

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992779 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.14

(22) Дата подачи заявки
2018.05.24

(51) Int. Cl. A61K 38/20 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)

(54) НАЦЕЛЕННАЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ

(31) 62/510,586; 62/510,816; 62/558,175;
62/595,352

(32) 2017.05.24; 2017.05.25; 2017.09.13;
2017.12.06

(33) US

(86) PCT/US2018/034334

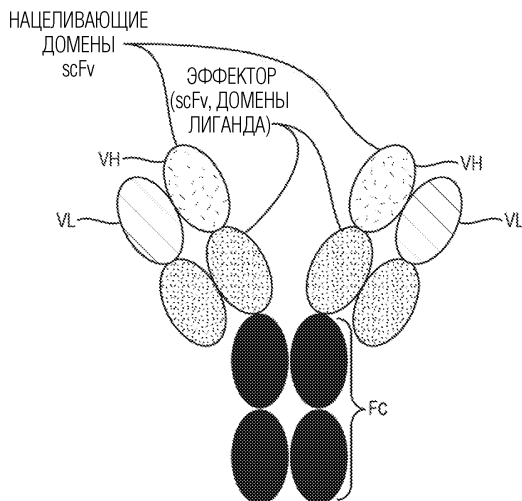
(87) WO 2018/217989 2018.11.29

(71) Заявитель:
ПАНДИОН ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Вайни Джоанн Л., Хиггинсон-Скотт
Нейтан (US)

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

(57) Способы и соединения для сообщения сайт-специфической или локальной иммунологической предпочтительности.



A1

201992779

201992779

A1

НАЦЕЛЕННАЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В настоящей заявке испрашивается приоритет Предварительной заявки на патент США No. 62/510586, поданной 24 мая, 2017, Предварительной заявки на патент США No. 62/510816, поданной 25 мая, 2017, Предварительной заявки на патент США No. 62/558175, поданной 13 сентября, 2017, и Предварительной заявки на патент США No. 62/595352, поданной 6 декабря, 2017, каждая из которых включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки.

Область изобретения

Варианты настоящего изобретения относятся, например, к способам и композициям для достижения локальной или нацеленной иммунологической предпочтительности.

Предпосылки создания изобретения

Случаи нежелательных иммунных ответов, например, при отторжении трансплантированной ткани или при аутоиммунных расстройствах, создают множество проблем со здоровьем у миллионов людей во всем мире. Отдаленные результаты трансплантации органов часто характеризуются хроническим отторжением и, в конечном счете, недостаточностью трансплантированного органа. Известно более двадцати аутоиммунных расстройств, которые, по существу, поражают каждый орган организма, и только в Северной Америке такие расстройства встречаются у более, чем пятидесяти миллионов человек. Иммуносупрессорные лекарственные средства с широким спектром действия, используемые для устранения патогенного иммунного ответа, в обоих случаях, дают серьезные побочные эффекты.

Сущность

В настоящем изобретении раскрываются способы и терапевтические соединения, которые обеспечивают сайт-специфическую иммунологическую предпочтительность. Раскрытые здесь варианты вводятся в этот раздел посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение включает сконструированное мультиспецифическое соединение, например, сконструированную биспецифическую молекулу, например, сконструированную биспецифическую молекулу антитела, включающую:

1) специфически нацеливающую молекулу, выбранную из:

а) донор-специфической нацеливающей молекулы, которая, например, преимущественно связывается с донорной мишенью (преимущественно, по сравнению со связыванием с антигеном реципиента) и является подходящей для обеспечения сайт-специфической иммунологической предпочтительности для трансплантируемой ткани, например, органа, взятого у донора; или

б) тканеспецифической нацеливающей молекулы, которая, например,

преимущественно связывается с тканью–мишенью индивидуума (преимущественно, по сравнению с тканью, которая не является мишенью у индивидуума) и является подходящей для обеспечения сайт–специфической иммунологической предпочтительности для ткани индивидуума, в которой наблюдается нежелательная иммунная атака, например, при аутоиммунном расстройстве; и

2) молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор и выбранную из:

(а) молекулы, связывающейся с молекулой, ингибирующей иммунную клетку/модулирующей указанную молекулу (далее называемой ICIM–связывающей/ICIM–модулирующей молекулой);

(b) иммуносупрессорной молекулы, связывающейся с иммунной клеткой/модулирующей иммунную клетку (далее называемой, IC–связывающей/IC–модулирующей молекулой);

(с) молекулы, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, которая, как часть терапевтического соединения, стимулирует иммуносупрессорное локальное микроокружение, например, благодаря присутствию поблизости от мишени, вещества, которое ингибирует или минимизирует атаку мишени иммунной системой (называемой здесь SM–связывающей/SM–модулирующей молекулой); или

(d) молекулы, связывающейся с молекулой, стимулирующей иммунную клетку/модулирующей такую молекулу (далее называемой ICSM–связывающей/ICSM–модулирующей молекулой), где ICSM ингибирует иммунную активацию, например, посредством блокирования взаимодействия между костимулирующей молекулой и ее противоструктурой.

Молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, может принадлежать более, чем к одному из классов а, b и с. Так, например, как описано ниже, CTLA–4–связывающая молекула входит в обе категории а и b.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение включает ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICIM–связывающая/ICIM–модулирующая молекула связывается с ингибирующей молекулой и является агонистом ингибирующей молекулы, например, ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки, или каким–либо другим образом ингибирует или снижает активность иммунной клетки, например, цитотоксической Т–клетки, В–клетки, NK–клетки или миелоидной клетки, например, нейтрофила или макрофага.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение включает сконструированное мультиспецифическое соединение, например, сконструированную биспецифическую молекулу, например, сконструированную биспецифическую молекулу антитела, включающую:

1) специфически нацеливающую молекулу, например, донор–специфическую нацеливающую молекулу (которая связывается с донорной мишенью и является

подходящей для обеспечения сайт-специфической иммунологической предпочтительности для трансплантируемой ткани, например, органа, взятого у донора); или тканеспецифическую нацеливающую молекулу (которая связывается с тканью-мишенью индивидуума и является подходящей для обеспечения сайт-специфической иммунологической предпочтительности для ткани индивидуума, в которой наблюдается нежелательная иммунная атака, например, при аутоиммунном расстройстве); и

2) молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, и содержащую ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, которая связывается с эффекторной молекулой на иммунной клетке, например, с ингибирующим рецептором, например, PD-1, где, после связывания специфически нацеливающей молекулы с мишенью и связывания ICIM-связывающей/ICIM-модулирующей молекулы с эффекторной молекулой на иммунной клетке, активность иммунной клетки, например, способность иммунной клетки осуществлять иммунную атаку ингибируется, например, посредством ингибирующего сигнала в зависимости от кластеризации эффекторных молекул на иммунной клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сконструированное мультиспецифическое соединение содержит дополнительные связывающие молекулы, которые связываются более, чем с двумя специфическими молекулами, такими как, но не ограничивающимися ими, 3 или 4 молекулы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу и обладает одним или обоими нижеследующими свойствами: (a) уровень ингибирования иммунной клетки повышается, если терапевтическое соединение связывается с мишенью, по сравнению с уровнем, когда терапевтическое соединение не связывается с мишенью; и (b) терапевтическое соединение, если оно связывается с ингибирующим рецептором клеточной поверхности, например, PD-1, на иммунной клетке, не ингибирует или, по существу, не ингибирует способность ингибирующего рецептора клеточной поверхности связываться с эндогенным лигандом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, если терапевтическое соединение связывается с мишенью, то уровень ингибирования иммунной клетки является выше, чем уровень ингибирования иммунной клетки, если терапевтическое соединение не связывается с мишенью. В некоторых вариантах осуществления изобретения, уровень ингибирования терапевтическим соединением, связанным с мишенью, равен уровню или более, чем в 1,5 раз, 2 раза, 4 раза, 8 раз или 10 раз превышает уровень ингибирования, наблюдаемый в случае отсутствия связывания с мишенью. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение не ингибирует или по существу, не ингибирует иммунные клетки, если оно не связывается с мишенью. Таким образом, ненужное или нежелательное агонистическое действие ингибирующего рецептора, например, PD-1, минимизируется или элиминируется. Так, например, если терапевтическое соединение связывается с иммунной клеткой, но не связывается с молекулой-мишенью, то связывание ингибирующей молекулы иммунной контрольной

точки с терапевтическим соединением не приводит к ингибированию или, по существу, не приводит к ингибированию, например, ингибирующего рецептора на иммунной клетке, с которой связывается терапевтическое соединение, то есть, не приводит к кластеризации или не приводит к кластеризации в степени, достаточной для выработки ингибирующего сигнала, достаточного для ингибирования или значительного ингибирования иммунной клетки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение, если оно связывается с ингибирующим рецептором клеточной поверхности, например, PD-1 на иммунной клетке, не ингибирует или, по существу, не ингибирует способность ингибирующего рецептора клеточной поверхности связываться с эндогенным лигандом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение может связываться с PD-L1/2-связывающим сайтом на PD-1. Таким образом, ненужное или нежелательное антагонистическое действие ингибирующего рецептора, например, PD-1, минимизируется или элиминируется. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывание терапевтического соединения с ингибирующим рецептором, например, PD-1, на иммунной клетке, не влияет или, по существу, не влияет на способность ингибирующего рецептора связываться с природным лигандом, например, PD-L1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, связывание терапевтического соединения с ингибирующим рецептором, например, PD-1, на иммунной клетке снижает уровень связывания с природным лигандом, например, PD-L1, например, менее, чем на 50, 40, 30, 20, 10 или 5% по сравнению с уровнем, наблюдаемым в отсутствие терапевтического соединения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, и при введении индивидууму в терапевтически эффективной дозе, не приводит к неприемлемым уровням подавления системного иммунного ответа, как это было бы возможно в случае нежелательного агонистического действия ингибирующего рецептора во всех иммунных клетках определенного типа, например, во всех присутствующих Т-клетках, или не приводит к неприемлемым уровням системной иммунной активации, как это было бы возможно в случае, когда терапевтическое соединение блокирует взаимодействие ингибирующего рецептора с природным лигандом.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь предполагают, что после введения индивидууму, терапевтическое соединение, содержащее ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, может существовать в любой одной из четырех форм: i) в несвязанной форме и в свободной форме в растворе; ii) в форме, связанной только с ингибирующим рецептором, экспрессирующимся на поверхности иммунной клетки, например, Т-клетки, посредством ICIM-связывающей/ICIM-модулирующей молекулы; iii) в форме, связанной только с поверхностью трансплантата-мишени или ткани индивидуума посредством нацеливающей молекулы; и iv) в форме, связанной с поверхностью трансплантата-мишени или ткани индивидуума посредством

нацеливающей молекулы, и связанной с ингибирующим рецептором, экспрессирующимся на поверхности иммунной клетки, например, Т-клетки, посредством ICIM-связывающей/ICIM-модулирующей молекулы. Если терапевтическое соединение связывается только с трансплантатом-мишенью или тканью индивидуума (iii) посредством нацеливающей молекулы, то это соединение не влияет или, по существу, не влияет на трансплантат или ткань мишени. Если терапевтическое соединение связывается только с трансплантатом-мишенью или тканью-мишенью посредством нацеливающей молекулы и связывается с ингибирующим рецептором, экспрессируемым иммунной клеткой, например, Т-клеткой, посредством ICIM-связывающей/ICIM-модулирующей молекулы (iv), то это создает иммунологическую предпочтительность в органе- или ткани-мишени. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь предполагают, что это может быть достигнуто посредством трансплантата-мишени или ткани донора, мультимеризующих молекулы терапевтического соединения на своей поверхности, например, посредством иммобилизации множества молекул терапевтического соединения с высокой плотностью и с высокой валентностью. Мультимеризация молекул терапевтического соединения позволяет ICIM-связывающим/ICIM-модулирующим молекулам терапевтических соединений стимулировать кластеризацию ингибирующих рецепторов, экспрессируемых на поверхности иммунной клетки, например, патогенной Т-клетки, и передавать ингибирующий сигнал, функция которого заключается в сайленсинге или ингибировании иммунной клетки. Например, в случае Т-клеток, может быть использовано терапевтическое соединение, содержащее ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, включающую молекулу PD-L1, или анти-PD-1 Ab. Связывание множества молекул терапевтического соединения с мишенью приводит к мультимеризации молекул терапевтического соединения, что, в свою очередь, благодаря молекуле PD-L1 или функциональной молекуле анти-PD-1 антитела, приводит к кластеризации PD-1 на Т-клетке. Если такая кластеризация будет наблюдаться для Т-клеточного рецептора на Т-клетке благодаря презентации антигена МНС мишени, то будет вырабатываться негативный сигнал, и Т-клетка будет инактивироваться. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICIM-связывающая/ICIM-модулирующая молекула, например, функциональная молекула антитела связывается с эффекторной молекулой, но не ингибирует или, по существу, не ингибирует взаимодействие эффекторной молекулы с нативным(и) лигандом(ами).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит IC-связывающую/IC-модулирующую молекулу, которая связывается, например, с Treg, например, с Foxp3⁺-CD25⁺-Treg, и осуществляет рекрутинг иммуносупрессорной иммунной клетки в ближайшее окружение ткани-мишени.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит SM-связывающую/SM-модулирующую молекулу, которая модулирует, например, связывает и ингибирует, секвестрирует, разлагает или как-либо иначе

нейтрализует вещество, например, растворимую молекулу, которая модулирует иммунный ответ, например, АТР или АМР.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит нацеливающую молекулу, которая является специфичной для мишени на иммунной клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мишенью является мишень, описанная в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мишенью является MAdCAM. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающей молекулой является антитело, которое связывается с MAdCAM.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит ICSM–связывающую/ICSM–модулирующую молекулу, которая связывается со стимулирующей молекулой, например, с костимулирующей молекулой. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICSM ингибирует костимулирующую молекулу посредством противоструктуры. Связывание/модуляция костимулирующей молекулы или противоструктуры костимулирующей молекулы может ингибировать способность иммунной клетки вырабатывать иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICSM–связывающая/ICSM–модулирующая молекула может связываться со стимулирующей, например, костимулирующей молекулой на иммунной клетке, например, с ОХ40 на Т–клетках, или с противочленом костимулирующей молекулы, например, с ОХ40L на другой клетке, такой как, но не ограничивающейся ими, иммунные клетки, такие как НК–клетки, тучные клетки, дендритные клетки или, например, неиммунные клетки, такие как эндотелиальные клетки или клетки гладких мышц.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит донор–специфическую нацеливающую молекулу и обеспечивает сайт–специфическую иммунологическую предпочтительность для донорской ткани трансплантата, имплантированного индивидууму. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит тканеспецифическую нацеливающую молекулу и обеспечивает сайт–специфическую иммунологическую предпочтительность для ткани индивидуума, например, ткани, в которой вырабатывается нежелательный иммунный ответ при аутоиммунном расстройстве.

