Cell Activation And Cytokine Production" *J. Immunol.* 170:1257-1266), синцитиотрофобластах (Petroff, M.G. et al. (2002) "B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface" *Placenta* 23:S95-S101). Эти молекулы также экспрессируются резидентными макрофагами некоторых тканей, макрофагами, которые были активированы при помощи интерферона (IFN)- $\gamma$  или фактора некроза опухоли (TNF)- $\alpha$  (Latchman, Y. et al. (2001) "PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation" *Nat. Immunol* 2:261-268), и в опухолях (Dong, H. (2003) "B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity," *J. Mol. Med.* 81:281-287).

Было обнаружено, что взаимодействие между B7-H1 и PD-1 обеспечивает ключевой отрицательный костимулирующий сигнал для T- и B-клеток (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298) и выполняет роль индуктора гибели клеток (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death," *EMBO J.* 11:3887-3895; Subudhi, S.K. et al. (2005) "The Balance Of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition" *J. Molec. Med.* 83:193-202). Более конкретно, было обнаружено, что взаимодействие между рецептором PD-1 и лигандом B7-H1 в низких концентрациях приводит в результате к передаче ингибирующего сигнала, который сильно ингибирует пролиферацию антиген-специфичных CD8<sup>+</sup> T-клеток; взаимодействия с PD-1 в более высоких концентрациях не ингибируют T-клеточную пролиферацию, но значительно уменьшают выработку многих цитокинов (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily" *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126). Было обнаружено, что T-клеточная пролиферация и выработка цитокинов как покоящимися, так и ранее активированными CD4 и CD8 T-клетками, и даже наивными T-клетками из пуповинной крови, ингибируется растворимыми гибридными белками B7-H1-Fc (Freeman, G.J. et al. (2000) "Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation " *J. Exp. Med.* 192:1-9; Latchman, Y. et al. (2001) "PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation" *Nature Immunol.* 2:261-268; Carter, L. et al. (2002) "PD-LPD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T-cells and is overcome by IL-2," *Eur. J. Immunol.* 32(3):634-643; Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126).

Было выдвинуто предположение, что благодаря роли B7-H1 и PD-1 в ингибировании T-клеточной активации и пролиферации, такие биомолекулы могут служить в качестве терапевтических целей для лечения воспаления и злокачественной опухоли. Таким образом, было предложено применение антител к PD-1 для лечения инфекций и опухолей и положительного модулирования адаптивного иммунного ответа (см. публикации заявок на выдачу патентов США № 2010/0040614, 2010/0028330, 2004/0241745, 2008/0311117, 2009/0217401, патенты США № 7521051, 7563869, 7595048, РСТ публикации № WO 2004/056875, WO 2008/083174). Об антителах, способных иммуноспецифично связываться с PD-1, сообщалось в работах Agata, T. et al. (1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes," *Int. Immunol.* 8(5):765-772, и Berger, R. et al. (2008) "Phase I Safety And Pharmacokinetic Study Of CT-011, A Humanized Antibody Interacting With PD-1, In Patients With Advanced Hematologic Malignancies" *Clin. Cancer Res.* 14(10):3044-3051 (см. также патенты США № 8008449 и 8552154, патентные публикации США № 2007/0166281, 2012/0114648, 2012/0114649, 2013/0017199, 2013/0230514 и 2014/0044738 и патентные публикации РСТ WO 2003/099196, WO 2004/004771, WO 2004/056875, WO 2004/072286, WO 2006/121168, WO 2007/005874, WO 2008/083174, WO 2009/014708, WO 2009/073533, WO 2012/135408, WO 2012/145549 и WO 2013/014668).

### III. LAG-3.

Продукт гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3, CD223) представляет собой рецепторный белок клеточной поверхности, который экспрессируется активированными CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T-клетками и NK-клетками и конститутивно экспрессируется плазматоидными дендритными клетками; LAG-3 не экспрессируется B-клетками, моноцитами или любыми другими тестируемыми типами клеток (Workman, C.J. et al. (2009) "LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis" *J. Immunol.* 182(4):1885-1891).

Было обнаружено, что LAG-3 является близкородственным для T-клеточного корецептора CD4 (Grosso, J.F. et al. (2009) "Functionally Distinct LAG-3 and PD-1 Subsets on Activated and Chronically Stimulated CD8 T-Cells" *J. Immunol.* 182(11):6659-6669; Huang, C.T. et al. (2004) "Role Of LAGS In Regulatory T-Cells," *Immunity* 21:503-513; Workman, C.J. et al. (2009) "LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis," *J. Immunol.* 182(4): 1885-1891). Как и CD4, LAG-3 также связывается с молекулами MHC II класса, но со значительно более высокой аффинностью (Workman, C.J. et al. (2002) "Phenotypic Analysis Of The Murine CD4-Related Glycoprotein, CD223 (LAG-3)" *Eur. J. Immunol.* 32:2255-2263; Huard, B. et al.

(1995) "CD4/Major Histocompatibility Complex Class II Interaction Analyzed With CD4- And Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3)-Ig Fusion Proteins" *Eur. J. Immunol.* 25:2718-2721; Huard, B. et al. (1994) "Cellular Expression And Tissue Distribution Of The Human LAGS- Encoded Protein, An MHC Class II Ligand" *Immunogenetics* 39:213-217).

Исследования показали, что LAG-3 играет важную роль в отрицательной регуляции пролиферации, функционировании и гомеостазе Т-клеток (Workman, C.J. et al. (2009) "LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis" *J. Immunol.* 182(4): 1885-1891; Workman, C.J. et al. (2002) "Cutting Edge: Molecular Analysis Of The Negative Regulatory Function Of Lymphocyte Activation Gene-3" *J. Immunol.* 169:5392-5395; Workman, C.J. et al. (2003) "The CD4-Related Molecule, LAGS (CD223), Regulates The Expansion Of Activated T-Cells," *Eur. J. Immunol.* 33:970-979; Workman, C.J. (2005) "Negative Regulation Of T-Cell Homeostasis By Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223)" *J. Immunol.* 174:688-695; Hannier, S. et al. (1998) "CD3/TCR Complex-Associated Lymphocyte Activation Gene-3 Molecules Inhibit CD3/TCR Signaling," *J. Immunol.* 161:4058-4065; Huard, B. et al. (1994) "Lymphocyte-Activation Gene 3/Major Histocompatibility Complex Class II Interaction Modulates The Antigenic Response Of CD4<sup>+</sup> T Lymphocytes" *Eur. J. Immunol.* 24:3216-3221).

Результаты исследований позволили сделать вывод, что ингибирование функции LAG-3 путем блокировки антителом может полностью обращать опосредованное LAG-3 ингибирование иммунной системы и частично восстанавливать эффекторную функцию (Grosso, J.F. et al. (2009) "Functionally Distinct LAGS and PD-1 Subsets on Activated and Chronically Stimulated CD8 T-Cells" *J. Immunol.* 182(11):6659-6669; Grosso, J.F. et al. (2007) "LAG-3 Regulates CD8<sup>+</sup> T-Cell Accumulation And эффекторная функция During Self And Tumor Tolerance" *J. Clin. Invest.* 117:3383-3392). Было обнаружено, что LAG-3 отрицательно регулирует размножение Т-клеток путем ингибирования индуцированных Т-клеточным рецептором (TCR) выбросов кальция и контролирует размер пула Т-клеток памяти (Matsuzaki, J. et al. (2010) "Tumor-Infiltrating NY-ESO-1-Specific CD8<sup>+</sup> T-Cells Are Negatively Regulated By LAGS And PD-1 In Human Ovarian Cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 107(17):7875-7880; Workman C.J., et al. (2004) "Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223) Regulates The Size Of The Expanding T-Cell Population Following Antigen Activation in vivo" *J. Immunol.* 172:5450-5455).

Несмотря на ранее описанные преимущества, сохраняется потребность в усовершенствованных композициях, способных сильнее заставлять иммунную систему организма атаковать клетки злокачественной опухоли или инфицированные патогеном клетки, особенно в более низких терапевтических концентрациях. И хотя адаптивная иммунная система может быть сильным защитным механизмом против злокачественной опухоли и заболевания, она часто приостанавливается иммуносупрессивными механизмами в опухолевом микроокружении, такими как экспрессия PD-1 и LAG-3. Коингибирующие молекулы, экспрессируемые клетками опухоли, иммунными и стромальными клетками в опухолевой среде, могут преимущественно уменьшать Т-клеточные ответы к клеткам злокачественной опухоли.

Как подробно описано далее, настоящее изобретение относится к решению такой потребности путем создания биспецифичного тетравалентного диатела PD-1 × LAG-3. Такие диатела способны связываться с молекулами PD-1 и LAG-3 на поверхности клеток, которые присутствуют на поверхностях истощенных и толерантных противоопухолевых эффекторных лимфоцитов, и таким образом уменьшать способность таких молекул на поверхности клеток связываться с их рецепторными лигандами. Фактически, биспецифичные диатела PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению способствуют блокировке опосредованного PD-1 и LAG-3 ингибирования иммунной системы и таким образом способствуют продолжительной активации иммунной системы. Это качество делает такие биспецифичные диателы полезными при лечении злокачественной опухоли и патоген-ассоциированных заболеваний и состояний. Настоящее изобретение относится к таким диателам и способам их применения.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 показано графическое представление доменов основного DART®.

На фиг. 2 показано графическое представление доменов Fc-несущих DART®.

На фиг. 3 показано графическое представление доменов Fc-DART®.

На фиг. 4 показано графическое представление доменов предпочтительного биспецифичного тетравалентного диатела PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению. Четыре полипептидные цепи, две из которых имеют домены полипептидных цепей 1 и 3, и две из которых имеют домены полипептидных цепей 2 и 4, образуют комплекс друг с другом с формированием диатела. Дисульфидные связи (показанные пунктирными линиями) ковалентно соединяют полипептидные цепи 1 и 2, полипептидные цепи 1 и 3 и полипептидные цепи 3 и 4. Варибельные домены легкой цепи и варибельные домены тяжелой цепи одной и той же полипептидной цепи направлены на различные эпитопы (либо PD-1, либо LAG-3), так что полученное в результате диатело имеет два эпитоп-связывающих домена, которые являются иммуноспецифичными к PD-1, и два эпитоп-связывающих домена, которые являются иммуноспецифичными к LAG-3.

На фиг. 5 показана диаграмма протокола оценки способности антител к PD-1 и к LAG-3 усиливать пролиферацию Т-клеток.

На фиг. 6 показано, что добавление PD-1 mAb 1 (5C4; BMS-936558), PD-1 mAb 2 (МК-3475; Merck, ламбролизумаб) и PD-1 mAb 3 (EH12.2H7; Dana Farber) в начале анализа алло-MLR индуцировало сильный Т-клеточный пролиферативный ответ в сравнении с контрольным антителом изотипа IgG1. Также показаны пролиферативные ответы, полученные при помощи PD-1 mAb 4 (CT-011; CureTech, BAT-1), mAb к CTLA и LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS). Иммунокомпетентные клетки (R) представляют собой пан-Т-клетки; стимулирующие клетки (S) представляют собой зрелые дендритные клетки (mDC).

На фиг. 7 показаны результаты оценки LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS) в отношении Т-клеточного пролиферативного потенциала либо в отдельности, либо в сочетании с PD-1 mAb 1 (5C4; BMS-936558), PD-1 mAb 2 (МК-3475; Merck, ламбролизумаб). Иммунокомпетентные клетки (R) представляют собой пан-Т-клетки; стимулирующие клетки (S) представляют собой зрелые дендритные клетки (mDC).

На фиг. 8 показано, что растворимый LAG-3 (shLAG-3) человека, который связывается с молекулами HLA II класса человека, экспрессируемыми как на APC, так и на CD4 Т-клетках, индуцировал сильный пролиферативный ответ по сравнению с контрольными лунками с изотипом IgG или иммунокомпетентными клетками (R) (пан-Т-клетками) плюс стимулятор (S) (зрелые дендритные клетки (mDC)).

На фиг. 9А-9В показано, что биспецифичные диатела PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению индуцировали высокоактивные Т-клеточные пролиферативные ответы по сравнению с mAb к PD-1 (5C4) или mAb к LAG-3 (25F7). На фиг. 9А показаны Т-клеточные пролиферативные ответы, полученные при помощи предпочтительных биспецифичных тетравалентных диател PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению (PD-1 × LAG-Fc-DART®-1 и PD-1 × LAG-Fc-DART®-2), PD-1 mAb 1 (5C4; BMS-936558), LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS), растворимого LAG-3 (ShLAG-3) человека, контрольных IgG, иммунокомпетентных+стимулирующих клеток (пан-Т-клеток и зрелых дендритных клеток; R+S) и стимулирующих клеток (зрелых дендритных клеток; S). На фиг. 9В показаны те же данные для PD-1 × LAG-Fc-DART®-1 и PD-1 × LAG-Fc-DART®-2, PD-1 mAb 1 (5C4; BMS-936558), LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS) и PD-1 mAb 1 (5C4; BMS-936558) + LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS) с использованием отличной шкалы по оси у.

#### **Краткое раскрытие настоящего изобретения**

Настоящее изобретение относится к биспецифичным диателам, которые содержат две или более полипептидных цепей и которые обладают по меньшей мере одним эпитоп-связывающим сайтом, который является иммуноспецифичным к эпитопу PD-1, и по меньшей мере одним эпитоп-связывающим сайтом, который является иммуноспецифичным к эпитопу LAG-3 (т. е. "биспецифичному диателу PD-1 × LAG-3"). Более предпочтительно настоящее изобретение относится к биспецифичным диателам, которые содержат четыре полипептидные цепи и которые обладают двумя эпитоп-связывающими сайтами, которые являются иммуноспецифичными к одному (или двум) эпитопу(-ам) PD-1, и двумя эпитоп-связывающими сайтами, которые являются иммуноспецифичными к одному (или двум) эпитопу(-ам) LAG-3 (т. е. "биспецифичному тетравалентному диателу PD-1 × LAG-3"). Настоящее изобретение также относится к таким диателам, которые дополнительно содержат иммуноглобулиновый Fc-домен ("биспецифичным Fc-диателам" и "биспецифичным тетравалентным Fc-диателам"). Диатела по настоящему изобретению способны одновременно связываться с PD-1 и с LAG-3, в частности поскольку такие молекулы расположены на поверхностях клеток человека. Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат такие диатела, и к способам, предусматривающим применение таких диател для лечения злокачественной опухоли и других заболеваний и состояний.

Подробнее, настоящее изобретение относится к биспецифичному Fc-диателу, способному иммуноспецифично связываться с эпитопом PD-1 и с эпитопом LAG-3, причем диатело содержит четыре полипептидные цепи, каждая из которых имеет N-конец и C-конец, и в котором:

(А) первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны с друг с другом, первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны с друг с другом, и третья и четвертая полипептидные цепи ковалентно связаны с друг с другом;

(В) каждая из первой и третьей полипептидных цепей диатела содержит в направлении от N-конца к С-концу вариабельный домен легкой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к PD-1 или LAG-3, вариабельный домен тяжелой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к LAG-3 или PD-1, облегчающий образование гетеродимера домен и домен CH2-CH3, причем вариабельные домены легкой цепи и вариабельные домены тяжелой цепи не способны ассоциироваться с формированием эпитоп-связывающего сайта, способного связывать эпитоп PD-1 или эпитоп LAG-3; и

(С) каждая из второй и четвертой полипептидных цепей диатела содержит в направлении от N-конца к С-концу вариабельный домен легкой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к PD-1 или LAG-3, вариабельный домен тяжелой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к LAG-3 или PD-1, и облегчающий образование гетеродимера домен, причем вариабельные домены легкой цепи и вариабельные домены тяжелой цепи не способны ассоциироваться с формированием эпитоп-связывающего сайта, способного связывать эпитоп PD-1 или эпитоп LAG-3; и в котором:

(I) (1) вариабельный домен легкой цепи первой полипептидной цепи и вариабельный домен тяжелой цепи второй полипептидной цепи ассоциируются с формированием первого эпитоп-связывающего сайта, а вариабельный домен тяжелой цепи первой полипептидной цепи и вариабельный домен легкой цепи второй полипептидной цепи ассоциируются с формированием второго эпитоп-связывающего сайта;

(2) вариабельный домен легкой цепи третьей полипептидной цепи и вариабельный домен тяжелой цепи четвертой полипептидной цепи ассоциируются с формированием третьего эпитоп-связывающего сайта и вариабельный домен тяжелой цепи третьей полипептидной цепи и вариабельный домен легкой цепи четвертой полипептидной цепи ассоциируются с формированием четвертого эпитоп-связывающего сайта;

причем два сформированных эпитоп-связывающих сайта способны иммуноспецифично связываться с эпитопом PD-1, а два сформированных эпитоп-связывающих сайта способны иммуноспецифично связываться с эпитопом LAG-3;

II. облегчающие образование гетеродимера домены у первой и второй полипептидных цепей отличаются и имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:17; и III. домены CH2-CH3 у первой и третьей полипептидных цепей ассоциируются с формированием Fc-домена.

Настоящее изобретение также относится к варианту осуществления такого биспецифичного Fc-диатела, в котором каждый из доменов CH2-CH3 у первой и третьей полипептидных цепей имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24.

Настоящее изобретение также относится к варианту осуществления таких биспецифичных Fc-диател, в которых вариабельный домен тяжелой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к LAG-3, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, а вариабельный домен легкой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к LAG-3, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

Настоящее изобретение также относится к варианту осуществления таких биспецифичных Fc-диател, в которых вариабельный домен тяжелой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к PD-1, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, а вариабельный домен легкой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к PD-1, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, которая содержит эффективное количество любого из указанных выше Fc-диател и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к варианту осуществления такой фармацевтической композиции, в которой эффективное количество биспецифичного Fc-диатела представляет собой количество, эффективное для лечения злокачественной опухоли у принимающего ее индивидуума, который нуждается в таком лечении.