Нацеливающая молекула является специфичной для трансплантируемой ткани донора или индивидуума, защищенной от иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула, связывающаяся с эффекторной молекулой, содержит полученный *de novo* связывающийся домен, например, функциональную молекулу антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит аминокислотную последовательность, происходящую от природного лиганда, который распознает ингибирующий рецептор, экспрессируемый на поверхности иммунной клетки, например, Т–клетки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение

обеспечивает сайленсинг иммунных клеток, например, Т-клеток, расположенных поблизости от защищаемой ткани трансплантата или донора, но не обеспечивает сайленсинг иммунных клеток, например, Т-клеток, которые не расположены поблизости от мишени, поскольку терапевтическое соединение требует присутствия ткани трансплантата–мишени или донорской ткани для ее функционирования. В противоположность этому, если терапевтическое соединение связывается только с ингибирующим рецептором, экспрессируемым иммунной клеткой, например, Т-клеткой, то в этом случае, никаких функциональных последствий не наблюдается.

Описанные здесь способы и терапевтические соединения основаны, по меньшей мере частично, на обеспечение сайт-специфической иммунологической предпочтительности. Терапевтические соединения и способ их применения, описанные в настоящей заявке, позволяют минимизировать, например, снижать или не осуществлять сайт-неспецифическое системное введение иммуносупрессорных терапевтических средств при патологическом процессе, например, если желательна отмена и подавление иммунного ответа, такого как аутоиммунные заболевания, или иммунного ответа в ткани, например, органа, трансплантата. Несмотря на то, что иммунодепрессанты широкого спектра действия могут подавлять клинически значимый ответ в случае, если лежащая в его основе патофизиология запускается аберрантной иммунной системой, однако, они дают нежелательный эффект снижения функции иммунной системы пациента. Поскольку, роль нормальной функционирующей иммунной системы заключается в предотвращении постоянной блокады патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, присутствующих в окружающей среде, и постоянном удалении раковых клеток у здоровых индивидуумов, то у пациентов с хронической иммуносупрессией наблюдается повышение риска развития инфекций и рака. Описанные здесь способы и терапевтические соединения представляют собой терапевтические соединения, которые обеспечивают селективное нацеливание только на патогенный иммунный ответ и обеспечивают аттенуирование, снижение или устранение только патогенного иммунного ответа в области заболевания, но при этом, в минимальной степени ингибируют нормальную системную функцию иммунной системы.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к заявленному здесь терапевтическому соединению. В некоторых вариантах осуществления изобретения, соединение включает: i) специфически нацеливающую молекулу, выбранную из: а) донор-специфической нацеливающей молекулы, которая, например, преимущественно связывается с мишенью донора; или б) тканеспецифической нацеливающей молекулы, которая, например, преимущественно связывается с тканью-мишенью индивидуума, и ii) молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор и выбранную из: (а) молекулы, связывающейся с молекулой, ингибирующей иммунную клетку/модулирующей указанную молекулу (ICIM-связывающей/ICIM-модулирующей молекулы); (б) иммуносупрессорной молекулы, связывающейся с иммунной клеткой/модулирующей иммунную клетку (ПС-связывающей/ПС-модулирующей

молекулы); или (с) молекулы, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, которая, как часть терапевтического соединения, стимулирует иммуносупрессорное локальное микроокружение, например, благодаря присутствию поблизости от мишени, вещества, которое ингибирует или минимизирует атаку мишени иммунной системой (SM–связывающей/SM–модулирующей молекулы).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу, включающую молекулу лиганда ингибирующей иммунной молекулы контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула противолиганда ингибирующей иммунной молекулы содержит молекулу PD–L1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICIM, если она представляет собой молекулу противолиганда ингибирующей иммунной молекулы, связывается с когнатной ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки, выбранной из PD–1, KIR2DL4, LILRB1, LILRB или CTLA–4. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICIM представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICIM содержит антитело, которое связывается с PD–1, KIR2DL4, LILRB1, LILRB или CTLA–4. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICIM–связывающая/ICIM–модулирующая молекула содержит функциональную молекулу антитела против ингибирующей молекулы клеточной поверхности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ингибирующей молекулой клеточной поверхности является ингибирующая молекула иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ингибирующая молекула иммунной контрольной точки выбрана из PD–1, KIR2DL4, LILRB1, LILRB2, CTLA–4 или из Таблицы 1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит IC –связывающую/IC–модулирующую молекулу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, соединение имеет формулу, от N–конца до C–конца: R1–линкерная область A – R2 или R3–линкерная область B – R4, где каждый R1, R2, R3 и R4 независимо содержит молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, например, ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу, IC–связывающую/IC–модулирующую молекулу, ICSM–связывающую/ICSM–модулирующую молекулу или SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу; специфически нацеливающую молекулу: или отсутствует, при условии, что присутствует молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, и специфическая нацеливающая молекула.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к полипептидам,

содержащим нацеливающую молекулу, которая связывается с клеткой–мишенью, и молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, представляет собой полипептид мутеина IL-2 (мутеин IL-2), который представляет собой мутантный белок IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающая молекула содержит антитело, которое связывается с белком–мишенью на поверхности клетки–мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения описан полипептид, содержащий две полипептидных цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая цепь содержит V_H-домен, а вторая цепь содержит V_L-домен антитела, которое связывается с клеткой–мишенью или с белком, который экспрессируется на клетке–мишени, таким как, но не ограничивающимся ими, MAdCAM. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающей молекулой является антитело, которое связывается с MAdCAM. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающая молекула связывается с OAT1 (SLC22A6) и OCT2 (SLC22A2). В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающая молекула не связывается с OAT1 (SLC22A6) и OCT2 (SLC22A2). Во избежание сомнений, следует отметить, что рассматриваемый здесь OCT2 не является фактором транскрипции, а представляет собой поверхностный белок, экспрессируемый в ткани почек. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающей молекулой является молекула, которая специфически связывается с белком, присутствующим в поджелудочной железе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающая молекула связывается с FX_{YD}2, TSPAN7, DPP6, NEPACAM2, TMEM27 или GPR119. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающая молекула не связывается с FX_{YD}2, TSPAN7, DPP6, NEPACAM2, TMEM27 или GPR119. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающей молекулой является антитело, которое связывается с FX_{YD}2, TSPAN7, DPP6, NEPACAM2, TMEM27 или GPR119.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид содержит первую цепь и вторую цепь, которые образуют полипептид или терапевтическое соединение, где:

первая цепь содержит:

V_H–H_c–линкер–C₁, где V_H представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи, который связывается с клеткой–мишенью с V_L-доменом второй цепи; H_c представляет собой тяжелую цепь антитела, содержащую домен CH1–CH2–CH3; линкер представляет собой аминокислотную последовательность из глицина/серина, описанную в настоящей заявке, или отсутствует, а C₁ представляет собой мутеин IL-2, который может быть присоединен к Fc–белку в N–концевой или C–концевой ориентации, описанной в настоящей заявке, где может присутствовать глициновый/сериновый линкер, связывающий мутеин IL-2 с Fc–белком; и

вторая цепь содержит:

V_L–L_c, где V_L представляет собой вариабельный домен легкой цепи, который связывается с клеткой–мишенью с V_H-доменом первой цепи, а домен L_c представляет

собой домен СК легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая цепь содержит C_1 -линкер- V_H - H_C , значения которых определены выше.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид имеет формулу: C_1 -линкер- CH_2 - CH_3 -линкер-scFv, где C_1 и линкер определены выше и в описании настоящей заявки, CH_2 и CH_3 представляют собой домены тяжелой цепи, а scFv представляет собой фрагмент, подобный одноцепочечному антителу, который действует как нацеливающая молекула, связывающаяся с тканями-мишенями, описанными в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин присоединен к Fc-области, описанной в настоящей заявке, а один или более линкеров отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкером является глициновый/сериновый линкер, описанный в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкером является пептидная последовательность.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способам лечения аутоиммунных заболеваний или состояний, где указанные способы включают введение одного или более описанных здесь терапевтических соединений или полипептидов.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способам лечения описанных здесь заболеваний или состояний, где указанные способы включают введение одного или более описанных здесь терапевтических соединений или полипептидов.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способам лечения индивидуума, страдающего воспалительным заболеванием кишечника, где указанные способы включают введение описанных здесь терапевтических соединений или полипептидов индивидууму для лечения воспалительного заболевания кишечника. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуум страдает болезнью Крона или язвенным колитом.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способам лечения индивидуума, страдающего аутоиммунным гепатитом, где указанные способы включают введение описанных здесь терапевтических соединений или полипептидов индивидууму для лечения аутоиммунного гепатита.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способам лечения первичного склерозирующего холангита, где указанные способы включают введение описанных здесь терапевтических соединений или полипептидов индивидууму для лечения первичного склерозирующего холангита.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способам лечения (например, снижения) воспаления тонкого кишечника, где указанные способы включают введение описанных здесь терапевтических соединений или полипептидов индивидууму для лечения воспаления тонкого кишечника. В некоторых вариантах осуществления изобретения, воспалением является воспаление тонкого кишечника. В некоторых вариантах осуществления изобретения, воспалением является воспаление

толстого кишечника. В некоторых вариантах осуществления изобретения, воспалением является воспаление кишечника или толстой кишки.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способам лечения (например, снижения) воспаления поджелудочной железы, где указанные способы включают введение описанных здесь терапевтических соединений или полипептидов индивидууму для лечения воспаления поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанные способы применяют для лечения панкреатита.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способам лечения диабета типа 1, где указанные способы включают введение описанных здесь терапевтических соединений или полипептидов индивидууму для лечения диабета типа 1.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способам лечения индивидуума с трансплантатом, где указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества описанных здесь терапевтических соединений или полипептидов индивидууму для лечения индивидуума с трансплантатом (реципиента).

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способам лечения БТПХ у индивидуума, которому была трансплантирована ткань донора, где указанные способы включают введение индивидууму терапевтически эффективного количества описанных здесь терапевтических соединений или полипептидов.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способам лечения индивидуума, страдающего аутоиммунным расстройством, или индивидуума с риском или повышенным риском развития аутоиммунного расстройства, где указанные способы включают введение терапевтически эффективного количества описанных здесь терапевтических соединений или полипептидов для лечения индивидуума.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены неограничивающие варианты описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 2 представлена неограничивающая иллюстрация функционирования описанного здесь терапевтического соединения.

На фиг. 3 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 3А представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 4 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 5 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 6 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 7 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 8 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 9 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 10 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 11 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 12 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 13 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 14 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 15 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 16 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 17 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 18 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

На фиг. 19 представлена неограничивающая иллюстрация описанных здесь терапевтических соединений.

Подробное описание изобретения

В настоящую заявку включены заявка на патент США No. 15/922592, поданная 15 марта 2018, и заявка PCT No. PCT/US2018/022675, поданная 15 марта 2018, каждая из которых включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки.

Используемый здесь термин «приблизительно», если это не оговорено особо, означает среднее $\pm 5\%$ отклонение от указанной величины. Таким образом, приблизительно 100 означает число от 95 до 105.

Используемые здесь и в прилагаемой формуле изобретения артикли «а», «an» и «the», относящиеся к существительным в единственном числе, могут относиться к существительным во множественном числе, если это явно не противоречит контексту описания.

Используемый здесь термин «приблизительно» означает, что указанная численная величина является приближенной и имеет незначительные отклонения, которые не должны оказывать существенного влияния на практическое осуществление раскрытых

вариантов изобретения. Если используются численные ограничения, то термин «приблизительно», если это не оговорено особо, означает, что численная величина может варьироваться в пределах $\pm 10\%$ и входит в объем раскрытых вариантов изобретения.

Используемый здесь термин «животное» включает, но не ограничиваются ими, человека и позвоночных, не являющихся человеком, таких как дикие, домашние и сельскохозяйственные животные.

Используемый здесь термин «контактирование» означает взаимодействие двух элементов в системе *in vitro* или *in vivo*. Так, например, «контактирование» терапевтического соединения с индивидуумом, или пациентом, или клеткой включает введение соединения индивидууму или пациенту, такому, как человек, а также, например, введение соединения в образец, содержащий клеточный или очищенный препарат, включающий мишень.

Используемые здесь термины «включающий» (и любую его грамматическую форму, такую как «включать», «включает» и «состоит из»), «имеющий» (и любую его грамматическую форму, такую как «иметь» и «имеет»), «охватывающий» (и любую его грамматическую форму, такую как «охватывает» и «охватывать») или «содержащий» (и любую его грамматическую форму, такую как «содержит» и «содержать») имеют инклюзивный или неисчерпывающий смысл и не исключают дополнительные, не указанные здесь элементы или стадии способа. При описании любой композиции или способа, в котором используется термин «включающий», следует также иметь в виду, такие композиции включают, состоят или, по существу, состоят из перечисленных компонентов или элементов.

Используемый здесь термин «присоединенный» или «связанный», если он относится к белку, имеющему различные замены или гетерологичные последовательности, означает, что домены белка являются частью одной и той же пептидной цепи и соединены друг с другом либо пептидными связями, либо другими ковалентными связями. Домены или части могут быть связаны или присоединены непосредственно друг к другу, либо другой домен или другая пептидная последовательность могут находиться между двумя доменами или последовательностями, и такие последовательности будут рассматриваться как присоединенные друг к другу или связанные друг с другом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, различные описанные здесь домены или белки связаны друг с другом или присоединены друг к другу непосредственно или посредством линкерных последовательностей, таких как описанные здесь глициновые/сериновые последовательности, соединяющие два домена вместе.

Используемые здесь термины «индивидуум», «субъект» или «пациент» являются синонимами и относятся к любому животному, включая млекопитающих, таких как мыши, крысы, другие грызуны, кролики, собаки, кошки, свиньи, крупный рогатый скот, овцы, лошади или приматы, такие как человек.