Настоящее изобретение также относится к варианту осуществления таких фармацевтических композиций, причем злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль надпочечника, ассоциированную со СПИДом злокачественную опухоль, альвеолярную саркому мягких тканей, астроцитарную опухоль, злокачественную опухоль мочевого пузыря, злокачественную опухоль костей, злокачественную опухоль головного и спинного мозга, метастатическую опухоль головного мозга, злокачественную опухоль молочной железы, опухоль каротидного тельца, злокачественную опухоль шейки матки, хондросаркому, хордому, хромофобную почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному, злокачественную опухоль толстой кишки, колоректальную злокачественную опухоль, накожную доброкачественную фиброзную гистиоцитому, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпендимому, опухоль Юинга, внескелетную слизеподобную хондросаркому, несовершенный костный фиброгенез, фиброзную дисплазию кости, злокачественную опухоль желчного пузыря или желчного протока, гастриальную злокачественную опухоль, гестационную трофобластическую болезнь, эмбрионально-клеточную опухоль, злокачественную опухоль головы и шеи, гепатоклеточную карциному, опухоль островков поджелудочной железы, саркому Капоши, злокачественную опухоль почки, лейкоз, липому/доброкачественную липоматозную опухоль, липосаркому/злокачественную липоматозную опухоль, злокачественную опухоль печени, лимфому, злокачественную опухоль легкого, гранулобластому, меланому, менингиому, множественные эндокринные неоплазии, множественную миелому, миелодиспластический синдром, нейробластому, нейроэндокринные опухоли, злокачественную опухоль яичника, злокачественную опухоль поджелудочной железы, сосковидную карциному щитовидной железы, опухоль парашитовидных желез, злокачественную опухоль у детей, опухоль влагалища периферического нерва, феохромоцитому, опухоль гипофиза, злокачественную опухоль простаты, позднюю увеальную меланому, нарушение, связанное с разжижением крови, почечную метастатическую злокачественную опухоль, палочковидную опухоль, рабдомиосаркому, саркому, злокачественную опухоль кожи, саркому мягкой ткани, плоскоклеточную злокачественную опухоль, злокачественную опухоль желудка, синовиальную саркому, злокачественную опухоль яичка, тимусную карциному, тимому, метастатическую злокачественную опухоль щитовидной железы или злокачественную опухоль матки.

Настоящее изобретение также относится к варианту осуществления таких фармацевтических композиций, в которых эффективное количество биспецифичного Fc-диатела представляет собой количество, эффективное для лечения заболевания, ассоциированного с наличием патогена, у принимающего ее индивидуума, который нуждается в таком лечении.

Настоящее изобретение также относится к варианту осуществления такой фармацевтической композиции, причем указанным патогеном является бактерия, гриб или вирус.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения злокачественной опухоли, который предусматривает введение эффективного количества таких фармацевтических композиций нуждающемуся в этом индивидууму.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения заболевания, ассоциированного с наличием патогена, который предусматривает введение эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пунктов 8-9 формулы изобретения нуждающемуся в том индивидууму.

#### **Подробное раскрытие настоящего изобретения**

Настоящее изобретение относится к биспецифичным диателям, которые содержат две или более полипептидных цепей и которые обладают по меньшей мере одним эпитоп-связывающим сайтом, который является иммуноспецифичным к эпитопу PD-1, и по меньшей мере одним эпитоп-связывающим сайтом, который является иммуноспецифичным к эпитопу LAG-3 (т. е. "биспецифичному диателу PD-1 × LAG-3"). Более предпочтительно настоящее изобретение относится к биспецифичным диателям, которые содержат четыре полипептидные цепи и которые обладают двумя эпитоп-связывающими сайтами, которые являются иммуноспецифичными к одному (или двум) эпитопу(-ам) PD-1, и двумя эпитоп-связывающими сайтами, которые являются иммуноспецифичными к одному (или двум) эпитопу(-ам) LAG-3 (т. е. "биспецифичному тетравалентному диателу PD-1 × LAG-3"). Настоящее изобретение также относится к таким диателям, которые дополнительно содержат иммуноглобулиновый Fc-домен ("биспецифичным Fc-диателям" и "биспецифичным тетравалентным Fc-диателям"). Диатела по настоящему изобретению способны одновременно связываться с PD-1 и с LAG-3, в частности поскольку такие молекулы расположены на поверхностях клеток человека. Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат такие диатела, и к способам, предусматривающим применение таких диател для лечения злокачественной опухоли и других заболеваний и состояний.

Биспецифичные диатела по настоящему изобретению способны одновременно связываться с PD-1 и с LAG-3, в частности поскольку такие молекулы расположены на поверхностях клеток человека. Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат такие диатела, и к способам, предусматривающим применение таких диател для лечения злокачественной опухоли и других заболеваний и состояний. Так, в частности, биспецифичные диатела PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению содержат полипептидные цепи, которые ковалентно объединены в комплекс.

Как было рассмотрено выше, для T-клеточной активации необходимы два различных сигнала. Первый сигнал обеспечивается T-клеточным рецептором (TCR), экспрессируемым на поверхности T-клетки, которая распознала пептидный антиген в контексте главного комплекса гистосовместимости у человека (HLA), экспрессированного на антиген-презентирующей клетке (APC). Второй сигнал обеспечивается в результате взаимодействия когнатных пар костимулирующих лигандов: B7-1 и B7-2, экспрессируемых на APC, и их соответствующих рецепторов: CD28 и CTLA-4, экспрессируемых на T-клетках.

В таком направлении рецептор-лиганд взаимодействия B7-костимулирующих молекул с рецептором CD28 может стимулировать T-клеточную пролиферацию и впоследствии индуцировать экспрессию CTLA-4, отрицательного регулятора и противорецептора для CD28, который сильно конкурирует за лиганды B7-1 и B7-2, так что "постепенно сводит на нет" T-клеточную активацию и пролиферативные ответы. Было показано, что антитела-агонисты, которые связывают CD28, индуцируют T-клеточную эффекторную функцию и усиливают выработку иммунитета для уничтожения опухоли и по природе являются костимулирующими. В свою очередь, антагонисты, которые блокируют взаимодействие CTLA-4, могут препятствовать дезактивации у T-клеток их эффекторной функции, в то же время сохраняя продолжительную пролиферацию, что может привести к аутоиммунной реакции.

Наряду с направлением CTLA-4:B7-1/B7-2, функция которого заключается в активации иммунной системы при нормальном гомеостазе и в фазе примирения иммунного ответа против антигена, функция второго направления рецептор-лиганд заключается в ингибировании иммунной системы, таким образом служа в качестве точки противодействия для CTLA-4 в ходе эффекторной фазы иммунного ответа. Эта второе направление включает связывание рецептора белка запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1), экспрессируемого на поверхности T-клеток, с его соответствующими лигандами: PD-L1 и PD-L2, экспрессируемыми соответственно на антиген-презентирующих клетках (APC) и эпителиальных клетках (Chen L. et al. (2013) "Molecular Mechanisms Of T-Cell Co-Stimulation And Co-Inhibition" Nature Reviews Immunology 13(4):227-242). В отличие от антител-агонистов, которые связываются с CD28, стимулируя T-клеточные ответы, антитела, которые связываются либо с PD-1, либо с PD-L1, антагонизируют или блокируют взаимодействие PD-1/PD-L1, способны поддерживать T-клеточные ответы, предотвращая доставку отрицательного сигнала к T-клеткам. Это усиливает или поддерживает T-клеточную пролифе-



рацию, цитотоксичность и секрецию цитокинов. Все вместе антитела-агонисты, такие как антитела к CD28, целенаправленно воздействуют на положительные сигнальные пути и, таким образом, являются костимуляторами, в то время как антагонистические антитела, такие как антитела к PD-1, целенаправленно воздействуют на отрицательные сигнальные пути и называются контрольными ингибиторами.

Несмотря на то, что CTLA-4 и PD-1 представляют собой канонические контрольные ингибиторы, существует все возрастающее семейство модулирующих иммунитет пар рецептор-лиганд. Рассмотренный выше продукт гена активации лимфоцитов 3 (LAG-3) является дополнительной целью контрольного ингибитора, экспрессируемой на Т-клетках, которая связывается с молекулами HLA II класса, экспрессируемыми на APC. LAG-3 совместно экспрессируется с PD-1 на истощенных и толерантных противоопухолевых эффекторных лимфоцитах ("TIL") (Matsuzaki, J. et al. (2010) "Tumor-Infiltrating NY-ESO-1-Specific CD8+ T-Cells Are Negatively Regulated by LAGS and PD-1 in Human Ovarian Cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 107(17):7875-7880; Okazaki, T. et al. (2011) "PD-1 and LAGS inhibitor Coreceptors Act Synergistically To Prevent Autoimmunity In Mice" *J. Exp. Med.* 208(2):395-407) и сообщалось об экспрессии LAG-3 на Т-регуляторных клетках, которая играет некоторую роль как в иммунологии опухоли, так и в аутоиммунной реакции. На животных моделях было продемонстрировано, что антитело к LAG-3 индуцирует сильный противоопухолевый иммунитет, который достаточен для замедления опухолевого роста и, в сочетании с mAb к PD-1, даже может запускать полную регрессию опухоли (Woo, S.R. et al. (2012) "Immune Inhibitory Molecules LAGS And PD-1 Synergistically Regulate T-Cell Function To Promote Tumoral Immune Escape," *Cancer Res.* 72(4):917-927). Комбинированные терапии, предусматривающие использование mAb к LAG-3, BMS-986016, в настоящее время находятся на ранней фазе клинического исследования либо отдельно, либо в сочетании с mAb к PD-1 (ниволумаб / BMS-936558) (см. Creelan, B.C. (2014) "Update on Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer" *Cancer Control* 21(1):80-89).

Такие биспецифичные диатела по настоящему изобретению способны связываться с молекулами PD-1 и LAG-3 на поверхности клеток, которые присутствуют на поверхностях истощенных и толерантных противоопухолевых эффекторных лимфоцитов, и таким образом уменьшать способность таких молекул на поверхности клеток связываться с их рецепторными лигандами. Фактически, биспецифичные диатела PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению способны ослаблять опосредованное PD-1 и LAG-3 ингибирование иммунной системы и способствуют продолжительной активации иммунной системы.

#### I. Общие методики и общие определения.

Практическое осуществление настоящего изобретения будет затрагивать, если не указано иное, традиционные методики молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), микробиологии, цитологии, биохимии и иммунологии, которые известны специалистам в настоящей области. Такие методики полностью описаны в литературных источниках, таких как MOLECULAR CLONING: A LABORATORY Manual, Third Edition (Sambrook et al. Eds., 2001) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications (Methods in Molecular Biology), Herdewijn, P., Ed., Humana Press, Totowa, NJ; Oligonucleotide Synthesis (Gait, M.J., Ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, NJ; Cell Biology: A Laboratory Notebook (Cellis, J.E., Ed., 1998) Academic Press, New York, NY; Animal Cell Culture (Freshney, R.I., Ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (Mather, J.P. and Roberts, P.E., Eds., 1998) Plenum Press, New York, NY; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (Doyle, A. et al, Eds., 1993-8) John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.) New York, NY; Weir's Handbook OF Experimental Immunology (Herzenberg, L.A. et al. Eds. 1997) Wiley-Blackwell Publishers, New York, NY; GENE TRANSFER VECTORS FOR Mammalian Cells (Miller, J.M. et al. Eds., 1987) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel, F.M. et al, Eds., 1987) Greene Pub. Associates, New York, NY; PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, K. et al, Eds., 1994) Birkhauser, Boston MA; Current Protocols IN Immunology (Coligan, J.E. et al, eds., 1991) John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Short Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, 1999) Hoboken, NJ; Immunobiology 7 (Janeway, C.A. et al. 2007) Garland Science, London, UK; Antibodies (P. Finch, 1997) Stride Publications, Devoran, UK; Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., 1989) Oxford University Press, USA, New York NY; Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (Shepherd, P. et al. Eds., 2000) Oxford University Press, USA, New York NY; USING ANTIBODIES: A Laboratory Manual (Harlow, E. et al. Eds., 1998) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; The Antibodies (Zanetti, M. et al. Eds. 1995) Harwood Academic Publishers, London, UK); и DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology, Eighth Edition, DeVita, V. et al. Eds. 2008, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

В контексте настоящего документа "антитела" представляют собой иммуноглобулиновые молекулы, способные специфично связываться с целью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептиды и т. д., при помощи по меньшей мере одного антиген-распознающего сайта, расположенного в вариабельном участке иммуноглобулиновой молекулы. Применяемый в настоящем документе термин охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их мутантные формы, встречающиеся в природе варианты, гибридные белки, содержащие часть антитела с антиген-распознающим сайтом с необходимой специфичностью, гуманизированные антитела и химерные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию иммуноглобулиновой молекулы, которая со-

держит антиген-распознающий сайт с необходимой специфичностью. Встречающиеся в природе антитела обычно содержат две копии "тяжелой" ("H") полипептидной цепи и две копии "легкой" ("L") полипептидной цепи. Каждая легкая цепь состоит из варибельного участка легкой цепи ("VL") и константного участка легкой цепи ("CL"), каждая тяжелая цепь состоит из варибельного участка тяжелой цепи ("VH") и константного участка тяжелой цепи, обычно состоящего из трех доменов (CH1, CH2 и CH3). Домены CH2 и CH3 полипептидов тяжелой цепи взаимодействуют друг с другом с формированием Fc-участка, который способен связываться с Fc-рецепторами, присутствующими на поверхностях клеток иммунной системы.

Способность интактного немодифицированного антитела (например, IgG) связывать эпитоп антигена зависит от наличия варибельных доменов на иммуноглобулиновых легкой и тяжелой цепях (т. е. соответственно доменов VL и VH). При взаимодействии легкой цепи антитела и тяжелой цепи антитела и, в частности, взаимодействии его доменов VL и VH формируется один из эпитоп-связывающих сайтов антитела. В отличие от этого, "scFv" фрагмент антитела содержит домен VL и VH антитела, входящий в состав одной полипептидной цепи, причем домены разделены гибким линкером с достаточной длиной, чтобы позволить самосборку двух доменов в функциональный эпитоп-связывающий сайт.

Если самосборка доменов VL и VH является невозможной из-за линкера недостаточной длины (менее приблизительно 12 аминокислотных остатков), две scFv-конструкции взаимодействуют друг с другом с формированием "диатела", которое представляет собой бивалентную молекулу, в которой VL одной цепи ассоциируется с VH другой (рассмотрено в Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies," Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658).

Помимо их известных применений в диагностике было показано, что антитела пригодны в качестве терапевтических средств. За последние несколько десятилетий наблюдается возобновление интереса к терапевтическому потенциалу антител, а антитела становятся одним из ведущих классов полученных при помощи биотехнологии лекарственных средств (Chan, C.E. et al. (2009) "The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases" Singapore Med. J. 50(7):663-666). Около 200 лекарственных средств на основе антител были одобрены для применения или находятся на стадии разработки.

Термин "моноклональное антитело" относится к однородной популяции антител, причем такое моноклональное антитело состоит из аминокислот (встречающихся в природе и не встречающихся в природе), которые участвуют в избирательном связывании антигена. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, при этом направлены против отдельного антигенного сайта. Термин моноклональное антитело охватывает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> Fv), их одноцепочечные (scFv) мутантные формы, гибридные белки, содержащие часть антитела, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию иммуноглобулиновой молекулы, которая содержит антиген-распознающий сайт с необходимой специфичностью и со способностью связываться с антигеном. Не предусмотрено ограничение в отношении источника антитела или способа его получения (например, при помощи гибридомы, фагового отбора, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных и т. д.). Термин включает целые иммуноглобулины, а также фрагменты и т. д., описанные выше под определением "антитело". Способы получения моноклональных антител хорошо известны в настоящей области. Одним способом, который можно использовать, является способ по Kohler, G. et al. (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity" Nature 256:495-497, или его модификация.

Обычно моноклональные антитела разрабатывают на мышах, крысах или кроликах. Антитела получают путем иммунизации животного иммуногенным количеством клеток, клеточных экстрактов или белковых препаратов, которые содержат необходимый эпитоп. Иммуноген может представлять собой без ограничения первичные клетки, культивированные линии клеток, клетки злокачественной опухоли, белки, пептиды, нуклеиновые кислоты или ткань. Применяемые для иммунизации клетки можно культивировать в течение некоторого периода времени (например, по меньшей мере 24 ч) перед их применением в качестве иммуногена. Клетки можно применять в качестве иммуногенов сами по себе или в сочетании с неденатурирующим адьювантом, таким как Ribi. В большинстве случаев клетки следует сохранять интактными и предпочтительно жизнеспособными при применении в качестве иммуногенов. Интактные клетки могут обеспечить более хорошую выявляемость антигенов, нежели разрушенные клетки, у иммунизированных животных. Применение денатурирующих или агрессивных адьювантов, например, адьюванта Фрейда, может разрушить клетки и поэтому является нежелательным. Иммуноген можно вводить многократно с периодическими интервалами, такими как раз в две недели или еженедельно, или можно вводить так, чтобы сохранять жизнеспособность у животного (например, в тканевом рекомбинанте). В качестве альтернативы, существующие моноклональные антитела и любые другие эквивалентные антитела, которые являются иммуноспецифичными к необходимому патогенному эпитопу, можно секвенировать и получать рекомбинантно с помощью известных в настоящей области способов. В соответствии с одним вариантом осуществления такое антитело секвенируют, а полинуклеотидную последовательность затем клонируют в вектор для экспрессии или размножения. Последовательность, кодирующую представляющее интерес антитело, можно сохранять в векторе в клетке-хозяине, а клетку-хозяина можно

затем размножить и заморозить для дальнейшего применения. Полинуклеотидную последовательность таких антител можно применять для генетической манипуляции с целью создания биспецифичных молекул по настоящему изобретению, а также химерного антитела, гуманизированного антитела или канинизированного антитела для улучшения аффинности или других характеристик антитела. Основным принципом в гуманизации антитела предусматривает сохранение основной последовательности эпитоп-связывающей части антитела, одновременно заменяя нечеловеческий остаток антитела на человеческие последовательности антитела. Существует четыре основных стадии гуманизации моноклонального антитела. Они такие: (1) определение нуклеотидной и прогнозируемой аминокислотной последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепи исходного антитела, (2) конструирование гуманизированного антитела или канинизированного антитела, т. е. принятие решения, какой каркасный участок антитела использовать в процессе гуманизации или канинизации, (3) собственно методики/техники гуманизации или канинизации и (4) трансфекция и экспрессия гуманизированного антитела. См., например, патенты США № 4816567, 5807715, 5866692 и 6331415.