Используемый здесь термин «ингибировать» относится к результату, симптому или активности, которые были снижены по сравнению с активностью или результатом в

отсутствии соединения, которое уменьшает такой результат, симптом или активность. В некоторых вариантах осуществления изобретения, результат, симптом или активность ингибируются приблизительно на или по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99%. Результат, симптом или активность может быть также ингибированы, если вообще не исключены или удалены.

Используемое здесь выражение «нуждающийся в этом» означает, что индивидуум был идентифицирован как индивидуум, нуждающийся в проведении конкретного способа диагностики или лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, идентификацией может быть любой способ диагностики. Индивидуум может нуждаться в проведении любых описанных здесь способов и терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуум находится в каком-либо месте, либо он собирается поехать в определенное место, где распространены конкретные заболевания, расстройства или состояния.

Используемое здесь выражение «целое число от X до Y» означает любое целое число, которое включает конечные точки. Так, например, выражение «целое число от X до Y» означает 1, 2, 3, 4 или 5.

Используемый здесь термин «млекопитающее» относится к грызунам (то есть, к мышам, крысам или морским свинкам), обезьянам, кошкам, собакам, коровам, лошадям, свиньям или человеку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, млекопитающим является человек.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к терапевтическим соединениям. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическим соединением является белок или полипептид, который имеет множество цепей, взаимодействующих друг с другом. Полипептиды могут взаимодействовать друг с другом посредством нековалентных взаимодействий или ковалентных взаимодействий, например, посредством дисульфидных связей или других ковалентных связей. Следовательно, если вариант осуществления изобретения относится к терапевтическому соединению, то это может также означать, что он относится к описанному здесь белку или полипептиду, и наоборот, если это следует из контекста.

Используемый здесь термин «офтальмически приемлемый» означает отсутствие какого-либо негативного влияния на глаза, подвергаемые лечению, или на их функцию, или на общее состояние здоровья индивидуума, подвергаемого лечению. Однако, известно, что временные эффекты, такие как небольшое раздражение или «ощущения покалывания» являются обычными при местном офтальмическом введении лекарственных средств, и наличие таких временных эффектов не связано с введением композиции, препарата или ингредиента (например, наполнителя), который, как определено в настоящей заявке, должен быть «офтальмически приемлемым». В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтические композиции могут быть офтальмически приемлемыми или подходящими для офтальмического введения.

«Специфическое связывание» или «специфически связывается» с конкретным

антигеном, мишенью или эпитопом или «специфичный» к ним означают связывание, которое значительно отличается от неспецифического взаимодействия. Специфическое связывание может быть оценено, например, путем определения связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы, которая обычно представляет собой молекулу с аналогичной структурой, не обладающую активностью связывания. Так, например, специфическое связывание может быть определено по конкурентному связыванию с контрольной молекулой, которая аналогична мишени.

Специфическое связывание с конкретным антигеном, мишенью или эпитопом может быть выявлено, например, по антителу, имеющему K_D для антигена или эпитопа по меньшей мере приблизительно 10^{-4M} , по меньшей мере приблизительно 10^{-5M} , по меньшей мере приблизительно 10^{-6M} , по меньшей мере приблизительно 10^{-7M} , по меньшей мере приблизительно 10^{-8M} , по меньшей мере приблизительно 10^{-9M} , альтернативно, по меньшей мере приблизительно 10^{-10M} , по меньшей мере приблизительно 10^{-11M} , по меньшей мере приблизительно 10^{-12M} , или более, где K_D означает скорость диссоциации при взаимодействии конкретного антитела с мишенью. Обычно, антитело, которое специфически связывается с антигеном или мишенью, будет иметь K_D связывания с антигеном или эпитопом, такую же, как и для контрольной молекулы, или по меньшей мере в 2, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или более раз выше.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, специфическое связывание с конкретным антигеном, мишенью или эпитопом может быть выявлено, например, по антителу, имеющему K_A или K_a для мишени, антигена или эпитопа, по меньшей мере в 2, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или более раз превышающие K_A или K_a для контроля, где K_A или K_a означают скорость ассоциации при взаимодействии конкретного антитела с антигеном.

Как описано в настоящей заявке, терапевтические соединения и композиции могут быть использованы в описанных здесь способах лечения. Используемые здесь термины «лечить», «подвергаемый лечению» или «лечение» означают терапевтическое лечение и профилактические меры, где у индивидуума наблюдается ослабление (снижение) нежелательного физиологического состояния, расстройства или заболевания или достижение благоприятных или желаемых клинических результатов. Для осуществления этих вариантов, благоприятными или желаемыми клиническими результатами являются, но не ограничиваются ими, ослабление симптомов; снижение тяжести состояния, расстройства или заболевания; стабилизация (то есть, отсутствие прогрессирования) состояния, расстройства или заболевания; отсрочка начала развития или замедление прогрессирования состояния, расстройства или заболевания; ослабление или ремиссия состояния, расстройства или заболевания (частичное или полное), независимо от того, является ли оно детектируемым или нет; улучшение по меньшей мере одного оцениваемого физического параметра, который необязательно проявляется у пациента, или положительная динамика или уменьшение тяжести состояния, расстройства или заболевания. Лечение включает вырабатывание клинически значимого ответа в

отсутствии избыточных уровней побочных эффектов. Лечение также включает повышение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни в случае отсутствия лечения.

Настоящее изобретение относится к терапевтическим соединениям, например, к молекулам терапевтического белка, например, гибридных белков, включающих нацеливающую молекулу и молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, обычно в виде отдельных доменов. Настоящее изобретение также относится к способам применения и получения терапевтических соединений. Нацеливающая молекула служит для локализованной доставки терапевтического соединения, и таким образом доставки молекулы, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, на участок, в котором желательна иммунологическая предпочтительность. Молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, включает одну или более из: (а) молекулы, связывающейся с молекулой, ингибирующей иммунную клетку/модулирующей указанную молекулу (ICIM–связывающей/ICIM–модулирующей молекулы); (b) иммуносупрессорной молекулы, связывающейся с иммунной клеткой/модулирующей иммунную клетку (ПС–связывающей/ПС–модулирующей молекулы); (с) молекулы, связывающейся с растворимой молекулой/модулирующей растворимую молекулу (SM–связывающей/SM–модулирующей молекулы) или (d) молекулы, которая блокирует или ингибирует молекулу, связывающуюся с молекулой, стимулирующей иммунную клетку/модулирующую такую молекулу (далее называемой ICSM–связывающей/ICSM–модулирующей молекулой). В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICSM ингибирует иммунную активацию, например, посредством блокирования взаимодействия между костимулирующей молекулой и ее противоструктурой. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение включает: (а) и (b); (а) и (с); (а) и (d); (b) и (с); (b) и (d); (с) и (d); или (а), (b), (с) и (d).