Естественные антитела способны связываться только с одним видом эпитопа (т. е. они являются моноспецифичными), тем не менее, они могут связывать множество копий такого вида (т. е. характеризуются бивалентностью или мультивалентностью). Был разработан широкий спектр рекомбинантных форматов биспецифичного антитела (см., например, публикации PCT № WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968), большинство из которых предусматривают применение линкерных пептидов либо для гибридизации центральной части антитела (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) с дополнительным связывающим белком (например, scFv), либо для гибридизации, например, двух Fab-фрагментов или scFv. Обычно такие подходы предусматривают компромиссы и альтернативы. Например, в PCT публикациях № WO 2013/174873, WO 2011/133886 WO 2010/136172 раскрыто, что использование линкеров может вызывать проблемы в терапевтическом плане, и сообщается о триспецифичном антителе, в котором домены CL и CH1 переключены с их соответствующих естественных положений, а домены VL и VH были диверсифицированы (WO 2008/027236, WO 2010/108127), чтобы позволить им связываться с более чем одним антигеном. Таким образом, в раскрываемых в этих документах молекулах специфичность связывания заменена на способность связывать дополнительные виды антигена. В PCT публикациях № WO 2013/163427 и WO 2013/119903 раскрыта модификация домена CH2 с включением аддукта гибридного белка, содержащего связывающий домен. В документе отмечается, что домен CH2 вероятно играет лишь минимальную роль в посредничестве эффекторной функции. В PCT публикациях № WO 2010/028797, WO2010028796 и WO 2010/028795 раскрыты рекомбинантные антитела, Fc-участки которых были заменены на дополнительные домены VL и VH, с тем чтобы сформировать трехвалентные связывающие молекулы. В PCT публикациях № WO 2003/025018 и WO2003012069 раскрыты рекомбинантные антитела, отдельные цепи которых содержат scFv-домены. В PCT публикации № WO 2013/006544 раскрыты мультивалентные Fab-молекулы, которые синтезированы в виде отдельной полипептидной цепи, а затем подвергнуты протеолизу с получением на выходе гетеродимерных структур. Таким образом, в раскрытых в этих документах молекулах заменена вся или некоторая часть способности опосредовать эффекторную функцию на способность связывать дополнительные виды антигена. В PCT публикациях № WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 и WO 1991/003493 раскрыто добавление дополнительных связывающих доменов или функциональных групп в антитело или часть антитела (например, добавление диатела к легкой цепи антитела, или добавление дополнительных VL и VH доменов в легкую и тяжелую цепи антитела, или добавление гетерологичного гибридного белка или связывание в цепь друг с другом множества Fab-доменов). Таким образом, у раскрытых в этих документах молекулах заменена нативная структура антитела на способность связывать дополнительные виды антигена.

Из уровня техники также известно о возможности получения диател, которые отличаются от природных антител в том, что они способны связывать два или более различных видов эпитопа (т. е. характеризуются биспецифичностью или мультиспецифичностью в дополнение к бивалентности или мультивалентности) (см., например, Holliger et al. (1993) "Diabodies": Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al); US 2004/0220388 (Mertens et al); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20): 19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al); Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," Protein Eng Des Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange," Protein Engineering 14(2): 1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain," Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy," Cancer Res. 69(12):4941-4944).

В основе строения диатела лежат одноцепочечные фрагменты переменного участка (scFv). Такие

молекулы получают путем соединения переменных участков легкой и/или тяжелой цепи с помощью короткого соединяющего пептида. В работе Bird et al. (1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins" *Science* 242:423-426) описан пример соединяющих пептидов, которые выступают в качестве мостика длиной примерно 3,5 нм между С-концом одного переменного участка и N-концом другого переменного участка. Были разработаны и использованы линкеры с другими последовательностями (Bird et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," *Science* 242:423-426). В свою очередь, линкеры можно модифицировать для дополнительных функций, таких как присоединение лекарственных средств или присоединение к твердым подложкам. Одноцепочечные варианты можно получить с помощью либо рекомбинантных, либо синтетических способов. Для синтетического получения scFv можно использовать автоматический синтезатор. Для рекомбинантного получения scFv подходящую плазмиду, содержащую полинуклеотид, который кодирует scFv, можно ввести в подходящую клетку-хозяина, либо эукариотическую, такую как дрожжевая, растительная клетка, клетка насекомого или млекопитающего, либо прокариотическую, такую как *E. coli*. Полинуклеотиды, кодирующие представляющий интерес scFv, могут быть получены при помощи стандартных процедур, таких как лигирование полинуклеотидов. Полученные в результате scFv можно выделить с помощью стандартных методик очистки белка, которые известны в настоящей области.

В патенте США № 7585952 и патентной публикации США № 2010-0173978 рассмотрены молекулы scFv, которые являются иммуноспецифичными к ErbB2. Был описан тип молекулы scFv под названием "биспецифичные мобилизаторы Т-клеток" ("BiTE"), (WO 05/061547; Baeuerle, P et al. (2008) "BiTE: A New Class Of Antibodies That Recruit T-Cells," *Drugs of the Future* 33: 137-147; Bargou, et al. 2008) "Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T-Cell-Engaging Antibody," *Science* 321: 974-977). Такие молекулы состоят из одноцепочечной полипептидной молекулы с двумя антиген-связывающими доменами, один из которых иммуноспецифично связывается с эпитопом CD3, а второй иммуноспецифично связывается с антигеном, присутствующим на поверхности целевой клетки.

Создание немоноспецифичных диател обеспечивает значительное преимущество: возможность совместно лигировать и совместно локализовать различные эпитопы. Бивалентные диатела, таким образом, обладают широким спектром применений, включая терапию и иммунодиагностику. Бивалентность обеспечивает хорошую свободу действий при разработке и конструировании диател в различных применениях, обеспечивая повышенную avidность в отношении мультимерных антигенов, сшивание различных антигенов и направленное действие в отношении конкретных типов клеток, в основе которого лежит наличие обоих целевых антигенов. Благодаря их повышенной валентности, низким скоростям диссоциации и быстрому выведению из кровотока (для диател небольшого размера, размером ~50 кДа или меньше), для молекул диател, как известно из уровня техники, было также продемонстрировано конкретное применение в области визуализации опухолей (Fitzgerald et al. (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichiapastoris," *Protein Eng.* 10:1221).

Бивалентность диател подтолкнула к их использованию для совместного лигирования различных клеток, например, сшивания цитотоксических Т-клеток с опухолевыми клетками (Staerz et al. (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T-Cells," *Nature* 314:628-631, and Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody," *ProteinEng.* 9:299-305). Так, например, эпитоп-связывающие домены диатела могут быть нацелены на поверхностную детерминанту любой иммунной эффекторной клетки, такую как CD3, CD16, CD32 или CD64, которые экспрессируются на Т-лимфоцитах, натуральных киллерах (NK) или других мононуклеарных клетках. Во многих исследованиях также было обнаружено, что диатело, связывающееся с детерминантами эффекторных клеток, например, Fcγ-рецепторами (FcγR), активирует эффекторную клетку (Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody," *ProteinEng.* 9:299-305; Holliger et al. (1999) "Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 × Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 × Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins," *Cancer Res.* 59:2909-2916; WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068). В норме активация эффекторных клеток запускается при связывании связывающегося с антигеном антитела с эффекторной клеткой в результате Fc-FcγR взаимодействия; таким образом, в этом отношении молекулы диатела могут характеризоваться Ig-подобной функциональностью, независимо от того, содержат ли они Fc-домен (например, по результатам любого анализа эффекторной функции, который известен из уровня техники или проиллюстрирован в настоящем документе (например, анализа ADCC)). При сшивании опухолевых и эффекторных клеток диатело не только приводит эффекторную клетку в непосредственную близость к опухолевым клеткам, но приводит к эффективному цитолизу опухоли (см, например, Cao et al. (2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics," *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55:171-197).

Тем не менее, описанные выше преимущества достигаются за счет других потерь. Для формирования таких немоноспецифичных диател необходима успешная сборка двух или более отдельных и различных полипептидов (т. е. для такого формирования необходимо, чтобы диатела формировались путем гетеродимеризации различных видов полипептидных цепей). Этот факт не присущ моноспецифичным диателам, которые формируются путем гомодимеризации идентичных полипептидных цепей. Поскольку

должно быть по меньшей мере два несходных полипептида (т. е. две разновидности полипептида) для формирования немоноспецифичного диатела, и поскольку гомодимеризация таких полипептидов приводит к формированию неактивных молекул (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," *Protein Eng.* 13(8):583-588), то получение таких полипептидов необходимо осуществлять таким образом, чтобы предотвратить ковалентное связывание между полипептидами одной разновидности (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," *Protein Eng.* 13(8):583-588).

Так, из уровня техники известна нековалентная ассоциация таких полипептидов (см., например, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain" Abstract 3P-683, *J. Biochem.* 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System" *Protein Eng.* 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," *J. Biol. Chem.* 280(20): 19665-19672). Тем не менее, из того же уровня техники понятно, что биспецифичные диатела, состоящие из нековалентно ассоциированных полипептидов, являются нестабильными и легко диссоциируют на нефункциональные мономеры (см., например, Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," *J. Biol. Chem.* 280(20): 19665-19672).

Несмотря на такую проблему, из уровня техники известно об успешной разработке стабильных, ковалентно связанных гетеродимерных немоноспецифичных диател, называемых DART® (см., например, патентные публикации США № 2013-0295121, 2010-0174053 и 2009-0060910; европейские патентные публикации № EP 2714079, EP 2601216, EP 2376109, EP 2158221 и PCT публикации № WO 2012/162068, WO 2012/018687, WO 2010/080538, и работы Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma," *Blood* 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ3 Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold," *Arthritis Rheum.* 62(7): 1933-1943; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Retargeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion," *J. Mol. Biol.* 399(3):436-449). Такие диатела содержат два или более полипептидов, образующих комплекс с помощью ковалентных связей, и включают встраивание одного или нескольких цистеиновых остатков в каждую из используемых разновидностей полипептидов. Например, было показано, что добавление цистеинового остатка к С-концу таких конструкций обеспечивает формирование дисульфидной связи между полипептидными цепями, стабилизируя получаемый в результате гетеродимер, не затрагивая характеристики связывания бивалентной молекулы.

Каждый из двух полипептидов простейшего DART® содержит три домена (фиг. 1). Первый полипептид содержит: (i) домен, который содержит связывающий участок варибельного домена легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), (ii) второй домен, который содержит связывающий участок варибельного домена тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), и (iii) третий домен, который служит для облегчения гетеродимеризации со вторым полипептидом и для ковалентного связывания первого полипептида со вторым полипептидом диатела. Второй полипептид содержит комплементарный первый домен (домен VL2), комплементарный второй домен (домен VH1) и третий домен, который образует комплекс с третьим доменом первой полипептидной цепи для облегчения гетеродимеризации и ковалентного связывания с первой полипептидной цепью. Такие молекулы являются стабильными, высокоактивными и обладают способностью одновременного связывания двух или более антигенов.

В соответствии с одним вариантом осуществления каждый из третьих доменов первого и второго полипептида содержит цистеиновый остаток, который служит для связывания полипептидов друг с другом при помощи дисульфидной связи. Третий домен одного или обоих полипептидов может дополнительно обладать последовательностью домена CH2-CH3, так чтобы при образовании комплекса полипептидов диатела формировался Fc-домен, который способен связываться с Fc-рецептором клеток (таких как В-лимфоциты, дендритные клетки, натуральные киллеры, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и тучные клетки) (фиг. 2). Было описано множество вариантов таких молекул (см., например, патентные публикации США № 2013-0295121, 2010-0174053 и 2009-0060910; европейские патентные публикации № EP 2714079, EP 2601216, EP 2376109, EP 2158221 и PCT публикации № WO 2012/162068, WO 2012/018687, WO 2010/080538). Такие Fc-несущие DART® могут содержать три полипептидные цепи. Первый полипептид такого диатела содержит три домена: (i) VL1-содержащий домен, (ii) VH2-содержащий домен и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Второй полипептид такого DART® содержит: (i) VL2-содержащий домен, (ii) VH1-содержащий домен и (iii) домен, который облегчает гетеродимеризацию и ковалентное связывание с первой полипептидной цепью диатела. Третий полипептид такого DART® содержит последовательность CH2-CH3. Таким образом, первая и вторая поли-

пептидные цепи такого DART® образуют комплекс друг с другом с формированием связывающего сайта VL1/VH1, который может связываться с одним эпитопом, а также связывающего сайта VL2/VH2, который может связываться со вторым эпитопом. Первый и второй полипептиды связываются друг с другом посредством дисульфидной связи с участием цистеиновых остатков в их соответствующих третьих доменах. Следует отметить, что первая и третья полипептидные цепи образуют комплекс друг с другом с формированием Fc-домена, который стабилизируется при помощи дисульфидной связи. Такие диатела обладают повышенной активностью. Такие Fc-несущие DART® могут иметь любую из двух ориентации (табл. 1):

Таблица 1		
Первая ориентация	3-я цепь	NH <sub>2</sub> -CH2-CH3-COON
	1-я цепь	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-облегчающий образование гетеродимера домен-CH2-CH3-COON
	2-я цепь	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-облегчающий образование гетеродимера домен-COON
Вторая ориентация	3-я цепь	NH <sub>2</sub> -CH2-CH3-COON
	1-я цепь	NH <sub>2</sub> -CH2-CH3-VL1-VH2-облегчающий образование гетеродимера домен-COON
	2-я цепь	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-облегчающий образование гетеродимера домен-COON

Также было описано еще более сложное DART®, называемое Fc-DART® (фиг. 3) (WO 2012/018687). Fc-DART® содержат четыре полипептидные цепи. Первая и третья полипептидные цепи такого диатела содержат три домена: (i) VL1-содержащий домен, (ii) VH2-содержащий домен и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Второй и четвертый полипептид у Fc-DART® содержат: (i) VL2-содержащий домен, (ii) VH1-содержащий домен и (iii) домен, который облегчает гетеродимеризацию и ковалентное связывание с первой полипептидной цепью Fc-DART™. Домены VL и/или VH третьей и четвертой полипептидных цепей и домены VL и/или VH первой и второй полипептидных цепей могут быть одинаковыми или различаться так, чтобы сделать возможным тетравалентное связывание, которое является либо моноспецифичным, либо биспецифичным, либо тетраспецифичным (табл. 2).

Таблица 2		
Биспецифичное	2-я цепь	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-COON
	1-я цепь	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-[CH2-CH3]-COON
	3-я цепь	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-[CH2-CH3]-COON
	4-я цепь	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-COON
Тетраспецифичное	2-я цепь	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-COON
	1-я цепь	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-[CH2-CH3]-COON
	3-я цепь	NH <sub>2</sub> -VL3-VH4-[CH2-CH3]-COON
	4-я цепь	NH <sub>2</sub> -VL4-VH3-COON

По всей настоящей заявке нумерация аминокислотных остатков легких и тяжелых цепей антитела приведена согласно EU-индексу по Kabat et al. (1992) SEQUENCES OF Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health Publication No. 91-3242.

Термины "полипептид" и "пептид" используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот с любой длиной, но преимущественно со значениями длины, которые превышают 3, 5, 10, 15, 20 или 25 аминокислотных остатков. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может прерываться отличными от аминокислот сегментами. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным образом или в результате вмешательства, например, формирования дисульфидной связи, гликозилирования, липидизации, ацетилирования, фосфорилирования или любой другой манипуляции или модификации, такой как конъюгация с компонентом, выступающим в качестве метки. Также в это определение включены, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислоты (в том числе, например, не встречающиеся в природе аминокислоты и т. д.), а также другие модификации, известные из уровня техники.

Полипептиды по настоящему изобретению могут встречаться в виде отдельных цепей или в виде образованных из цепей комплексов.

Термины "диатело" и "DART™" были рассмотрены ранее. DART® является типом диатела, кото-

рый содержит по меньшей мере две полипептидные цепи, которые предпочтительно образуют комплекс друг с другом посредством ковалентного взаимодействия с формированием по меньшей мере двух эпитоп-связывающих сайтов, которые могут распознавать одинаковые или различные эпитопы. Каждые две полипептидные цепи диатела или DART™ содержат вариабельный участок иммуноглобулиновой легкой цепи и вариабельный участок иммуноглобулиновой тяжелой цепи, но эти участки не взаимодействуют с формированием эпитоп-связывающего сайта (т. е. они не являются "комплементарными" друг другу). Скорее, вариабельный участок иммуноглобулиновой тяжелой цепи одной (например, первой) из полипептидных цепей диатела или DART™ взаимодействует с вариабельным участком иммуноглобулиновой легкой цепи другой (например, второй) полипептидной цепи диатела или DART™ с формированием эпитоп-связывающего сайта. Аналогично, вариабельный участок иммуноглобулиновой легкой цепи одной (например, первой) из полипептидных цепей диатела или DART™ взаимодействует с вариабельным участком иммуноглобулиновой тяжелой цепи другой (например, второй) полипептидной цепи диатела или DART™ с формированием эпитоп-связывающего сайта. Молекулы DART™ раскрыты в патентных публикациях США № 2013-0295121, 2010-0174053 и 2009-0060910; европейских патентных публикациях № EP 2714079, EP 2601216, EP 2376109, EP 2158221 и PCT публикациях № WO 2012/162068, WO 2012/018687, WO 2010/080538, WO 2006/113665, WO 2008/157379 и в работе Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma," Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold," Arthritis Rheum. 62(7): 1933-1943; и Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion," J. Mol. Biol. 399(3):436-449.

Применяемые в настоящем документе термины "ассоциация" или "ассоциирование" в отношении полипептидов (например, одного полипептида диатела с другим, иммуноглобулиновой легкой цепи с иммуноглобулиновой тяжелой цепью, одного домена CH2-CH3 с другим доменом CH2-CH3 и т. д.) предназначены для обозначения нековалентного объединения полипептидов. Термины "образует комплексы" или "комплексобразование" предназначены для обозначения ковалентного объединения полипептидов.

В контексте настоящего документа говорят, что диатела по настоящему изобретению опосредуют "координированное связывание", если их эпитоп-связывающие домены способны параллельно связываться с их соответствующими распознаваемыми эпитопами. Такое связывание может быть одновременным.

Эпитоп-связывающие домены диател по настоящему изобретению связываются с их распознаваемыми эпитопами "иммуноспецифичным" образом. В контексте настоящего документа говорят, что антитело, диатело или другая эпитоп-связывающая молекула "иммуноспецифично" связывает участок другой молекулы (т. е. эпитоп), если она вступает в реакцию или ассоциируется чаще, быстрее, на более длительный срок и/или с большей аффинностью с таким эпитопом относительно альтернативных эпитопов. Например, антитело, которое иммуноспецифично связывается с вирусным эпитопом, является антителом, которое связывает такой вирусный эпитоп с большей аффинностью, авидностью, легче и/или на более длительный срок, чем оно иммуноспецифично связывается с другими вирусными эпитопами или невирусными эпитопами. Также при прочтении этого определения понятно, что, например, антитело (или фрагмент, или эпитоп), которое иммуноспецифично связывается с первой целью, может или не может специфично или предпочтительно связываться со второй целью. В связи с этим, для "специфичного связывания" не всегда необходимо (хотя оно может и включать) исключительное связывание. Обычно, но не всегда, отсылка к связыванию означает "специфичное" связывание.

Различные иммуноглобулиновые домены таких молекул могут быть получены из иммуноглобулинов любого изотипа или аллотипа, включая без ограничения IgA, IgD, IgG, IgE и IgM. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления, которые были рассмотрены выше, такие иммуноглобулины получены из иммуноглобулинов IgG. В соответствии с отдельными вариантами осуществления используемым изотипом IgG является IgG1, однако, также можно использовать IgG других изотипов (например, IgG2, IgG3 или IgG4 или их аллотип).

## II. Предпочтительные биспецифичные диатела PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение относится к биспецифичным диателам PD-1 × LAG-3. Предпочтительные биспецифичные диатела PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению содержат эпитоп-связывающие фрагменты антител, которые обеспечивают им возможность координационно связываться с двумя различными эпитопами: эпитопом PD-1 и эпитопом LAG-3, для ослабления ингибирующих активностей у таких молекул. В контексте настоящего изобретения, такое ослабление относится к уменьшению по меньшей мере на 20%, уменьшению по меньшей мере на 50%, уменьшению по меньшей мере на 80% или уменьшению по меньшей мере на 90% у детектируемой ингибирующей активности PD-1 и или LAG-3 или полному устранению детектируемой ингибирующей активности PD-1 и или LAG-3.

### A. Способности к связыванию у антител к PD-1.

Известны антитела, которые являются иммуноспецифичными к PD-1 (см., например, патенты США № 8008449, № 8552154, патентные PCT публикации WO 2012/135408, WO 2012/145549 и WO 2013/014668). Дополнительные необходимые антитела могут быть получены путем выделения секретирующих антитело гибридом, индуцированных при помощи PD-1 или его пептидного фрагмента. Человеческий PD-1 (включающий сигнальную последовательность из 20 аминокислотных остатков (показана подчеркнутой) и зрелый белок из 268 аминокислотных остатков) имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:1):

MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA  
 TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL  
 PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE  
 VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI  
 GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT  
 IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL

Предпочтительные антитела к PD-1 включают: PD-1 mAb 1 (5C4; BMS-936558), PD-1 mAb 2 (МК-3475; Merck, ламбролизумаб), PD-1 mAb 3 (EH12.2H7; Dana Farber) и PD-1 mAb 4 (CT-011; CureTech, BAT-1).

Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи PD-1 mAb 1 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:2) (CDR показаны подчеркнутыми):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV  
IWYDGSKRY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND  
DYWGQGTLVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи PD-1 mAb 1 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:3) (CDR показаны подчеркнутыми):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD  
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSELP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ  
 GTKVEIK

Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи PD-1 mAb 2 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:4) (CDR показаны подчеркнутыми):

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG  
INPSNGGTNE NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD  
YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи PD-1 mAb 2 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:5) (CDR показаны подчеркнутыми):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL  
 LIYLASYLE GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL  
TFGGGTKVEIK

Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи PD-1 mAb 3 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:6) (CDR показаны подчеркнутыми):

QVQLQQSGAE LAKPGASVQM SCKASGYSFT SSWIHWVKQR PGQGLEWIGY  
IYPSTGFTEY NQKFKDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARRW  
DSSGYHAMDY WGQGTSVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи PD-1 mAb 3 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:7) (CDR показаны подчеркнутыми):

DIVLTQSPAS LTVSLGQRAT ISCRRASQSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL  
 LIKFGSNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVVEEDTATY YCQHSWEIPY  
TFGGGTKLEI K

Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи PD-1 mAb 4 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:8) (CDR показаны подчеркнутыми):



QVQLVQSGSE LKKPGASVKI SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLQWMGW  
INTDSGESTY AEEFKGRFVF SLDTSVNTAY LQITSLTAED TGMVFCVRVG  
YDALDYWGQG TLVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи PD-1 mAb 4 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:9) (CDR показаны подчеркнутыми):

EIVLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSARSSVS YMHWFQOKPG KAPKLWIYRT  
SNLASGVPSR FSGSGSGTSY CLTINSLOPE DFATYYCQQR SSFPLTFGGG  
 TKLEIK

В. Способности к связыванию у антител к LAG-3.

Также показаны антитела, которые являются иммуноспецифичными к LAG-3 (см., например, WO 2014/008218). Дополнительные необходимые антитела могут быть получены путем выделения секретизирующих антител гибридом, индуцированных при помощи LAG-3 или его пептидного фрагмента. Человеческий LAG-3 (включающий сигнальную последовательность из 28 аминокислотных остатков (показана подчеркнутой) и зрелый белок из 497 аминокислотных остатков) имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:10):

MWEAQFLGLL FLQPLWVAPV KPLQPGAEVV VVWAQEGAPA QLPCSPTIPL  
 QDLSLLRRAG VTWQHQPDSG PPAAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT  
 VLSVPGGLR SGRLPLQPRV QLDERGRQRG DFSLWLRPAR RADAGEYRAA  
 VHLRDRALSC RLRLRLGQAS MTASPPGSLR ASDWVILNCS FSRPDRPASV  
 HWFRNRGQGR VPVRESPHNH LAESFLFLPQ VSPMDSGPWG CILTYRDGFN  
 VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP  
 PGGGPDLLVT GDNGDFTLRL EDVSAQAGT YTCHIHLEEQ QLNATVTLAI  
 ITVTPKSFSG PLSLGLKLLCE VTPVSGQERF VWSLDTPSQ RSFSGPWLEA  
 QEAQLLSQPW QCQLYQGERL LGAAVYFTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL  
 LLFLILGVLS LLLLVTGAFG FHLWRRQWRP RRFSALEQGI HPPQAQSKIE  
 ELEQEREPEP EPEPEPEPEP EPEQL

Предпочтительным антителом к LAG-3 является LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS). Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи LAG-3 mAb 1 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 11) (CDR показаны подчеркнутыми):

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF DYYWNWIRQP PGKGLEWIGE  
INHNGNNTSN PSLKSRVTLT LDTSKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCAFGYS  
DYEYNWEDPW GQGLVTVSS

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи LAG-3 mAb 1 имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 12) (CDR показаны подчеркнутыми):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIS SYLAWYQOKP GQAPRLLIYD  
ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ  
 GTNLEIK

Применяемый в настоящем документе термин "эпитоп-связывающий фрагмент антитела" означает фрагмент антитела, способный иммуноспецифично связываться с эпитопом. Эпитоп-связывающий фрагмент может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 CDR-доменов такого антитела и, хотя и может иммуноспецифично связываться с таким эпитопом, может характеризоваться иммуноспецифичностью, аффинностью или селективностью к такому эпитопу, который отличается от такового у такого антитела. Тем не менее, предпочтительно эпитоп-связывающий фрагмент будет содержать все 6 CDR-доменов такого антитела. Эпитоп-связывающий фрагмент антитела может представлять собой отдельную полипептидную цепь (например, scFv) или может содержать две или более полипептидных цепей, каждая из которых имеет N-конец и C-конец (например, диатело, Fab-фрагмент, Fab<sub>2</sub>-фрагмент и т. д.).

С. Предпочтительные диатела DART® по настоящему изобретению.

1. Общее рассмотрение.

Предпочтительные диатела по настоящему изобретению являются биспецифичными, тетравалентными диателами Fc-DART® (фиг. 3), которые состоят из четырех полипептидных цепей. Четыре полипептидные цепи содержат два CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>-содержащих полипептида (т. е. "первую" и "третью" поли-

пептидные цепи диатела), которые образуют друг с другом комплекс с формированием Fc-домена, и два идентичных не содержащих CH<sub>3</sub> полипептида (т. е. "вторую" и "четвертую" полипептидные цепи диатела), каждый из которых образует комплекс с CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>-содержащим полипептидом диатела с формированием эпитоп-связывающего домена, который является иммуноспецифичным к PD-1 или LAG-3. Так, например, первая полипептидная цепь будет содержать вариабельный домен легкой цепи (VL) к PD-1 (или к LAG-3) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH) к LAG-3 (или к PD-1) и будет образовывать комплекс со второй полипептидной цепью, которая содержит комплементарный домен VH к PD-1 (или к LAG-3) и комплементарный VL домен к LAG-3 (или к PD-1) с формированием первой пары связывающих эпитопы PD-1 и LAG-3 доменов. Аналогично, например, третья полипептидная цепь будет содержать вариабельный домен легкой цепи (VL) к PD-1 (или к LAG-3) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH) к LAG-3 (или к PD-1) и будет образовывать комплекс с четвертой полипептидной цепью, которая содержит комплементарный домен VH к PD-1 (или к LAG-3) и комплементарный VL домен к LAG-3 (или к PD-1) с формированием второй пары связывающих эпитопы PD-1 и LAG-3 доменов.

Поскольку вариабельные домены легкой цепи и вариабельные домены тяжелой цепи одного полипептида направлены к различным эпитопам, они не могут образовывать друг с другом комплекс с формированием эпитоп-связывающего домена, который может связывать либо PD-1, либо LAG-3. Вариабельные домены легкой цепи и вариабельные домены тяжелой цепи первого полипептида предпочтительно отделены друг от друга либо при помощи промежуточного линкерного пептида, который является достаточно коротким, с тем чтобы практически предотвратить комплексообразование у этих доменов. Иллюстративный линкер имеет последовательность (SEQ ID NO: 13: GGGSGGGG. Альтернативно, можно использовать другие линкеры аналогичной длины (с тем чтобы предотвратить взаимодействие друг с другом доменов VL и VH одной полипептидной цепи).

Как показано на фиг. 4, наиболее предпочтительными биспецифичными, тетравалентными диателами Fc-DART® по настоящему изобретению являются диатела Fc-DART®, которые были модифицированы таким образом, чтобы они содержали облегчающие образование гетеродимера домены. Включение таких доменов способствует формированию гетеродимера между полипептидными цепями диатела. Включение таких доменов не является обязательным, и настоящее изобретение относится к биспецифичным диателам PD-1 × LAG-3, которые не содержат такие домены. Предпочтительные облегчающие образование гетеродимера домены включают "Е-спиральные" домены (SEQ ID NO: 14):

EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

и "К-спиральные" домены (SEQ ID NO: 15):

KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE.

Более конкретно, каждая из пары полипептидных цепей, для которых необходимо образовать комплекс друг с другом, сконструирована так, чтобы она содержала одну (или несколько) таких облегчающих образование гетеродимера доменов, причем используемый домен(-ы) одной полипептидной цепи комплементарен(-ны) используемому домену(-ам) другой полипептидной цепи (например, одна полипептидная цепь будет содержать Е-спиральный домен, а другая будет содержать К-спиральный домен). Если две полипептидные цепи сконструированы такими, чтобы они содержали более одного такого облегчающего образование гетеродимера домена, они могут иметь одинаковый заряд или, что более предпочтительно, противоположный заряд.

Особенно предпочтительными являются облегчающие образование гетеродимера домены, которые содержат модификации описанных выше Е-спиральных и К-спиральных последовательностей с включением одного или нескольких цистеиновых остатков. Наличие таких цистеиновых остатков обеспечивает, чтобы спираль, присутствующая на одной полипептидной цепи, стала ковалентно связанной с комплементарной спиралью, присутствующей на другой полипептидной цепи, таким образом формируя ковалентную связь между полипептидными цепями и повышая стабильность диатела. Примеры таких особенно предпочтительных облегчающих образование гетеродимера доменов включают модифицированную Е-спираль с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 16):

EVAACSEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

где лейциновый остаток из SEQ ID NO: 14 был заменен цистеиновым остатком (показан подчеркнутым), и модифицированную К-спираль с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 17):

KVAACSKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

где лейциновый остаток из SEQ ID NO: 15 был заменен цистеиновым остатком (показан подчеркнутым).

Вариабельный домен тяжелой цепи первого полипептида и облегчающий образование гетеродимера домен такого полипептида предпочтительно разделены друг от друга промежуточным линкерным пептидом, который содержит 1, 2, 3 или более цистеиновых остатков. Предпочтительный цистеин-содержащий разделяющий пептид имеет последовательность SEQ ID NO: 18:

GGCGGG

Можно использовать другие линкеры с аналогичной длиной (для включения цистеинового остатка,

который может ковалентно связываться с цистеиновым остатком другой полипептидной цепи).

Предпочтительно используемый облегчающий образование гетеродимера домен и домен CH2-CH3 первой полипептидной цепи разделены друг от друга промежуточным цистеин-содержащим линкерным пептидом, который обеспечивает повышенную стабилизацию облегчающего образование гетеродимера домена. Подходящий цистеин-содержащий линкерный пептид имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:19):

DKTHTCPRCP

однако более предпочтительный линкер имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:20):

LEPKSADKTHTCPRCP

Альтернативно, можно использовать другие линкеры с аналогичной длиной (для включения цистеинового остатка, который может ковалентно связываться с цистеиновым остатком другой полипептидной цепи).

Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 дикого типа имеет следующий вид (позиции приведены согласно EU-индексу по Kabat et al. (1992) Sequences Of Proteins Of Immunological Interest, National Institutes of Health Publication No. 91-3242) (SEQ ID NO:21):

CH2 →					
PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV	DGVEVHNAKT
230	240	250	260	270	280
←CH2   CH3→					
KPREEQYNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	APIEKTISKA	K GQPREPQVY
290	300	310	320	330	340
TLPPSREEMT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTTTPVLD	SDGSFFLYSK
350	360	370	380	390	400
←CH3					
LTVDKSRWQQ	GNVFSCVMH	EALHNHYTQK	SLSLSPGK		
410	420	430	440		

Для трехспецифичных или тетраспецифичных диател (т. е. для диател, у которых первая и третья полипептидные цепи не идентичны) желательно уменьшить или предотвратить гомодимеризацию между доменами CH2-CH3 двух первых полипептидных цепей или между доменами CH2-CH3 двух третьих полипептидных цепей. Для стимуляции гетеродимеризации между первой и третьей полипептидными цепями домен CH2-CH3 из этих цепей предпочтительно модифицирован так, чтобы он облегчал такую гетеродимеризацию. Например, аминокислотную замену (предпочтительно замену с аминокислотой, содержащей объемную боковую группу, формирующую "выступ", например, триптофан) можно ввести в домен CH2 или CH3 первой полипептидной цепи так, что стерическое влияние будет предотвращать взаимодействие с имеющим аналогичную мутацию доменом и будет принуждать мутантный домен образовывать пару с доменом, в котором была сконструирована комплементарная или совмещаемая мутация, т. е. "впадина" (например, замена на глицин). Такие наборы мутаций можно сконструировать способом инженерии в любой паре полипептидов, входящих в состав молекулы диатела, и дополнительно сконструировать способом инженерии в любой части полипептидных цепей указанной пары. Способы белковой инженерии для стимуляции гетеродимеризации вместо гомодимеризации хорошо известны из уровня техники, в частности, в отношении инженерии иммуноглобулин-подобных молекул, и охватываются в настоящем документе (см., например, патент США № 7695936 и патентную публикацию 2007/0196363, Ridgway et al. (1996) "'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization," Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library," J. Mol. Biol. 270: 26-35, и Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis," J. Immunol. Methods 296:95-101; каждый из которых, таким образом, включен в настоящий документ с помощью ссылки в полном его объеме. Предпочтительный выступ создают путем модификации интактного Fc-домена IgG так, чтобы он содержал модификацию T366W. Предпочтительную впадину создают путем модификации интактного Fc-домена IgG так, чтобы он содержал модификацию T366S, L368A и Y407V. Для облегчения очистки диател по настоящему изобретению полипептидная цепь, содержащая мутации, приводящие к образованию впадины, дополнительно содержит замену в положении 435 (H435R) для удаления сайта связывания с белком А. Таким образом, гомодимеры полипептидов, содержащие мутации по типу "впадина", не будут связываться с белком А, в то же время диатела, которые в результате формируют гетеродимеры, содержащие выступ и впадину, будут сохранять свою способность связывать белок А с помощью сайта связывания с белком А на полипептидной цепи, содержащей мутацию по типу "выступ".

Настоящее изобретение также относится к молекулам, содержащим варианты Fc-домены, которые содержат одну или несколько аминокислотных замен, вставок или делеций относительно сравнимого Fc-домена дикого типа. Молекулы, содержащие варианты Fc-домены, в норме имеют измененные фенотипы относительно молекул, содержащих Fc-домены дикого типа. Вариантный фенотип может экспрессироваться в форме измененного периода полужизни в сыворотке, измененной стабильности, измененной восприимчивости к действию ферментов клетки или измененной эффекторной функции, по результатам определения в НК-зависимом или макрофаг-зависимом анализе. Модификации Fc-доменов, выявляемые как изменение эффекторной функции, известны из уровня техники, включая модификации, которые повышают связывание с активирующими рецепторами (например, FcγRIIA (CD16A) и уменьшают связывание с ингибирующими рецепторами (например, FcγRIIB (CD32B)) (см., например, Stavenhagen, J.B. et al. (2007) "Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγ Receptors" Cancer Res. 57(18):8882-8890). Иллюстративные варианты Fc-доменов IgG1 человека с уменьшенным связыванием с CD32B и/или повышенным связыванием с CD16A содержат замены F243L, R929P, Y300L, V305I или P296L. Такие аминокислотные замены могут присутствовать в Fc-домене IgG1 человека в любом сочетании. В соответствии с одним вариантом осуществления вариант Fc-домена IgG1 человека содержит замену F243L, R929P и Y300L. В соответствии с другим вариантом осуществления вариант Fc-домена IgG1 человека содержит замену F243L, R929P, Y300L, V305I и P296L. В соответствии с другим вариантом осуществления вариант Fc-домена IgG1 человека содержит замену N297Q, замены L234A и L235A или замену D265A, поскольку эти мутации устраняют связывание с FcR. Домен CH2-CH3 первой полипептидной цепи таких молекул будет иметь "несущую выступ" последовательность (SEQ ID NO:22):

```
PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLWCLV KGFYPSDIAV
EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
EALHNNYTQK SLSLSPGK
```

или "несущую впадину" последовательность с заменой H435R для устранения связывания с белком A (SEQ ID NO:23):

```
PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV
EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
EALHNRYTQK SLSLSPGK
```

Как будет понятно, "несущий впадину" домен CH2-CH3 (например, SEQ ID NO:22) может быть использован в первой полипептидной цепи, в этом случае "несущий выступ" домен CH2-CH3 (например, SEQ ID NO:22) будет использован в третьей полипептидной цепи.