В настоящем изобретении раскрываются, например, молекулы, которые могут действовать как агонисты PD–1. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что агонистическое действие PD–1 ингибирует активацию/передачу сигнала Т–клеток и может осуществляться по различным механизмам. Так, например, перекрестное связывание может приводить к агонистическому действию связанных со сферами функциональных агонистов PD–1 как описано в публикации (Akkaya. Ph.D. Thesis: Modulation of the PD–1 pathway by inhibitory antibody superagonists. Christ Church College, Oxford, UK, 2012), которая вводится в настоящее описание посредством ссылки. Перекрестное связывание PD–1 с двумя mAb, которые связываются с неперекрывающимися эпитопами, индуцирует передачу сигнала PD–1 (см. заявку Davis, US 2011/0171220, которая вводится здесь посредством ссылки). Другой пример проиллюстрирован на применении козьей анти–PD–1 антисыворотки (см., например, публикацию AF1086, R&D Systems, которая вводится здесь посредством ссылки), которая действует как агонист, если она присутствует в растворимой форме (см. публикацию (Said et al., 2010, Nat Med, которая вводится здесь посредством ссылки).

Неограничивающими примерами агонистов PD-1, которые могут быть использованы в вариантах осуществления изобретения, являются, но не ограничиваются ими, клон UCB 19 или клон 10, PD1AB-1, PD1AB-2, PD1AB-3, PD1AB-4 и PD1AB-5, PD1AB-6 (Anaptys/Celgene), PD1-17, PD1-28, PD1-33 и PD1-35 (Collins et al, US 2008/0311117 A1 «Antibodies against PD-1 и uses therefor», которая вводится здесь посредством ссылки) или они могут представлять собой биспецифическое одновалентное анти-PD-1/анти-CD3 антитело (Ono) и т.п. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела-агонисты PD-1 могут представлять собой антитела, которые блокируют связывание PD-L1 с PD-1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела-агонисты PD-1 могут представлять собой антитела, которые не блокируют связывание PD-L1 с PD-1.

Агонистическое действие PD-1 может быть оценено любым методом, например, методами, описанными в Примерах. Так, например, могут быть сконструированы клетки, которые экспрессируют конструкции, включая стабильную экспрессию конструкций, содержащих человеческий полипептид PD-1, присоединенный к «донорному ферменту» β -галактозидазе и 2) полипептид SHP-2, присоединенный к «акцепторному ферменту» β -галактозидазе. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что если PD-1 является связанным, то SHP-2 подвергается рекрутингу в PD-1. Акцепторный фермент и донорный фермент образуют полностью активный фермент β -галактозидазу, который может быть проанализирован. Хотя такой анализ не позволяет непосредственно определить агонистическое действие PD-1, однако, он позволяет выявить активацию передачи сигнала PD-1. Агонистическое действие PD-1 может быть также оценено путем определения ингибирования активации Т-клеток, и, не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, можно отметить, что агонистическое действие PD-1 ингибирует активацию Т-клеток, индуцированную анти-CD3 антителом. Так, например, агонистическое действие PD-1 может быть оценено посредством предварительной активации Т-клеток РНА (для человеческих Т-клеток) или ConA (для мышинных Т-клеток) так, чтобы они экспрессировали PD-1. Затем клетки могут быть повторно активированы анти-CD3 антителом молекул в присутствии анти-PD-1 антитела (или PD-L1) для проведения анализа на агонистическое действие PD-1. Т-клетки, которые получают сигнал агониста PD-1 в присутствии анти-CD3 антитела, будут иметь пониженную активность по сравнению с клетками, стимулированными только анти-CD3 антителом. Активация может быть оценена по пролиферации или по продуцированию цитокинов (IL-2, IFN γ , IL-17) или других маркеров, таких как маркер активации CD69. Таким образом, агонистическое действие PD-1 может быть оценено по продуцированию цитокинов или по пролиферации клеток. Для оценки агонистического действия PD-1 могут быть также применены и другие методы.

PD-1 представляет собой член суперсемейства Ig, экспрессируемый на активированных Т-клетках и на других иммунных клетках. Природные лиганды для PD-1, очевидно, представляют собой PD-L1 и PD-L2. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что если PD-L1 или PD-L2 связываются с

PD-1 на активированной Т-клетке, то это приводит к инициации ингибирующего каскада передачи сигнала и, тем самым, к аттенюированию функции активированной эффекторной Т-клетки. Таким образом, блокирование взаимодействия между PD-1 на Т-клетке и PD-L1/2 на другой клетке (например, на опухолевой клетке) с антагонистом PD-1 известно как ингибирование контрольной точки, которое приводит к высвобождению Т-клеток. В противоположность этому, антитела-агонисты PD-1 могут связываться с PD-1 и посылать ингибирующий сигнал, который снижает функцию Т-клетки. Таким образом, антитела-агонисты PD-1 могут быть включены в различные описанные здесь варианты осуществления изобретения как молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, которая может способствовать локализованной тканеспецифической иммуномодуляции при ее спаривании с нацеливающей молекулой.

Молекула, связывающаяся с эффекторной молекулой/модулирующая эффекторную молекулу, может передавать иммуносупрессорный сигнал или его окружение по различным механизмам. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, которая непосредственно связывается с ингибирующим рецептором и (в соответствующих условиях, описанных в настоящей заявке) активирует ингибирующий рецептор, экспрессируемый иммунными клетками, ответственными за развитие патологического состояния. В другом варианте осуществления изобретения, молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит IC-связывающую/IC-модулирующую молекулу, связывается с иммуносупрессорными иммунными клетками и аккумулирует их. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аккумулированные иммуносупрессорные клетки стимулируют иммунологическую предпочтительность. В другом варианте осуществления изобретения, молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит SM-связывающую/SM-модулирующую молекулу, которая модифицирует микросреду и становится менее доступной для функционирования иммунных клеток, например, ответственных за развитие патологического состояния. В некоторых вариантах осуществления изобретения, SM-связывающая/SM-модулирующая молекула способствует истощению молекул, которые стимулируют иммунную атаку или активацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит ICSM-связывающую/ICSM-модулирующую молекулу, которая связывается с членом пары стимулирующих молекул, например, костимулирующих молекул, и ингибирует взаимодействие между костимулирующей молекулой и противоструктурой костимулирующей молекулы, такой как, но не ограничивающейся ими, OX40 или CD30 или CD40 и OX40L или CD30L или CD40L, и ингибирует иммунную стимуляцию клетки, такой как, но не ограничивающейся ими, Т-клетка, В-клетка, NK-клетка или другая иммунная клетка, содержащая член этой пары.

Нацеливающая молекула и молекула, связывающаяся с

эффектором/модулирующая эффектор, являются физически связанными, ковалентно или нековалентно связанными, непосредственно связанными или связанными друг с другом посредством линкерной молекулы, например, как члена одной и той же молекулы белка в молекуле терапевтического белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающая молекула и эффекторная молекулы присутствуют в молекуле терапевтического белка, например, гибридного белка, обычно в виде отдельных доменов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающая молекула, молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, или обе эти молекулы содержат молекулу однодоменного антитела, например, молекулу VHH верблюжьего антитела или растворимый VH-домен человеческого антитела. Эта молекула может также содержать переменный домен одноцепочечного фрагмента (scFv) или Fab-домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула терапевтического белка или нуклеиновая кислота, например, мРНК или ДНК, кодирующая молекулу терапевтического белка, могут быть введены индивидууму. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающая молекула и молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, связаны с третьей молекулой, например, с носителем, например, полимерным носителем, дендримером или частицей, например, наночастицей. Терапевтические соединения могут быть использованы для ингибирования иммунного ответа в ткани, или в выбранной мишени, или в выбранном участке, но при этом, они не обладают иммуносупрессорной системной функцией, или имеют, в основном, пониженную системную функцию. Мишень или участок могут содержать донорскую ткань или аутологичную ткань.

Настоящее изобретение относится к способам обеспечения сайт-специфической иммунологической предпочтительности для трансплантированной донорской ткани, например, ткани аллотрансплантата, например, описанной здесь ткани, например, печеночного аллотрансплантата, почечного аллотрансплантата, аллотрансплантата сердца, аллотрансплантата поджелудочной железы, аллотрансплантата тимуса или ткани тимуса, кожного аллотрансплантата или легочного аллотрансплантата с использованием описанных здесь терапевтических соединений. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лечение позволяет минимизировать отторжение трансплантированной донорской ткани, минимизировать повреждение этой ткани, опосредуемое иммунными эффекторными клетками, пролонгировать доступность такой ткани или пролонгировать функциональное время жизни такой ткани.

Настоящее изобретение также относится к способам ингибирования реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) посредством минимизации способности донорских иммунных клеток, например, донорских Т-клеток опосредовать иммунную атаку ткани-реципиента, с использованием раскрытых здесь терапевтических соединений.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения, например, терапевтического лечения или профилактического лечения (или предотвращения) аутоиммунного расстройства или ответа у индивидуума путем введения раскрытого здесь

терапевтического соединения, например, для обеспечения сайт-специфической или тканеспецифической модуляции иммунной системы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такой способ обеспечивает толерантность к ткани индивидуума, позволяет минимизировать отторжение этой ткани и повреждение этой ткани, опосредуемое иммунными эффекторными клетками, или позволяет пролонгировать функцию этой ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение включает нацеливающую молекулу, которая нацелена, например, специфически нацелена на ткань, подвергающуюся аутоиммунной атаке, или ткань с риском аутоиммунной атаки. Неограничивающимися репрезентативными тканями являются, но не ограничиваются ими, поджелудочная железа, миелин, слюнные железы, синовиоциты и миоциты.

Используемые здесь термины «лечить», «подвергаемый лечению» или «лечение» означают терапевтическое лечение, где у индивидуума наблюдается ослабление (снижение) нежелательного физиологического состояния, расстройства или заболевания, или достижение благоприятных или желаемых клинических результатов. Так, например, благоприятными или желаемыми клиническими результатами являются, но не ограничиваются ими, ослабление симптомов; снижение тяжести состояния, расстройства или заболевания; стабилизация (то есть, отсутствие прогрессирования) состояния, расстройства или заболевания; отсрочка начала развития или замедление прогрессирования состояния, расстройства или заболевания; ослабление или ремиссия состояния, расстройства или заболевания (частичное или полное), независимо от того, является ли оно детектируемым или нет; улучшение по меньшей мере одного оцениваемого физического параметра, который необязательно проявляется у пациента, или положительная динамика или уменьшение тяжести состояния, расстройства или заболевания. Лечение включает вырабатывание клинически значимого ответа в отсутствии избыточных уровней побочных эффектов. Лечение также включает повышение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни в случае отсутствия лечения. Таким образом, «лечение аутоиммунного заболевания/расстройства» означает действие, которое приводит к ослаблению или улучшению любого первичного признака или вторичных симптомов, ассоциированных с аутоиммунным заболеванием/расстройством или описанным здесь состоянием. В настоящей заявке описаны различные заболевания или состояния. Терапевтическое лечение может быть также осуществлено в профилактических целях для предотвращения заболевания или состояния до начала его развития или ослабления такого заболевания или состояния.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, введение терапевтического соединения начинают после появления расстройства. В некоторых вариантах осуществления изобретения, введение терапевтического соединения начинают до начала развития расстройства или после его появления. В некоторых вариантах осуществления изобретения, введение терапевтического соединения начинают до начала или после

развития расстройства, например, индивидууму, страдающему расстройством, индивидууму с высоким риском развития расстройства, индивидууму, имеющему биомаркер, указывающий на риск развития или на наличие расстройства, индивидууму, у которого такое расстройство имеется в анамнезе, или индивидууму с другим индикатором риска развития расстройства или наличия бессимптомного расстройства. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, лечению подвергают индивидуума, у которого наблюдается повреждение островковых клеток, но у которого диабет пока отсутствует.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь предполагают, что функции нацеливающей молекулы заключаются в связывании терапевтического соединения с мишенью и аккумуляции терапевтического соединения в мишени, селективно экспрессируемой в анатомическом участке, где желательна иммунологическая предпочтительность. В некоторых вариантах осуществления изобретения, например, при трансплантации донорской ткани, нацеливающая молекула связывается с мишенью, например, с аллельным продуктом, присутствующим в донорской ткани, но не в ткани реципиента. Для лечения аутоиммунных расстройств необходимо, чтобы нацеливающая молекула связывалась с мишенью, преимущественно экспрессируемой в анатомическом участке, где желательна иммунологическая предпочтительность, например, в поджелудочной железе. Для лечения РТПХ, нацеливающая молекула должна быть нацелена на ткань хозяина и должна защищать хозяина от атаки трансплантированных иммунных эффекторных клеток, происходящих от трансплантированной ткани.

И в этом случае, не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь предполагают, что молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, служит для доставки иммуносупрессорного сигнала или какого-либо другого достижения окружения с иммунологической предпочтительностью.

Если это не оговорено особо, то все используемые здесь технические и научные термины имеют свое общепринятое значение, известное специалисту в области, к которой относятся эти варианты изобретения. Хотя для практического осуществления вариантов изобретения или для проведения тестов в соответствии с этими вариантами могут быть применены методы и материалы, аналогичные или эквивалентные методам и материалам, описанным в настоящей заявке, однако, подходящими являются методы и материалы, описанные ниже. Все упомянутые здесь публикации, патентные заявки, патенты и другие документы вводятся в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. Кроме того, эти материалы, методы и примеры приводятся лишь в иллюстративных целях и не рассматриваются как ограничение изобретения. Заголовки, подзаголовки или цифровые или буквенные элементы, например, (a), (b), (i) и т.п. приводятся лишь для простоты их прочтения. Использование заголовков или цифровых или буквенных элементов в этом документе не означает, что эти стадии или элементы должны быть осуществлены в алфавитном порядке, или что эти стадии или элементы должны обязательно отличаться друг от друга. Другие признаки, объекты и преимущества вариантов изобретения будут

очевидны из описания и чертежей, а также из формулы изобретения.

Дополнительные определения

Если это не оговорено особо, то все используемые здесь технические и научные термины имеют свое общепринятое значение, известное специалисту в области, к которой относятся эти варианты изобретения. В описании вариантов осуществления изобретения и в формуле изобретения, нижеследующая терминология и терминология, употребляемая в других документах, цитируемых в настоящей заявке, будет использована так, как она определена в настоящей заявке, если такое определение приводится.

Следует отметить, что используемая здесь терминология приводится лишь для описания конкретных вариантов осуществления изобретения, и не рассматривается как ограничение объема изобретения.