Для биспецифичных тетравалентных диател по настоящему изобретению, у которых первая и третья полипептидные цепи не отличаются, предпочтительным доменом CH2-CH3 является модифицированный домен CH2-CH3 с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO:24):

```
PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD TLYITREPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
EALHNHYTQK SLSLSPG
```

Таким образом, в общем, предпочтительные первая и третья полипептидные цепи предпочтительного биспецифичного тетравалентного диатела PD-1 × LAG-3 Fc-DART® по настоящему изобретению имеют идентичные последовательности, а вторая и четвертая полипептидные цепи таких предпочтительных биспецифичных тетравалентных диател PD-1 × LAG-3 Fc-DART® имеют идентичные последовательности, которые показаны в табл. 3.

Таблица 3

Вариативность	Домены первой и третьей полипептидных цепей	Домены второй и четвертой полипептидных цепей
I	(VL эпитоп-связывающего домена к PD-1) — (линкер) — (VH эпитоп-связывающего домена к LAG-3) — (линкер) — (содержащий модифицированную E-спираль, облегчающий образование гетеродимера домен) — (линкер) — (модифицированный домен CH2-CH3)	(VL эпитоп-связывающего домена к LAG-3) — (линкер) — (VH эпитоп-связывающего домена к PD-1) — (линкер) — (содержащий модифицированную K-спираль, облегчающий образование гетеродимера домен)
II	(VL эпитоп-связывающего домена к PD-1) — (линкер) — (VH эпитоп-связывающего домена к LAG-3) — (линкер) — (содержащий модифицированную K-спираль, облегчающий образование гетеродимера домен) — (линкер) — (модифицированный домен CH2-CH3)	(VL эпитоп-связывающего домена к LAG-3) — (линкер) — (VH эпитоп-связывающего домена к PD-1) — (линкер) — (содержащий модифицированную E-спираль, облегчающий образование гетеродимера домен)
III	(VL эпитоп-связывающего домена к LAG-3) — (линкер) — (VH эпитоп-связывающего домена к PD-1) — (линкер) — (содержащий модифицированную E-спираль, облегчающий образование гетеродимера домен) — (линкер) — (модифицированный домен CH2-CH3)	(VL эпитоп-связывающего домена к PD-1) — (линкер) — (VI эпитоп-связывающего домена к LAG-3) — (линкер) — (содержащий модифицированную K-спираль, облегчающий образование гетеродимера домен)
IV	(VL эпитоп-связывающего домена к LAG-3) — (линкер) — (VH эпитоп-связывающего домена к PD-1) — (линкер) — (содержащий модифицированную K-спираль, облегчающий образование гетеродимера домен) — (линкер) — (модифицированный домен CH2-CH3)	(VL эпитоп-связывающего домена к PD-1) — (линкер) — (VH эпитоп-связывающего домена к LAG-3) — (линкер) — (содержащий модифицированную E-спираль, облегчающий образование гетеродимера домен)

2. Первое иллюстративное биспецифичное диатело PD-1 × LAG-3 Fc-DART® (PD-1 × LAG-3 Fc-DART®-1).

Первое особенно предпочтительное биспецифичное тетравалентное диатело PD-1 × LAG-3 Fc-DART® по настоящему изобретению ("PD-1 × LAG-3 Fc-DART®-1") имеет первую и третью полипептидные цепи с идентичной последовательностью. Такая первая/третья полипептидная цепь имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:25):

```

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSSIS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ
GTNLEIKGGG SGGGQVQLV ESGGVVQPG RSLRLDCKAS GITFSNSGMH
WVRQAPGKGL EWWAVIWDG SKRYYADSVK GRFTISRDNK KNTLFLQMNS
LRAEDTAVYY CATNDDYWGQ GTLVTVSSGG CGGGEVAACE KEVAALEKEV
AALEKEVAAL EKLEPKSADK THTCPPCPAP EAAGGPSVFL FPPKPKDTLY
ITREPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV
VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF
PSREEMTKNQ VSLTCLVKGK YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG
SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLK LSPG

```

где аминокислотные остатки 1-107 являются аминокислотными остатками варибельного домена легкой цепи LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 12), аминокислотные остатки 108-115 являются аминокислотными остатками линкера GGGSGGG (SEQ ID NO: 13), аминокислотные остатки 116-228 являются аминокислотными остатками варибельного домена тяжелой цепи PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:2), аминокислотные остатки 229-234 являются аминокислотными остатками цистеин-содержащего разделяющего пептида GGCGGG (SEQ ID NO: 18), аминокислотные остатки 235-262 являются аминокислотными остатками модифицированной E-спирали (SEQ ID NO: 16), аминокислотные остатки 263-277 являются аминокислотными остатками цистеин-содержащего линкерного пептида LEPKSADKTHTCPPC (SEQ ID NO:20), а аминокислотные остатки 278-494 являются аминокислотными остатками модифицированного домена CH2-CH3 (SEQ ID NO:24).

Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует такую первую/третью полипептидную цепь, представляет собой (SEQ ID NO:26):

```

gaaattgtcc tgacacagtc tcccgcaacc ctgagtttga gtccctgggga
gcgagcaact ctctcctgcc gagcctccca gagtatctcc tcctacctcg
cctggtacca acagaagcca gggcaggctc caaggctgct tatctatgac
gcctctaacc gcgcaactgg gattcccgca cgcttctccg gctctggttc
cggcacagac tttacactta ctatctctag cctggagcca gaagactttg
ccgtgtacta ttgtcagcaa cgttccaatt ggccccttac ctttgggcag
ggcactaact tggaaatcaa aggtggcgga tccggcggcg gaggccaggt
tcagctggtc gagagtggg gcggcgttgt gcaacctggg cgttccctcc
gattggactg taaagcttcc ggcattactt tctcaaattc cgcatgcat
tgggtgaggc aagcccctgg aaaaggctc gaatgggtgg ctgtgatttg
gtacgatggc agcaaacggt actacgccga ttctgttaag ggccgcttta
ccatctcccc cgataactca aagaacacac tgtttctgca aatgaatagt
cttagagccg aggacaccgc cgtgtactac tgtgccacaa atgacgatta
ttgggggcag ggcacattgg tcacagtgtc ttccggagga tgtggcggtg
gagaagtggc cgcatgtgag aaagaggttg ctgctttgga gaaggaggtc
gctgcacttg aaaaggaggt cgcagccctg gaaaaactgg agcccaaatc
tgctgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagccgcgg
ggggaccgtc agtcttctc ttcccccaa aaccaagga caccctctat
atcaccggg agcctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga
agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata
atgccaaagc aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta
caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca
tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc
ccatcccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt
caaagcctc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatggg
agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca
ggggaacgct ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact
acacgcagaa gacgctctcc ctgtctccgg gt

```

Вторая и четвертая полипептидные цепи такого PD-1 × LAG-3 Fc-DART®-1 имеют идентичные последовательности. Такая вторая/четвертая полипептидная цепь имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:27):

```

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
GTKVEIKGGG SGGGGQVQLQ QWGAGLLKPS ETLISLTCVY GGSFSDYYWN
WIRQPPGKGL EWIGEINHNG NTNSNP SLKS RVTLSLDTSK NQFSLKLRVS
TAADTAVYYC AFGYSDEYFN WFDPWGQGT L VTVSSGGCGG GKVAACKEKV
AALKEKVAAL KEKVAALKE

```

где аминокислотные остатки 1-107 являются аминокислотными остатками варибельного домена легкой цепи PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:3), аминокислотные остатки 108-115 являются аминокислотными остатками линкера GGSGGGG (SEQ ID NO: 13), аминокислотные остатки 116-235 являются аминокислотными остатками варибельного домена тяжелой цепи LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 11), аминокислотные остатки 236-241 являются аминокислотными остатками цистеин-содержащего разделяющего пептида GGCGGG (SEQ ID NO: 18), аминокислотные остатки 242-269 являются аминокислотными остатками модифицированной К-спирали (SEQ ID NO: 17). Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует такую вторую/четвертую полипептидную цепь, представляет собой (SEQ ID NO:28):

```
gagatcgtag ttaccagtc tcccgccacc cttccctga gtctgggtga
gcggggccact ctttcctgtc gcgcaagcca atcagtttct agctacctcg
catggtatca gcagaagcca gggcaggcac ccaggcttct catctatgac
gccagtaacc gcgcaaccgg gatacctgct agattttccg gcagtggatc
tgggaccgat ttcacactga caatttcac cttggaacca gaagatttccg
cagtctacta ctgccagcaa tcttccaact ggccaagaac tttcggacag
gggaccaaag tggaaattaa aggtggcgga tccggcgggc gaggccaggc
ccagctccag caatggggag ccgggctgct gaaaccctct gaaacactga
gtctcacatg tgccgtttat ggaggttct tctccgatta ttactggaac
tggtattcgtc agcctcccgg caagggcctg gagtggatcg gtgagattaa
ccacaatggc aataccaata gcaatcctag tttgaaatct cgcgtcactc
tttccctcga tacaagcaaa aaccagtttt ctttgaaatt gcgatctgta
actgctgctg atactgccgt gtattactgc gcattcggct actccgacta
tgaatataat tggttcgtc cttggggaca gggaacattg gtaaccgtgt
catccggagg atgtggcggt ggaaaagtgg ccgcatgtaa ggagaaagtt
gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt aaggaaaagg tcgcagccct
gaaagag
```

3. Второе иллюстративное биспецифичное диатело PD-1 × LAG-3 Fc-DART® (PD-1 × LAG-3 Fc-DART®-2).

Второе особенно предпочтительное биспецифичное тетравалентное диатело PD-1 × LAG-3 Fc-DART® по настоящему изобретению ("PD-1 × LAG-3 Fc-DART®-2") имеет первую и третью полипептидные цепи с идентичной последовательностью. Такая первая/третья полипептидная цепь имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:29):

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRTGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
GTKVEIKGGG SGGGQVQLQ QWGAGLLKPS ETLSLTCAVY GGSFSDYYWN
WIRQPPGKGL EWIGEINHNG NTNSNPSLKS RVTLSLDTSK NQFSLKLRV
TAADTAVYYC AFGYSDEYFN WFDPWGQGTI TVVSSGGCGG GEVAACEKEV
AALEKEVAAL EKEVAALEKL EPKSADKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP
KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKQPRE
PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP
PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSP
G
```

где аминокислотные остатки 1-107 являются аминокислотными остатками варибельного домена легкой цепи PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:3), аминокислотные остатки 108-115 являются аминокислотными остатками линкера GGSGGGG (SEQ ID NO: 13), аминокислотные остатки 116-235 являются аминокислотными остатками варибельного домена тяжелой цепи LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 11), аминокислотные остатки 236-241 являются аминокислотными остатками цистеин-содержащего разделяющего пептида GGCGGG (SEQ ID NO: 18), аминокислотные остатки 242-269 являются аминокислотными остатками модифицированной Е-спирали (SEQ ID NO: 16), аминокислотные остатки 270-284 являются аминокислотными остатками цистеин-содержащего линкерного пептида LEPKSADKTHTCP (SEQ ID NO:20), а аминокислотные остатки 285-501 являются аминокислотными остатками модифицированного домена CH2-CH3 (SEQ ID NO:24).

Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует такую первую/третью полипептидную цепь, представляет собой (SEQ ID NO:30):

gagatcgtac ttaccagtc tcccgccacc ctttcctga gtcctgggta  
gcggggcact ctttcctgtc gcgcaagcca atcagtttct agctacctcg  
catggtatca gcagaagcca gggcaggcac ccaggcttct catctatgac  
gccagtaacc gcgcaaccgg gatacctgct agattttccg gcagtggatc  
tgggaccgat ttcacactga caatttcac cttggaacca gaagatttcg  
cagtctacta ctgccagcaa tcttccaact ggccaagaac tttcggacag  
gggaccaaag tggaaattaa aggtggcgga tccggcgcg gaggccaggt  
ccagctccag caatggggag ccgggctgct gaaaccctct gaaacactga  
gtctcacatg tgccgtttat ggaggttcct tctccgatta ttactggaac  
tggattcgtc agcctcccgg caagggcctg gaggggatcg gtgagattaa  
ccacaatggc aataccaata gcaatcctag tttgaaatct cgcgtcactc  
tttccctcga tacaagcaaa aaccagtttt ctttgaaatt gcgatctgta  
actgctgctg atactgccgt gtattactgc gcattcggct actccgacta  
tgaatataat tggttcgatc cttggggaca gggaacattg gtaaccgtgt  
catccggagg atgtggcggg ggagaagtgg ccgcatgtga gaaagaggtt  
gctgctttgg agaaggagg cgctgcactt gaaaaggagg tcgcagccct  
ggagaaactg gagcccaaat ctgctgacaa aactcacaca tgcccaccgt  
gcccagcacc tgaagccgcg gggggaccgt cagtcttcct cttccccca  
aaacccaagg acaccctcta taccaccgg gagcctgagg tcacatgctg  
ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg  
tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggagggagcag  
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga  
ctggctgaat ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac aaagccctcc  
cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa  
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca  
ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg  
tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct  
cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt  
ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc  
atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg  
ggt

Вторая и четвертая полипептидные цепи PD-1 × LAG-3 Fc-DART®-2 имеют идентичные последовательности. Такая вторая/четвертая полипептидная цепь имеют аминокислотную последовательность (SEQ ID NO:31):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQISIS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD  
ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ  
GTNLEIKGGG SGGGGQVQLV ESGGGVQPG RSLRLDCKAS GITFSNSGMH  
WVRQAPGKGL EWVAWIWYDG SKRYADSVK GRFTISRDNK KNTLFLQMNS  
LRAEDTAVYY CATNDYWGQ GTLTVVSSGG CGGGKVAACK EKVAALKEKV  
AALKEKVAAL KE

где аминокислотные остатки 1-107 являются аминокислотными остатками варибельного домена легкой цепи LAG-1 mAb 1 (SEQ ID NO: 12), аминокислотные остатки 108-115 являются аминокислотными остатками линкера

GGGSGGGG

(SEQ ID NO: 13), аминокислотные остатки 116-228 являются аминокислотными остатками варибельного домена тяжелой цепи PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:2), аминокислотные остатки 229-234 являются аминокислотными остатками цистеинсодержащего разделяющего пептида

GGCGGG

(SEQ ID NO: 18), аминокислотные остатки 235-262 являются аминокислотными остатками модифицированной К-спирали (SEQ ID NO: 17). Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует такую вторую/четвертую полипептидную цепь, представляет собой (SEQ ID NO:32):



```

gaaattgtcc tgacacagtc tcccgcaacc ctgagtttga gtccctgggga
gcgagcaact ctctcctgcc gagcctccca gagtatctcc tcctacctcg
cctggtacca acagaagcca gggcaggctc caaggctgct tatctatgac
gcctctaacc gcgcaactgg gattcccgca cgcttctccg gctctggttc
cggcacagac tttacactta ctatctctag cctggagcca gaagactttg
ccgtgtacta ttgtcagcaa cgttccaatt ggccccttac ctttgggcag
ggcactaact tggaaatcaa aggtggcgga tccggcgcg gaggccaggt
tcagctggtc gagagtggg gcggcggtgt gcaacctggg cgttccctcc
gattggactg taaagcttcc ggcattactt tctcaaattc cggcatgcat
tgggtgaggg aagcccctgg aaaagggctc gaatgggtgg ctgtgatttg
gtacgatggc agcaaacggt actacgccga ttctgttaag ggccgcttta
ccatctcccg cgataactca aagaacacac tgtttctgca aatgaatagt
cttagagccg aggcacccgc cgtgtactac tgtgccacaa atgacgatta
ttgggggcag ggcacattgg tcacagtgtc ttccggagga tgtggcggtg
gaaaagtggc cgcatgtaag gagaaagttg ctgctttgaa agagaaggtc
gccgcactta aggaaaaggt cgcagccctg aaagag

```

### III. Фармацевтические композиции.

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям для лечения злокачественной опухоли или заболевания, ассоциированного с наличием патогена. Такие композиции включают бестарные лекарственные композиции, пригодные в производстве фармацевтических композиций (например, неочищенных или нестерильных композиций) и фармацевтических композиций (т. е. композиций, которые пригодны для введения субъекту или пациенту), которые можно применять при получении стандартных лекарственных форм. Такие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество модифицированного биспецифичного диатела PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению (и в особенности биспецифичного тетравалентного диатела PD-1 × LAG-3 Fc-DART® по настоящему изобретению) и фармацевтически приемлемый носитель. Предпочтительно композиции по настоящему изобретению содержат профилактически или терапевтически эффективное количество одной или нескольких молекул по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим такие модифицированные диатела и второе терапевтическое анти тело, которое является специфичным к конкретному патоген-ассоциированному антигену, и фармацевтически приемлемый носитель.

Применяемый в настоящем документе термин "злокачественная опухоль" относится к заболеванию, характеризующемуся наличием злокачественной опухоли. Такая злокачественная опухоль включает злокачественную опухоль надпочечника, ассоциированную со СПИДом злокачественную опухоль, альвеолярную саркому мягких тканей, астроцитарную опухоль, злокачественную опухоль мочевого пузыря, злокачественную опухоль костей, злокачественную опухоль головного и спинного мозга, метастатическую опухоль головного мозга, злокачественную опухоль молочной железы, опухоль каротидного тельца, злокачественную опухоль шейки матки, хондросаркому, хордому, хромофобную почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному, злокачественную опухоль толстой кишки, колоректальную злокачественную опухоль, кожную доброкачественную фиброзную гистиоцитому, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпендимому, опухоль Юинга, внескелетную слизеподобную хондросаркому, несовершенный костный фиброгенез, фиброзную дисплазию кости, злокачественную опухоль желчного пузыря или желчного протока, гастральную злокачественную опухоль, гестационную трофобластическую болезнь, эмбрионально-клеточную опухоль, злокачественную опухоль головы и шеи, гепатоклеточную карциному, опухоль островков поджелудочной железы, саркому Капоши, злокачественную опухоль почки, лейкоз, липому/доброкачественную липоматозную опухоль, липосаркому/злокачественную липоматозную опухоль, злокачественную опухоль печени, лимфому, злокачественную опухоль легкого, гранулобластому, меланому, менингиому, множественные эндокринные неоплазии, множественную миелому, миелодиспластический синдром, нейробластому, нейроэндокринные опухоли, злокачественную опухоль яичника, злокачественную опухоль поджелудочной железы, сосковидную карциному щитовидной железы, опухоль паращитовидных желез, злокачественную опухоль у детей, опухоль влаглища периферического нерва, феохромоцитому, опухоль гипофиза, злокачественную опухоль простаты, позднюю увеальную меланому, нарушение, связанное с разжижением крови, почечную метастатическую злокачественную опухоль, палочковидную опухоль, рабдомиосаркому, саркому, злокачественную опухоль кожи, саркому мягкой ткани, плоскоклеточную злокачественную опухоль, злокачественную опухоль желудка, синовиальную саркома, злокачественную опухоль яичка, тимусную карциному, тимому, метастатическую злокачественную опухоль щитовидной железы или злокачественную опухоль матки.

Применяемый в настоящем документе термин "заболевание, ассоциированное с наличием патогена", относится к заболеванию, ассоциированному с инфицированием бактерией (например, E. coli, S.

difficile, Salmonella thyphimurium, Pseudomonas aeruginosa, Vibrio cholerae, Neisseria gonorrhoeae, Helicobacter pylori, Hemophilus influenzae, Shigella dysenteriae, Staphylococcus aureus, Mycobacterium tuberculosis и Streptococcus pneumoniae и т.д.), грибом (например, Candida, Aspergillus, Cryptococcus, Coccidioides, Histoplasma, Pneumocystis, Stachybotrys и т.д.), простейшим (Amoebozoa, Excavata, Chromalveolata, Entamoeba, Plasmodium, Giardia, Trypanosoma, Coccidia, Besnoitia, Dicrocoelium, Leishmania и т. д.) или вирусом (и особенно аденовирусом, аденоассоциированным вирусом, вирусом В (macacine herpesvirus I), вирусом ВК, буньявирусом, вирусом чикунгунья, вирусом Коксаки, коронавирусом, цитомегаловирусом, вирусом, вызывающим восточный энцефалит лошадей, вирусом Эбола, энтеровирусом, вирусом Эпштейна-Барра, хантавирусом, вирусом гепатита А, вирусом гепатита В, вирусом гепатита С, вирусом гепатита D, вирусом гепатита Е, вирусом простого гепатита 1, вирусом простого гепатита 2, спумавирусом человека, герпес-вирусом человека 3, герпес-вирусом человека 5, герпес-вирусом человека 6, герпес-вирусом человека 7, вирусом иммунодефицита человека, вирусом папилломы человека,  $\beta$ -лимфотропным вирусом человека, вирусом Т-клеточного лейкоза человека I, вирусом Т-клеточного лейкоза человека II, вирусом гриппа, вирусом Джона Каннингема, вирусом японского энцефалита, герпес-вирусом, ассоциированным с саркомой Капоши, вирусом Ласса, вирусом лимфоцитарного хориоменингита, вирусом, вызывающим "марбургскую болезнь", вирусом кори, вирусом эпидемического паротита, вирусом Нипах, норовирусом, вирусом Норуолк, ортотровирусом, вирусом парагриппа, парвовирусом, вирусом полиомиелита, вирусом бешенства, реовирусом, респираторно-синцитиальным вирусом, риновирусом, вирусом лихорадки долины Рифт, ротавирусом, вирусом коревой краснухи, вирусом оспы человека, вирусом энцефалита Сент-Луис, вирусом натуральной оспы, вирусом белой оспы, вирусом опоясывающего лишая, вирусом Западного Нила, вирусом западного энцефалита лошадей или вирусом желтой лихорадки).

Применяемые в настоящем документе термины "лечение" или "проведение лечения" означают некоторый подход, целью которого является получение лечебного или требуемого результата, в том числе и предпочтительно лечебного или требуемого клинического результата. Такие лечебные или требуемые результаты включают без ограничения одно или несколько из следующих: уменьшение пролиферации (или уничтожение) инфицированных клеток или других пораженных заболеванием клеток, снижение интенсивности симптомов заболевания, повышение качества жизни у страдающих заболеванием, снижение дозы других лекарственных препаратов, необходимых для лечения заболевания, замедление прогрессирования заболевания и/или удлинение срока жизни у принимающих лечение домашних животных.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регуляторным органом федерального правительства или правительства штата или перечисленный в перечне в Фармакопее США или в другой общепризнанной фармакопее для применения на животных и, более конкретно, на людях. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту (например, адьюванту Фрейнда (полному или неполному)), вспомогательному средству или основе, с которой вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода или масла, включая носители нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, сезамовое масло и др. Вода является предпочтительным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. В качестве жидких носителей, в частности для инъекционных растворов, также можно использовать солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина. Подходящие фармацевтические вспомогательные средства включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицеролмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и др. Композиция, при необходимости, также может содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих средств или буферных средств для регуляции pH. Такие композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсии, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и др.

Обычно ингредиенты композиций по настоящему изобретению поставляются либо раздельно, либо смешанными в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытой емкости, такой как ампула или саше, на которой указано количество активного вещества. При введении композиции путем инфузии ее диспергируют с водой или солевым раствором фармацевтической степени чистоты, которые содержатся в инфузионном флаконе. При введении композиции путем инъекции может поставляться ампула со стерильной водой для инъекции или солевым раствором с тем, чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

Композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в нейтральных или солевых формах. Фармацевтически приемлемые соли включают без ограничения соли, образованные с такими анионами, как полученные из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислоты и т.д., и анионы, образованные с такими катионами, как полученные из гидроксида натрия, калия, аммония, кальция, трехвалентного железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической упаковке или набору, включающему одну или несколько емкостей, которые содержат биспецифичное диалело PD-1  $\times$  LAG-3 по настоящему

изобретению, отдельно или с таким фармацевтически приемлемым носителем. Дополнительно, в фармацевтическую упаковку или набор можно также включить одно или несколько других профилактических или терапевтических средств, пригодных для лечения заболевания. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической упаковке или набору, которые включают одну или несколько емкостей, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций по настоящему изобретению. Необязательно с такой емкостью(-ями) может быть ассоциировано информационное сообщение в форме, предписанной правительственным органом, контролирующим производство, применение и распространение фармацевтических средств или биологических продуктов, причем в этом информационном сообщении указано одобрение этим органом производства, применения или распространения для приема людьми.

Настоящее изобретение относится к наборам, которые можно применять в соответствии с описанными выше способами. В соответствии с одним вариантом осуществления набор включает одну или несколько молекул по настоящему изобретению. В соответствии с другим вариантом осуществления набор дополнительно включает одно или несколько других профилактических или терапевтических средств, пригодных для лечения злокачественной опухоли или заболевания, которые характеризуются наличием патоген-ассоциированного антигена, в одной или нескольких емкостях. В соответствии с другим вариантом осуществления набор дополнительно включает одно или несколько антител или диател, которые связывают один или несколько патоген-ассоциированных антигенов. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления другим профилактическим или терапевтическим средством является химиотерапевтическое средство. В соответствии с другими вариантами осуществления профилактическим или терапевтическим средством является биологическое или гормональное терапевтическое средство.

#### IV. Способы получения биспецифичных диател PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению.

Биспецифичные диатела PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению наиболее предпочтительно получают с помощью рекомбинантной экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует такие полипептиды, что хорошо известно из уровня техники.

Полипептиды по настоящему изобретению беспрепятственно можно получить с помощью твердофазного пептидного синтеза (Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis," *Science* 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century," *Mini Rev. Med. Chem.* 6(1):3-10).

В качестве альтернативы, антитела можно получить рекомбинантно и экспрессировать с помощью любого известного из уровня техники способа. Антитела можно получить рекомбинантно путем сначала выделения антител, полученных от животных-хозяев, получения последовательности гена и использования последовательности гена для рекомбинантной экспрессии антитела в клетках-хозяевах (например, клетках CHO). Другой способ, который можно использовать, предусматривает экспрессию последовательности антитела в растениях (например, табаке) или трансгенном молоке. Были раскрыты подходящие способы рекомбинантной экспрессии антитела в растениях или молоке (см., например, Peeters et al. (2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants," *Vaccine* 19:2756; Lonberg, N. et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," *Int. Rev. Immunol* 13:65-93; and Pollock et al. (1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies," *J. Immunol Methods* 231:147-157). Из уровня техники известны подходящие способы получения производных антител, например, химерных, гуманизированных, одноцепочечных и т. д. В качестве другой альтернативы антитела можно получить рекомбинантно с помощью технологии фагового дисплея (см., например, патенты США № 5565332, 5580717, 5733743, 6265150 и работу Winter, G. et al. (1994) "Making Antibodies By Phage Display Technology," *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455).

Представляющие интерес антитела или белок можно подвергнуть секвенированию согласно методу расщепления по Эдману, который хорошо известен специалистам в настоящей области. Информацию о пептидах, полученную с помощью масс-спектрометрии или методом расщепления по Эдману, можно использовать для конструирования зондов или праймеров, которые применяются для клонирования представляющего интерес белка.

Альтернативный способ клонирования представляющего интерес белка предусматривает "пэннинг" с использованием очищенных белков или их частей в отношении клеток, экспрессирующих представляющие интерес антитела или белок. Процедуру "пэннинга" можно осуществить путем получения библиотеки кДНК из тканей или клеток, которые экспрессируют или сверхэкспрессируют необходимые молекулы кДНК, во втором типе клеток и скрининга трансфицированных клеток второго типа клеток в отношении специфичного связывания необходимого белка. Подробное описание способов, используемых при клонировании генов млекопитающих, которые кодируют белки клеточной поверхности, методом "пэннинга", можно найти в литературе настоящей области техники (см., например, Aruffo, A. et al. (1987) "Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 84:8573-8577, и Stephan, J. et al. (1999) "Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ De-

velopment: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation," *Endocrinol.* 140:5841-5854).

Молекулы кДНК, кодирующие антитела и другие пептидные агонисты, антагонисты и модуляторы, можно получить путем обратной транскрипции молекул мРНК из конкретного типа клеток в соответствии со стандартными для настоящей области техники способами. В частности, мРНК можно выделить с помощью различных литических ферментов или химических растворов согласно процедурам, изложенным в упомянутой выше работе Sambrook и соавт., или экстрагировать с помощью коммерчески доступных смол, связывающих молекулы нуклеиновых кислот, согласно прилагаемым инструкциям, которые предоставляются производителями (например, Qiagen, Invitrogen, Promega). Синтезированные молекулы кДНК затем встраивают в вектор экспрессии с получением представляющего интерес антитела или белка в клетках второго типа. Подразумевают, что вектор экспрессии должен быть способным к репликации в клетках-хозяевах либо в виде эписом, либо в качестве неотъемлемой части хромосомной ДНК. Подходящие векторы экспрессии включают без ограничений плазмиды, вирусные векторы, в том числе аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы и космиды.

Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотиды, можно ввести в клетку-хозяина с помощью любого из ряда соответствующих способов, в том числе электропорацией, трансфекцией с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, диэтиламиноэтилдекстрана или других веществ; бомбардировкой микрочастицами; липофекцией и инфицированием (например, если вектор представляет собой инфекционный агент, такой как вирус коровьей оспы). Выбор вводимых векторов или полинуклеотидов зачастую будет зависеть от характеристик клетки-хозяина.

Для выделения генов, кодирующих представляющие интерес антитело, полипептид или белок, можно использовать любые клетки-хозяева, которые способны к сверхэкспрессии гетерологичных молекул ДНК. Неограничивающие примеры подходящих клеток-хозяев млекопитающих включают без ограничения клетки COS, HeLa и CHO. Предпочтительно клетки-хозяева экспрессируют молекулы кДНК на уровне, который приблизительно в 5 раз выше, более предпочтительно в 10 раз выше, более предпочтительно в 20 раз выше, более предпочтительно в 50 раз выше, более предпочтительно в 100 раз выше, чем у соответствующего представляющего интерес эндогенного антитела или белка, при наличии, в клетках-хозяевах. Скрининг клеток-хозяев в отношении специфичного связывания с необходимым белком предпочтительно осуществляют с помощью иммуноанализа или FACS. Клетку, сверхэкспрессирующую представляющие интерес антитело или белок, можно выявить при помощи описанного далее способа.

Также доступны различные методики, которые теперь можно использовать для получения мутантных пептидных агонистов, антагонистов и модуляторов, которые кодируют дополнения, делеции или изменения в аминокислотной последовательности получаемого в результате белка относительно исходной молекулы пептидного агониста, антагониста или модулятора.

Настоящее изобретение относится к модификациям в биспецифичном диателе PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению, которые не оказывают значительного влияния на его свойства, и к вариантам, которые обладают повышенной или пониженной активностью. Модификация полипептидов является отработанной технологией в настоящей области. Примеры модифицированных полипептидов включают полипептиды с консервативными заменами аминокислотных остатков, одной или несколькими делециями или добавлениями аминокислот, которые не оказывают значительного негативного воздействия на функциональную активность, или применение химических аналогов. Аминокислотные остатки, которые могут быть подвергнуты взаимной аминокислотной замене, включают без ограничения глицин/аланин; валин/изолейцин/лейцин; аспарагин/глутамин; аспарагиновая кислота/глутаминовая кислота; серин/треонин; лизин/аргинин и фенилаланин/тирозин. Эти полипептиды также включают гликозилированные и негликозилированные полипептиды, а также полипептиды с другими посттрансляционными модификациями, такими как, например, гликозилирование другими сахарами, ацетилирование и фосфорилирование. Предпочтительно аминокислотные замены будут консервативными, т. е. заменяемая аминокислота будет обладать такими же химическими свойствами, что и исходная аминокислота. Такие консервативные замены известны из уровня техники, а их примеры приведены ранее. Аминокислотные модификации могут варьировать от изменения или модификации одной или нескольких аминокислот до полной перестройки участка, такого как варибельный участок. Изменения в варибельном участке могут изменять аффинность и/или специфичность связывания. Другие способы модификации включают применение технологии связывания, которая известна из уровня техники, в том числе без ограничения ферментативных средств, окислительное замещение и хелатообразование. Модификации можно использовать, например, для присоединения меток для иммуноанализа, такого как присоединение радиоактивных групп для радиоиммуноанализа. Модифицированные полипептиды получают с помощью общепринятых в настоящей области процедур, и их можно подвергнуть скринингу с помощью стандартных анализов, которые известны из уровня техники.

Настоящее изобретение также относится к гибридным белкам, содержащим один или несколько фрагментов или участков из полипептидов и антител по настоящему изобретению. В соответствии с одним вариантом осуществления предложен гибридный полипептид, который содержит по меньшей мере 10 смежных аминокислот варибельного участка легкой цепи и по меньшей мере 10 аминокислот варибельного участка тяжелой цепи. В соответствии с другим вариантом осуществления гибридный полипеп-

тид содержит гетерологичный иммуноглобулиновый константный участок. В соответствии с другим вариантом осуществления гибридный полипептид содержит вариабельный участок легкой цепи и вариабельный участок тяжелой цепи антитела, полученного от публично доступной депонированной гибридомы. В контексте настоящего изобретения гибридный белок антитела содержит один или несколько полипептидных доменов, которые специфично связываются с необходимым вирусным эпитопом или необходимым активирующим рецептором иммунной эффекторной клетки или белком, который присутствует на поверхности иммунной эффекторной клетки, которая экспрессирует такой активирующий рецептор, и другую аминокислотную последовательность, к которой он не прикрепляется в нативной молекуле, например, гетерологичную последовательность или гомологичную последовательность из другого участка.

Настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим аминокислотную последовательность антител по настоящему изобретению. Полипептиды по настоящему изобретению можно получить с помощью процедур, которые известны из уровня техники. Полипептиды можно получить с помощью протеолитического или другого расщепления антител, с помощью рекомбинантных способов (т. е. отдельные или гибридные полипептиды), как описано выше, или с помощью химического синтеза. Полипептиды антитела, особенно более короткие полипептиды до приблизительно 50 аминокислот, удобно получать с помощью химического синтеза. Способы химического синтеза известны из уровня техники и коммерчески доступны. Например, такой полипептид можно получить с помощью автоматического синтезатора полипептидов с использованием твердофазного способа.

#### V. Применения композиций по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение относится к композициям, в том числе фармацевтическим композициям, содержащим биспецифичные диатела PD-1  $\times$  LAG-3 по настоящему изобретению, полипептиды, получаемые из таких молекул, полинуклеотиды, содержащие последовательности, которые кодируют такие молекулы или полипептиды, и другие средства, описанные в настоящем документе.

В связи с тем, что биспецифичные диатела PD-1  $\times$  LAG-3 по настоящему изобретению обладают способностью уменьшать ингибирование иммунной системы, опосредованное PD-1 и LAG-3, биспецифичные диатела PD-1  $\times$  LAG-3 по настоящему изобретению можно применять для лечения любого заболевания или состояния, ассоциированного с нежелательной супрессией иммунной системы, в том числе злокачественной опухоли и заболеваний, которые ассоциированы с наличием патогена (например, бактериальной, грибковой, вирусной инфекции или инфекции, вызванной простейшими).

#### VI. Способы введения.

Композиции по настоящему изобретению могут быть предложены для лечения, профилактики и облегчения одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием, нарушением или инфекцией, путем введения субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по настоящему изобретению. В соответствии с предпочтительным аспектом такие композиции являются практически очищенными (т. е. практически не содержат веществ, которые ограничивают ее влияние или производят нежелательные побочные эффекты). В соответствии с конкретным вариантом осуществления субъектом является млекопитающее, предпочтительно такое млекопитающее, как отличное от примата млекопитающее (например, корова, лошадь, кошка, собака, грызун и т. д.) или примат (например, обезьяна, такая как яванский макак, человек и т. д.). В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления субъектом является человек.

Известны различные системы доставки, и их можно применять для введения композиций по настоящему изобретению, например, инкапсулирование в липосомах, микрочастицах, микрокапсулах, рекомбинантные клетки, способные к экспрессии антитела или гибридного белка, рецептор-опосредованному эндоцитозу (см., например, Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," J. Biol. Chem. 262:4429-4432), конструкция нуклеиновой кислоты как часть ретровирусного или другого вектора и т. д.

Способы введения биспецифичных диател PD-1  $\times$  LAG-3 по настоящему изобретению включают без ограничения парентеральное введение (например, внутривенное, внутримышечное, внутривенное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и чрезслизистое (например, интраназальный и пероральный пути). В соответствии с конкретным вариантом осуществления молекулы по настоящему изобретению вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композиции можно вводить любым традиционным путем, например, путем инфузии или струйной инъекции, путем всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т. д.), и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным и локальным. Кроме того, также можно использовать ингаляционное введение, например, с помощью ингалятора или небулайзера и состава с аэролизующим средством. См., например, патенты США № 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 и 4880078, и РСТ публикации № WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903, каждый из которых включен в настоящий документ с помощью ссылки в его полном объеме.

Настоящее изобретение также относится к тому, что биспецифичные диатела PD-1  $\times$  LAG-3 по настоящему изобретению могут быть упакованы в герметично закрываемую емкость, такую как ампула

или саше, на которой указано количество таких молекул. В соответствии с одним вариантом осуществления биспецифичные диатела PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению поставляют в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытой емкости, и их можно ресуспендировать, например, при помощи воды или солевого раствора до соответствующей концентрации для введения субъекту. Предпочтительно биспецифичные диатела PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению поставляют в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка в герметично закрытой емкости в однократной дозировке, составляющей по меньшей мере 5 мкг, более предпочтительно по меньшей мере 10 мкг, по меньшей мере 15 мкг, по меньшей мере 25 мкг, по меньшей мере 50 мкг, по меньшей мере 100 мкг или по меньшей мере 200 мкг.

Лиофилизированные биспецифичные диатела PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению следует хранить при температуре 2-8°C в их оригинальной емкости, а молекулы следует вводить в пределах 12 часов, предпочтительно в пределах 6 ч, в пределах 5 ч, в пределах 3 ч или в пределах 1 ч после ресуспендирования. В соответствии с альтернативным вариантом осуществления биспецифичные диатела PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению поставляют в жидкой форме в герметично закрытой емкости, на которой указано количество и концентрация молекулы, гибридного белка или конъюгированной молекулы. Предпочтительно жидкую форму биспецифичных диател PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению поставляют в герметично закрытой емкости, в которой присутствуют молекулы в концентрации по меньшей мере 1 мкг/мл, более предпочтительно по меньшей мере 2,5 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл или по меньшей мере 100 мкг/мл.

В контексте настоящего документа "эффективное количество" фармацевтической композиции, в соответствии с одним вариантом осуществления, является количеством, достаточным для оказания лечебных или требуемых результатов, в том числе без ограничений клинических результатов, таких как снижение интенсивности симптомов, возникших в результате заболевания, ослабление симптома инфекции (например, вирусной нагрузки, жара, боли, сепсиса и т. д.) или симптома злокачественной опухоли (например, пролиферации клеток злокачественной опухоли, наличия опухоли, метастаз опухоли и т. д.), таким образом повышая качество жизни у страдающих заболеванием, снижая дозу других лекарственных препаратов, необходимых для лечения такого заболевания, усиливая влияние другого лекарственного препарата, например, путем целенаправленного действия и/или интернализации, замедления прогрессирования заболевания, и/или увеличивая срок жизни у индивидуумов.

Эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений. В контексте настоящего изобретения эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции является количеством, достаточным либо для прямого, либо для опосредованного уменьшения пролиферации (или влияния) в результате вирусного наличия или для уменьшения и/или замедления развития вирусного заболевания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может быть или не быть достигнуто в сочетании с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, "эффективное количество" можно рассматривать в контексте введения одного или нескольких химиотерапевтических средств, а отдельное средство можно считать вводимым в эффективном количестве, если в сочетании с одним или несколькими другими средствами может быть достигнут или достигается требуемый результат. Несмотря на варьирование потребностей у каждого индивидуума, специалист в настоящей области сможет произвести определение оптимальных диапазонов эффективных количеств каждого компонента. Типичные дозировки введения антитела включают одну или несколько однократных доз в диапазоне от 0,1 до 100 мг/кг массы тела.

Количество биспецифичных диател PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению, которое будет эффективным при лечении, предупреждении или облегчении одного или нескольких ассоциированных с заболеванием симптомов, можно определить с помощью стандартных клинических методик. Точная доза, которую необходимо использовать в составе, также будет зависеть от пути введения и серьезности состояния, и ее необходимо назначать в соответствии с решением лечащего врача и обстоятельствами для каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать, исходя из кривых зависимости "доза/эффект", полученных от тест-систем *in vitro* или животных моделей. Для биспецифичных диател PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению вводимая пациенту дозировка, как правило, составляет по меньшей мере приблизительно 0,01 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,05 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,1 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,2 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,5 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 1 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 2 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 5 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 10 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 20 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 50 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,1 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 1 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 5 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 10 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 30 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 50 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 75 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 100 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 125 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 150 мг/кг или более массы тела субъекта.

В соответствии с другим вариантом осуществления пациенту назначают схему лечения, включающую одну или несколько доз такого профилактически или терапевтически эффективного количества биспецифичных диател PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению, причем схему лечения назначают на период 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней. В соответствии с определенными вариантами осуществления схема лечения предусматривает периодическое введение доз профилактически или терапевтически эффективного количества биспецифичных диател PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению (например, введение дозы в 1-й день, 2-й день, 3-й день и 4-й день указанной недели и отсутствие введения доз профилактически или терапевтически эффективного количества биспецифичных диател PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению в 5-й день, 6-й день и 7-й день той же недели). Как правило, проводят 1, 2, 3, 4, 5 или более курсов лечения. Каждый курс может иметь такую же схему или другую схему.

В соответствии с другим вариантом осуществления вводимую дозу увеличивают на протяжении первой четверти, первой половины или первых двух третьих или трех четвертей схемы(схем) (например, в ходе первой, второй или третьей схем 4-курсного лечения) до достижения ежедневного профилактически или терапевтически эффективного количества биспецифичных диател PD-1 × LAG-3, охватываемых настоящим изобретением.

В соответствии с одним вариантом осуществления дозировку биспецифичных диател PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению, вводимых пациенту, можно рассчитать для применения в качестве монотерапии. В соответствии с другим вариантом осуществления биспецифичные диател PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению применяют в сочетании с другими терапевтическими композициями, а дозировки, вводимые пациенту, - ниже, чем при применении таких диател в качестве монотерапии.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления может быть желательным введение фармацевтических композиций по настоящему изобретению местно в зону, которая нуждается в лечении; это можно осуществить путем, например, и без ограничения местной инфузии, инъекции или посредством имплантата, причем указанный имплантат выполнен из пористого, непористого или гелеобразного материала, включая мембраны, такие как мембраны Sialastic, или волокна. Предпочтительно при введении молекулы по настоящему изобретению необходимо соблюдать осторожность при применении материалов, в которые такая молекула не абсорбируется.

В соответствии с другим вариантом осуществления композиции можно доставлять в везикуле, в частности в липосоме (см. Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery," Science 249:1527-1533); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 3 17-327; в целом см. там же).

В соответствии с другим вариантом осуществления композиции можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением или с замедленным высвобождением. Любую методику, известную специалисту в настоящей области, можно применять для получения составов с замедленным высвобождением, содержащим одну или несколько молекул по настоящему изобретению. См., например, патент США № 4526938; PCT публикацию WO 91/05548; PCT публикацию WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; и Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, каждый из которых включен в настоящий документ с помощью ссылки в полном его объеме. В соответствии с одним вариантом осуществления в системе с контролируемым высвобождением может быть использована помпа (см. Langer, ранее; Sefton, (1987) "Implantable Pumps," CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald et al. (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis," Surgery 88:507-516; и Saudek et al. (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery," N. Engl. J. Med. 321:574-579). В соответствии с другим вариантом осуществления для осуществления контролируемого высвобождения антител можно применять полимерные материалы (см., например, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate," Science 228:190-192; During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization," Ann. Neurol.25:351-356; Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits," J. Neurosurg. 7(1): 105-112); патент США № 5679377, патент США № 5916597, патент США № 5912015, патент США № 5989463, патент США № 5128326, PCT публикация № WO 99/15154 и PCT публикация № WO 99/20253). Примеры полимеров, применяемых в составах с замедленным высвобождением, включают без ограничения поли(2-гидроксиэтилметакрилат), поли(метилметакрилат), поли(акриловую кислоту), сополимер этилена и винилацетата, поли(метакриловую кислоту), полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли(N-винилпирролидон), по-

ли(виниловый спирт), полиакриламид, поли(этиленгликоль), полилактиды (PLA), сополимеры лактида и гликолида (PLGA) и сложные полиортоэферы. В соответствии с еще одним вариантом осуществления системы с контролируемым высвобождением можно разместить вблизи мишени для терапевтического воздействия (например, легких), поэтому будет необходима лишь часть системной дозы (см., например, Goodson, in *MEDICAL Applications of Controlled Release*, ранее, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). В соответствии с другим вариантом осуществления полимерные композиции, пригодные в качестве имплантатов с контролируемым высвобождением, применяют согласно Dunn et al. (см. патент США № 5945155). В основе этого конкретного способа лежит терапевтический эффект *in situ* контролируемого высвобождения биоактивного материала из полимерной системы. Имплантацию обычно производят где-нибудь в организме пациента, где необходимо терапевтическое лечение. В соответствии с другим вариантом осуществления применяют неполимерные системы с замедленным высвобождением, причем в качестве системы доставки лекарственного средства применяют неполимерный имплантат в организме субъекта. При имплантации в организм органический растворитель имплантата будет распределяться, диспергироваться или вымываться из композиции в жидкость окружающей ткани, а неполимерный материал будет постепенно коагулировать или осаждаться с образованием твердой микропористой матрицы (см. патент США № 5888533).

Системы с контролируемым высвобождением рассмотрены в обзоре Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery, " *Science* 249:1527-1533). Любую методику, известную специалисту в настоящей области, можно применять для получения составов с замедленным высвобождением, содержащих одно или несколько терапевтических средств по настоящему изобретению. См., например, патент США № 4526938, международные публикации № WO 91/05548 и № WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; и Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, каждый из которых включен в настоящий документ с помощью ссылки в полном его объеме.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления, если композиция по настоящему изобретению является нуклеиновой кислотой, кодирующей одну или несколько полипептидных цепей биспецифичного диатела PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению, то нуклеиновую кислоту можно вводить *in vivo* для облегчения экспрессии кодируемого ею диатела путем создания ее как части соответствующего вектора экспрессии нуклеиновой кислоты и введения его так, чтобы он стал внутриклеточным, например, с помощью ретровирусного вектора (см. патент США № 4980286), или путем прямой инъекции, или с помощью бомбардировки микрочастицами (например, генной пушкой; Biolistic, Dupont), или путем покрытия липидами или рецепторами клеточной поверхности или облегчающими трансформацию средствами, или путем введение ее с привязкой к гомеобокс-подобному пептиду, который, как известно, встраивается в ядро (см., например, Joliot et al. (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:1864-1868) и т. д. В качестве альтернативы, нуклеиновую кислоту можно ввести внутриклеточно и встроить в ДНК клетки-хозяина для экспрессии с помощью гомологичной рекомбинации.

Лечение субъекта терапевтически или профилактически эффективным количеством биспецифичных диател PD-1 × LAG-3 по настоящему изобретению может предусматривать однократное лечение или, предпочтительно, может предусматривать серию лечений. В соответствии с предпочтительным примером субъекта лечат молекулами по настоящему изобретению один раз в неделю в течение приблизительно 1-10 недель, предпочтительно 2-8 недель, более предпочтительно приблизительно 3-7 недель и еще более предпочтительно в течение приблизительно 4, 5 или 6 недель. В соответствии с другими вариантами осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению вводят один раз в день, два раза в день или три раза в день. В соответствии с другими вариантами осуществления фармацевтические композиции вводят один раз в неделю, два раза в неделю, раз в две недели, раз в месяц, раз в шесть недель, раз в два месяца, два раза в год или раз в год. Также будет понятно, что эффективная дозировка применяемых для лечения молекул может возрастать или уменьшаться на протяжении курса конкретного лечения.

Выше было приведено общее описание настоящего изобретения, которое теперь можно будет проще понять в контексте приведенных далее примеров. Такие примеры представлены для иллюстрации и не предназначены для ограничения настоящего изобретения, если не указано иное.

Пример 1. Получение и свойства биспецифичных диател к PD-1 × LAG-3.

В контексте анализа алло-MLR (аллогенные реакции в смешанных культурах лимфоцитов), Т-клетки индуцировали к пролиферации в ответ на несовпадение по HLA (Latchman, Y.E. et al. (2004) "PD-L1-Deficient Mice Show That PD-L1 On T-Cells, Antigen-Presenting Cells, And Host Tissues Negatively Regulates T-Cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 101(29): 10691-10696; Wang, W. et al. (2008) "PD-L1/PD-1 Sig-



nal Deficiency Promotes Allogeneic Immune Responses And Accelerates Heart Allograft Rejection" *Transplantation* 86(6):836-44) или митогенную/фармакологическую стимуляцию. Известно, что антитела-агонисты, которые нацелены на костимулирующие молекулы, индуцируют пролиферативные ответы путем усиления Т-клеточной передачи сигнала и стабилизации транскрипционных факторов, которые активируют Т-клеточную эффекторную функцию или управляют ею (Melero, I. et al. (2013) "Agonist Antibodies to TNFR Molecules That Costimulate T and NK Cells," *Clin. Cancer Res.* 19(5): 1044-1053). Аналогично, антитела-антагонисты, которые нацелены на ключевые контрольные молекулы, оказывающие отрицательное воздействие при регуляции Т-клеточных ответов, могут индуцировать пролиферативные реакции, поддерживая Т-клеточную передачу сигнала и эффекторную функцию и, таким образом, повышая противоопухолевый иммунитет (Capece, D. et al. (2012) "Targeting Costimulatory Molecules to Improve Antitumor Immunity" *J. Biomed. Biotech.* 2012:926321). Влияние моноклональных антител к костимулирующим или контрольным целям на пролиферацию в ответ на аллоантиген можно легко измерить в краткосрочных реакциях смешанных культур лимфоцитов (алло-MLR) по включению <sup>3</sup>H-тимидина. Для рассмотрения способности антител к контрольным ингибиторам усиливать пролиферацию были созданы, очищены и экзогенно добавлены эталонные mAb к PD-1 или к LAG-3 в начале анализа алло-MLR в количестве 20, 10, 5, 2,5 и 1,25 мкг/мл (фиг. 5). В конце 5-6-го дня 96-луночный планшет обрабатывали <sup>3</sup>H-тимидином и культивировали в течение 18 часов для измерения пролиферации. Несколько эталонных антител к человеческим PD-1, LAG-3 и CTLA-4 оценивали в отношении их способности усиливать Т-клеточную пролиферацию в ответ на стимуляцию аллогенным антигеном. Как показано на фиг. 6, добавление PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558), PD-1 mAb 2 (МК-3475; Merck, ламбролизумаб) или PD-1 mAb 3 (EH12.2H7; DanaFarber) в начале анализа алло-MLR индуцировало сильную Т-клеточную пролиферацию в сравнении с контрольным антителом изотипа IgG1 или контрольными лунками, которые содержали иммунокомпетентные клетки и стимуляторы. В лунках, содержащих только обработанные стимулирующие клетки, пролиферацию не наблюдали. Несмотря на то, что наблюдали дозозависимый пролиферативный ответ, для PD-1 mAb 4 (CT-011; CureTech, BAT-1) наблюдали минимальную пролиферацию в сравнении с PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558), PD-1 mAb 2 (МК-3475; Merck, ламбролизумаб) или PD-1 mAb 3 (EH12.2H7; Dana Farber). Также наблюдали незначительный дозозависимый пролиферативный ответ с LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS), который был сравним с ипилимумабом Yervoy®, mAb к CTLA-4 (Bristol Myers-Squibb).

Значительная эффективность PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558) при параллельном применении с LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS) при индукции сильного противоопухолевого иммунитета у животных моделей, в сравнении с каждым отдельно применяемым антителом (Woo, S.R. et al. (2012) "Immune Inhibitory Molecules LAG-3 And PD-1 Synergistically Regulate T-Cell Function To Promote Tumoral Immune Escape, " *Cancer Res.* 72(4):917-927), позволяла сделать вывод, что контрольные mAb, применяемые в сочетании, могут потенцировать индуцированную аллогеном Т-клеточную пролиферацию сильнее, чем каждое антитело в отдельности. Как показано на фиг. 7, mAb к LAG-3 (25F7) оценивали в отношении его пролиферативного потенциала либо отдельно, либо в сочетании с mAb к PD-1 (PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558) или PD-1 mAb 2 (МК-3475; Merck, ламбролизумаб)). Как наблюдали и ранее, оба mAb к PD-1 индуцировали сильную пролиферацию дозозависимым образом. В отличие от этого, введение mAb к LAG-3 с любым mAb к PD-1 не индуцировало усиленную пролиферацию, которая превышала бы наблюдаемую с отдельными mAb к PD-1. Отдельно mAb к LAG-3 вызывало лишь незначительную Т-клеточную пролиферацию в сравнении с контрольными лунками с изотипом IgG1 или с контрольными лунками, содержащими иммунокомпетентные клетки плюс стимулятор.

Неспособность mAb к LAG-3 отдельно или в сочетании индуцировать пролиферацию, превышающую пролиферацию, наблюдаемую с mAb к PD-1, свидетельствовала, что какая-либо экспрессия LAG-3 отсутствовала на Т-клетках в ходе анализа алло-MLR или что mAb к LAG-3 не связывалось с LAG-3 для блокировки отрицательного сигнального каскада. Для анализа потенциала индуцировать передачу LAG-3 сигнала вносили белок LAG-3 человека ("shLAG-3") в среду для алло-MLR и сравнивали относительно mAb к LAG-3 и/или mAb к PD-1. Как показано на фиг. 8, растворимый LAG-3 человека, который связывается с молекулами HLA II класса человека, экспрессируемыми как на APC, так и на CD4 Т-клетках, индуцировал сильный пролиферативный ответ по сравнению с контрольными лунками с изотипом IgG или с иммунокомпетентными клетками плюс стимулятор. Добавление LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS), судя по всему, не блокировало пролиферативный эффект растворимого белка LAG-3 человека и могло слегка повышать Т-клеточную пролиферацию, поскольку наблюдали незначительный дозозависимый пролиферативный ответ. В соответствии с предыдущими наблюдениями mAb к PD-1 индуцировало сильную Т-клеточную пролиферацию, которая дополнительно усиливалась при добавлении как растворимого белка LAG-3 человека, так и/или LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS). Добавление контрольного IgG1 изотипа к антителам к PD-1 не усиливало Т-клеточную пролиферацию выше наблюдаемой только с PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558). Способность растворимого LAG-3 индуцировать сильную Т-клеточную пролиферацию даже при наличии mAb к LAG-3 остается невыясненной. Одна возможность заключается в том, что mAb к LAG-3 просто не может блокировать сильный пролиферативный сигнал, индуцируемый mAb к растворимому LAG-3. Альтернативная, но не обязательно

взаимоисключающая возможность заключается в том, что растворимый белок LAG-3 человека вместе с антителом к LAG-3 формирует иммунные сшивающие комплексы, которые могут дополнительно потенцировать пролиферативные ответы.

Способность растворимого LAG-3 потенцировать Т-клеточную пролиферацию свидетельствовала о том, что практически одновременное внесение как mAb к PD-1, так и mAb к LAG-3 могло усиливать Т-клеточные пролиферативные ответы в анализе алло-MLR. Для рассмотрения такой возможности были созданы контрольные mAb к PD-1 и mAb к LAG-3 в биспецифичном формате переориентирующегося антитела с двойной аффинностью (DART®) в двух ориентациях: биспецифичное тетравалентное диатело Fc-DART® LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS) - PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558) (PD-1 × LAG-3 Fc-DART®-1) и биспецифичное тетравалентное диатело Fc-DART® PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558) - LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS) (PD-1 × LAG-3 Fc-DART®-1). Оба формата Fc-DART® экзогенно добавляли (описанным выше дозозависимым образом) в начале алло-MLR и оценивали в отношении их пролиферативного потенциала на Т-клетках.

Как показано на фиг. 9А-9В, оба диатела DART® неожиданно индуцировали более сильные Т-клеточные пролиферативные ответы, чем получаемые с PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558) и/или LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS). Для растворимого LAG-3 человека ("shLAG-3") и в этот раз наблюдали сильную Т-клеточную пролиферацию в анализе алло-MLR. Сильный пролиферативный сигнал, индуцируемый как форматами DART®, так и растворимым белком LAG-3 человека, минимизировал вклад отдельно mAb к PD-1 или отдельно mAb к LAG-3. Несмотря на то, что как mAb к PD-1, так и mAb к LAG-3 индуцировали Т-клеточную пролиферацию дозозависимым образом свыше наблюдаемой в контрольных лунках с IgG1 изотипом или иммунокомпетентными клетками плюс стимулятор, в которых антитела были добавлены по-отдельности, для сочетания антитела к PD-1 с антителом к LAG-3 наблюдали усиленную пролиферацию по сравнению с антителом в отдельности, что свидетельствовало о функциональной синергии, как уже было продемонстрировано в более ранних сообщениях в литературе (Wang, W. et al. (2008) "PD-L1/PD-1 Signal Deficiency Promotes Allogeneic Immune Responses And Accelerates Heart Allograft Rejection," *Transplantation* 86(6):836-44; Melero, I. et al. (2013) "Agonist Antibodies to TNFR Molecules That Costimulate T and NK Cells," *Clin. Cancer Res.* 19(5): 1044-1053; Capece, D. et al. (2012) "Targeting Costimulatory Molecules to Improve Antitumor Immunity," *J. Biomed. Biotech.* 2012:926321).

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ с помощью ссылки в таком же объеме, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была специально и отдельно указана как включенная по ссылке в полном ее объеме. Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано с использованием конкретных вариантов его осуществления, будет понятно, что возможны дополнительные модификации, а настоящая заявка подразумевается как охватывающая любые варианты, применения или адаптации настоящего изобретения, в целом согласующиеся с идеями настоящего изобретения и включающие такие отступления от настоящего раскрытия, которые очевидны в свете известной или общепринятой практики в настоящей области, к которой относится настоящее изобретение, и которые могут быть применимы в отношении изложенных в настоящем документе основных признаков.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифичное Fc-диатело, способное иммуноспецифично связываться с эпитопом PD-1 и с эпитопом LAG-3, причем указанное диатело содержит четыре полипептидные цепи, каждая из которых имеет N-конец и C-конец, и в котором:

(А) указанные первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, указанная первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом и указанные третья и четвертая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом;

(В) каждая из указанных первой и третьей полипептидных цепей указанного диатела содержит в направлении от N-конца к C-концу переменный домен легкой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к PD-1 или LAG-3, переменный домен тяжелой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к LAG-3 или PD-1 и домен CH2-CH3, причем указанные переменные домены легкой цепи и указанные переменные домены тяжелой цепи не способны ассоциироваться с формированием эпитоп-связывающего сайта, способного связывать эпитоп PD-1 или эпитоп LAG-3; и

(С) каждая из указанных второй и четвертой полипептидных цепей указанного диатела содержит в направлении от N-конца к C-концу переменный домен легкой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к PD-1 или LAG-3, переменный домен тяжелой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к LAG-3 или PD-1, причем указанные переменные домены легкой цепи и указанные переменные домены тяжелой цепи не способны ассоциироваться с формированием эпитоп-связывающего сайта, способного связывать эпитоп PD-1 или эпитоп LAG-3; и в котором:

(I) (1) указанный переменный домен легкой цепи указанной первой полипептидной цепи и указанный переменный домен тяжелой цепи указанной второй полипептидной цепи ассоциируются с

формированием первого эпитоп-связывающего сайта, а указанный переменный домен тяжелой цепи указанной первой полипептидной цепи и указанный переменный домен легкой цепи указанной второй полипептидной цепи ассоциированы с формированием второго эпитоп-связывающего сайта; и

(2) указанный переменный домен легкой цепи указанной третьей полипептидной цепи и указанный переменный домен тяжелой цепи указанной четвертой полипептидной цепи ассоциированы с формированием третьего эпитоп-связывающего сайта, а указанный переменный домен тяжелой цепи указанной третьей полипептидной цепи и указанный переменный домен легкой цепи указанной четвертой полипептидной цепи ассоциированы с формированием четвертого эпитоп-связывающего сайта;

причем два указанных сформированных эпитоп-связывающих сайта способны иммуноспецифично связываться с эпитопом PD-1, а два указанных сформированных эпитоп-связывающих сайта способны иммуноспецифично связываться с эпитопом LAG-3; и

II. указанные домены CH2-CH3 указанных первой и третьей полипептидных цепей ассоциированы с формированием Fc-домена.

2. Биспецифичное Fc-диатело по п.1, в котором:

(A) каждая из указанных первой и третьей полипептидных цепей указанного диатела содержит в направлении от N-конца к C-концу переменный домен легкой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к PD-1 или LAG-3, переменный домен тяжелой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к LAG-3 или PD-1, облегчающий образование гетеродимера домен и домен CH2-CH3, причем указанные переменные домены легкой цепи и указанные переменные домены тяжелой цепи не способны ассоциироваться с формированием эпитоп-связывающего сайта, способного связывать эпитоп PD-1 или эпитоп LAG-3; и

(B) каждая из указанных второй и четвертой полипептидных цепей указанного диатела содержит в направлении от N-конца к C-концу переменный домен легкой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к PD-1 или LAG-3, переменный домен тяжелой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к LAG-3 или PD-1 и облегчающий образование гетеродимера домен, причем указанные переменные домены легкой цепи и указанные переменные домены тяжелой цепи не способны ассоциироваться с формированием эпитоп-связывающего сайта, способного связывать эпитоп PD-1 или эпитоп LAG-3;

причем указанный облегчающий образование гетеродимера домен указанных первой и третьей полипептидных цепей отличается от указанного облегчающего образование гетеродимера домена указанных второй и четвертой полипептидных цепей.

3. Биспецифичное Fc-диатело по п.2, в котором:

(1) указанный облегчающий образование гетеродимера домен указанных первой и третьей полипептидных цепей содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14 и указанный облегчающий образование гетеродимера домен указанных второй и четвертой полипептидных цепей содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, или

(2) указанный облегчающий образование гетеродимера домен указанных первой и третьей полипептидных цепей содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15 и указанный облегчающий образование гетеродимера домен указанных второй и четвертой полипептидных цепей содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14, или

(3) указанный облегчающий образование гетеродимера домен указанных первой и третьей полипептидных цепей содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16 и указанный облегчающий образование гетеродимера домен указанных второй и четвертой полипептидных цепей содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17, или

(4) указанный облегчающий образование гетеродимера домен указанных первой и третьей полипептидных цепей содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17 и указанный облегчающий образование гетеродимера домен указанных второй и четвертой полипептидных цепей содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16.

4. Биспецифичное Fc-диатело по любому из пп.2, 3, в котором указанный облегчающий образование гетеродимера домен указанной первой полипептидной цепи содержит SEQ ID NO: 14 и указанный облегчающий образование гетеродимера домен указанной второй полипептидной цепи содержит SEQ ID NO:15.

5. Биспецифичное Fc-диатело по любому из пп.2, 3, в котором указанный облегчающий образование гетеродимера домен указанной первой полипептидной цепи содержит SEQ ID NO:16 и указанный облегчающий образование гетеродимера домен указанной второй полипептидной цепи содержит SEQ ID NO:17.

6. Биспецифичное Fc-диатело по любому из пп.2-5, в котором указанный переменный домен тяжелой цепи разделен от указанного облегчающего образование гетеродимера домена в каждой из указанных первой, второй, третьей и четвертой полипептидных цепях линкером, содержащим SEQ ID NO:18.

7. Биспецифичное Fc-диатело по любому из пп.1-6, в котором каждый из указанных доменов CH2-CH3 указанных первой и третьей полипептидных цепей содержит аминокислотную последовательность

SEQ ID NO:24.

8. Биспецифичное Fc-диатело по любому из пп.1-7, в котором указанный вариабельный домен тяжелой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к LAG-3, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11, а указанный вариабельный домен легкой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к LAG-3, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12.

9. Биспецифичное Fc-диатело по любому из пп.1-8, в котором указанный вариабельный домен тяжелой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к PD-1, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, а указанный вариабельный домен легкой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к PD-1, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3.

10. Биспецифичное Fc-диатело по любому из пп. 1-9, в котором

(А) каждая из указанных первой и третьей полипептидных цепей содержит вариабельный домен легкой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к PD-1, и вариабельный домен тяжелой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к LAG-3 и

(В) каждая из указанных второй и четвертой полипептидных цепей содержит вариабельный домен легкой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к LAG-3, и вариабельный домен тяжелой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к PD-1.

11. Биспецифичное Fc-диатело по любому из пп.1-9, в котором

(А) каждая из указанных первой и третьей полипептидных цепей содержит вариабельный домен легкой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к LAG-3, и вариабельный домен тяжелой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к PD-1, и

(В) каждая из указанных второй и четвертой полипептидных цепей содержит вариабельный домен легкой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к PD-1, и вариабельный домен тяжелой цепи антитела, которое является иммуноспецифичным к LAG-3.

12. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественной опухоли, содержащая эффективное количество биспецифичного Fc-диатела по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый носитель.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, где указанная злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль надпочечника, ассоциированную со СПИДом злокачественную опухоль, альвеолярную саркому мягких тканей, астроцитарную опухоль, злокачественную опухоль мочевого пузыря, злокачественную опухоль костей, злокачественную опухоль головного и спинного мозга, метастатическую опухоль головного мозга, злокачественную опухоль молочной железы, опухоль каротидного тельца, злокачественную опухоль шейки матки, хондросаркому, хордому, хромофобную почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному, злокачественную опухоль толстой кишки, колоректальную злокачественную опухоль, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпендимому, опухоль Юинга, внескелетную слизеподобную хондросаркому, злокачественную опухоль желчного пузыря или желчного протока, гастральную злокачественную опухоль, гестационную трофобластическую болезнь, эмбрионально-клеточную опухоль, злокачественную опухоль головы и шеи, гепатоклеточную карциному, опухоль островков поджелудочной железы, саркому Капоши, злокачественную опухоль почки, лейкоз, липосаркому/злокачественную липоматозную опухоль, злокачественную опухоль печени, лимфому, злокачественную опухоль легкого, гранулобластому, меланому, менингиому, множественные эндокринные неоплазии, множественную миелому, миелодиспластический синдром, нейробластому, нейроэндокринные опухоли, злокачественную опухоль яичника, злокачественную опухоль поджелудочной железы, сосковидную карциному щитовидной железы, опухоль парашитовидных желез, злокачественную опухоль у детей, опухоль влагалища периферического нерва, феохромоцитому, опухоль гипофиза, злокачественную опухоль простаты, позднюю увеальную меланому, почечную метастатическую злокачественную опухоль, палочковидную опухоль, рабдомиосаркому, саркому, злокачественную опухоль кожи, саркому мягкой ткани, плоскоклеточную злокачественную опухоль, злокачественную опухоль желудка, синовиальную саркому, злокачественную опухоль яичка, тимусную карциному, тимому, метастатическую злокачественную опухоль щитовидной железы или злокачественную опухоль матки.

14. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания, вызванного патогенным организмом, причем указанная фармацевтическая композиция содержит эффективное количество биспецифичного Fc-диатела по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый носитель, где указанным патогенным организмом является бактерия, грибок, простейшее или вирус.

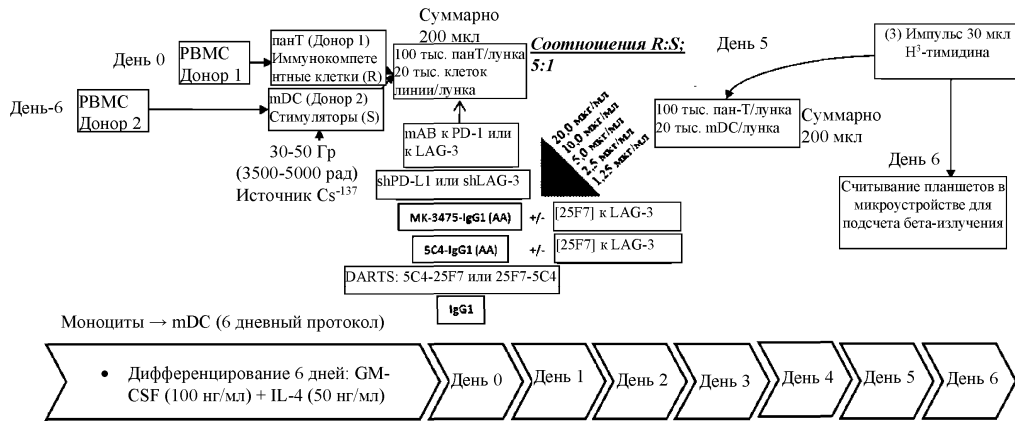
15. Применение биспецифичного Fc-диатела по любому из пп.1-11 в производстве лекарственного средства для лечения злокачественной опухоли.

16. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.12, 13 в производстве лекарственного средства для лечения злокачественной опухоли.

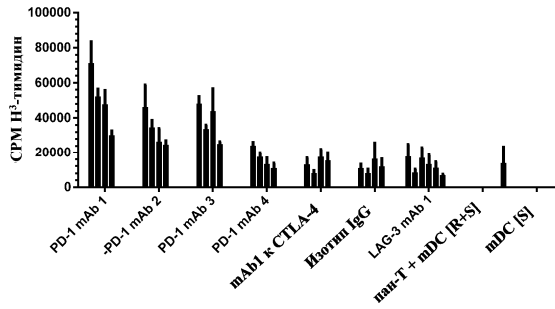
17. Применение биспецифичного Fc-диатела по любому из пп.1-11 в производстве лекарственного средства для лечения заболевания, вызванного патогенным организмом.

18. Применение фармацевтической композиции по п.14 в производстве лекарственного средства для лечения заболевания, вызванного патогенным организмом.

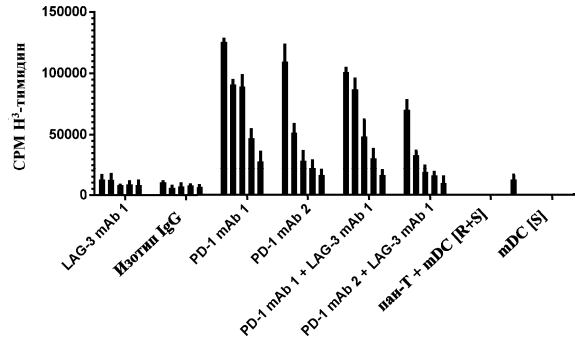




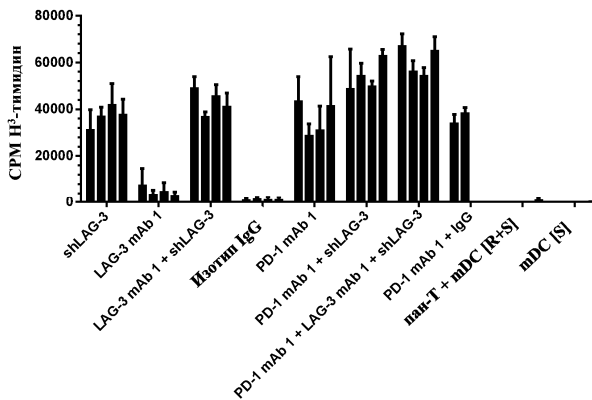
Фиг. 5



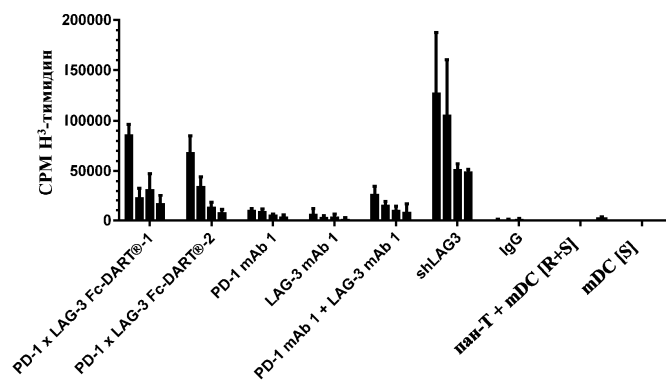
Фиг. 6



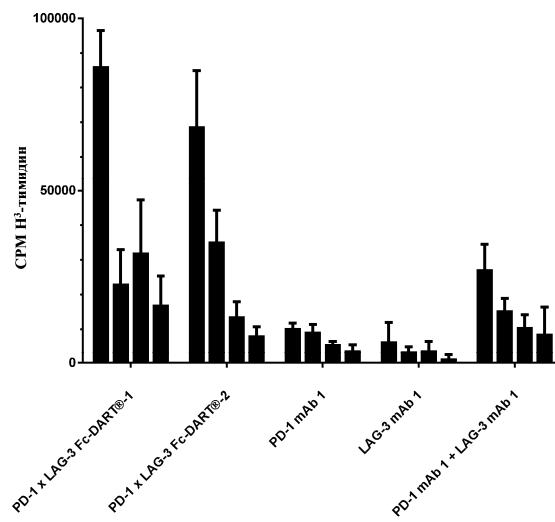
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9А



Фиг. 9В