Используемый здесь термин «молекула антитела» означает полипептид, например, цепь иммуноглобулина или ее фрагмент, содержащие по меньшей мере одну функциональную последовательность вариабельного домена иммуноглобулина. Молекула антитела включает антитела (например, полноразмерные антитела) и фрагменты антител. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула антитела включает антигенсвязывающий или функциональный фрагмент полноразмерного антитела или полноразмерную цепь иммуноглобулина. Так, например, полноразмерным антителом является молекула иммуноглобулина (Ig) (например, антитело IgG), которая является природной или образована в результате процессов рекомбинации нормального фрагмента гена иммуноглобулина. В вариантах осуществления изобретения, молекула антитела означает иммунологически активную антигенсвязывающую часть молекулы иммуноглобулина, такую как фрагмент антитела. Фрагмент антитела, например, функциональный фрагмент, содержит часть антитела, например, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, вариабельный фрагмент (Fv), доменное антитело (dAb) или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). Функциональный фрагмент антитела связывается с антигеном, который распознается интактным (например, полноразмерным) антителом. Термины «фрагмент антитела» или «функциональный фрагмент» также включают выделенные фрагменты, состоящие из вариабельных областей, таких как «Fv-фрагменты», состоящие из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей или рекомбинантных одноцепочечных полипептидных молекул, в которых вариабельные области легкой и тяжелой цепи соединены пептидным линкером («белки scFv»). В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент антитела не включает части антител, не обладающие антигенсвязывающей активностью, такие как Fc-фрагменты или отдельные аминокислотные остатки. Репрезентативными молекулами антител являются полноразмерные антитела и их фрагменты, например, dAb (доменное антитело), одноцепочечные фрагменты, фрагменты Fab, Fab' и F(ab')₂ и одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv).

Термин «молекула антитела» также охватывает полноразмерные антитела или антигенсвязывающие фрагменты доменных или однодоменных антител, которые могут

также обозначаться «sdAb» или «VHH». Доменные антитела содержат V_H или V_L , которые могут действовать автономно как фрагменты антител. Кроме того, доменные антитела включает антитела только с тяжелой цепью (HCAb). Доменные антитела также включают CH2-домен IgG в качестве каркасной основы, к которой присоединяют CDR-петли. Эти антитела могут быть определены общим термином как полипептид или белок, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из четырех каркасных областей, которые прерываются тремя гипервариабельными областями. Это антитело представлено как FR1–CDR1–FR2–CDR2–FR3–CDR3–FR4. sdAb могут быть получены у верблюдов, таких как ламы, но они могут быть также получены методами синтеза, хорошо известными специалистам. Нумерация аминокислотных остатков sdAb или полипептида соответствует общей нумерации VH-доменов по Кэбату и др. («Sequence of proteins of immunological interest», US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91, содержание которой вводится в настоящее описание посредством ссылки). В соответствии с этой нумерацией, FR1 sdAb содержит аминокислотные остатки в положениях 1–30, CDR1 sdAb содержит аминокислотные остатки в положениях 31–36, FR2 sdAb содержит аминокислотные остатки в положениях 36–49, CDR2 sdAb содержит аминокислотные остатки в положениях 50–65, FR3 sdAb содержит аминокислотные остатки в положениях 66–94, CDR3 sdAb содержит аминокислотные остатки в положениях 95–102, и FR4 sdAb содержит аминокислотные остатки в положениях 103–113. Доменные антитела также описаны в заявках WO2004041862 и WO2016065323, каждая из которых вводится в настоящее описание посредством ссылки. Доменные антитела могут представлять собой нацеливающую молекулу, описанную в настоящей заявке.

Молекулы антитела могут быть моноспецифическими (например, одновалентными или двухвалентными), биспецифическими (например, двухвалентными, трехвалентными, четырехвалентными, пятивалентными или шестивалентными), триспецифическими (например, трехвалентными, четырехвалентными, пятивалентными, шестивалентными), либо они могут иметь специфичность более высокого порядка (например, являются тетраспецифическими) и/или могут иметь валентность более высокого порядка за пределами 6. Молекула антитела может содержать функциональный фрагмент вариабельной области легкой цепи и функциональный фрагмент вариабельной области тяжелой цепи, либо тяжелые и легкие цепи могут быть связаны друг с другом с образованием одного полипептида.

Примеры форм мультиспецифических терапевтических соединений, например, молекул биспецифических антител представлены в нижеследующих неограничивающих примерах. Хотя эти молекулы проиллюстрированы как молекулы антитела, однако, они могут быть использованы как платформа для получения терапевтических молекул, которые включают и другие молекулы, не являющиеся антителами, такие как специфически связывающиеся или эффекторные молекулы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эти неограничивающие примеры основаны на симметричных или асимметричных Fc-формах.

Так, например, на фигурах проиллюстрированы неограничивающие и различные способы получения симметричных гомодимеров. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пограничная область димеризации находится в центре, а вокруг нее расположены СН2–СН3–домены человеческого IgG1, которые димеризуются посредством контактирующей пограничной области, охватывающей оба СН2/СН2 и СН3/СН3. Полученные и представленные биспецифические антитела имеют общую валентность, состоящую из четырех связывающих звеньев с двумя идентичными связывающими звеньями у N–конца на каждой стороне димера и с двумя идентичными звеньями у С–конца на каждой стороне димера. В каждом случае, связывающие звенья у N–конца гомодимера отличаются от связывающих звеньев у С–конца гомодимера. С использованием такого типа бивалентности для ингибирующего Т–клеточного рецептора у любого конца молекулы, может быть достигнута и бивалентность для антигена, связанного с тканью, у любого конца молекулы.

Так, например, на фиг. 3 проиллюстрирован неограничивающий вариант осуществления изобретения. N–конец гомодимера содержит два идентичных Fab–домена, состоящих из двух идентичных легких цепей, которые представляют собой отдельные полипептиды, граничащие с N–концевыми VH–СН1–доменами каждой тяжелой цепи посредством взаимодействия VH/VL и взаимодействия С–каппа или С–ламбда с СН1. Присутствующая нативная дисульфидная связь между С–каппа или С–ламбда с СН1 создает ковалентный якорь между легкими и тяжелыми цепями. У С–конца этой конструкции находятся два идентичных звена scFv, где (в этом примере) за С–концом СН3–домена Fc расположен гибкий гидрофильный линкер, обычно состоящий (но не ограничивающийся ими) из сериновых, глициновых, аланиновых и/или треониновых остатков, за которыми расположен VH–домен каждого звена scFv, а за ним следует линкер, богатый глицином/серином, за которым следует VL–домен. Эти tandemные VH– и VL–домены связываются друг с другом с образованием одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), находящегося у С–конца Fc. Два таких звена находятся у С–конца этой молекулы, что обусловлено гомодимерной природой центральной молекулы у Fc. Порядок расположения доменов scFv может иметь конфигурацию от N– до С–конца и представляет собой либо VH–линкер–VL, либо VL–линкер–VH.

Неограничивающим примером молекулы, которая имеет различные связывающие области на различных концах, является молекула, где на одном конце находится агонист PD–1, а антитело, которое сообщает специфичность к мишени, представляет собой анти–MAdCAM–1 антитело. Это можно видеть, например, на фиг. 3А, где показаны молекулы в различных ориентациях.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, анти–MAdCAM антителом является блокирующее или неблокирующее антитело, описанное в настоящей заявке. Не ограничиваясь какой–либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что MAdCAM взаимодействует с головной группой интегрина $\alpha 4\beta 7$, экспрессируемого на лимфоцитах посредством множества остатков в двух сериях доменов, принадлежащих к

суперсемейству IgI, и структурные основы на атомном уровне для такого взаимодействия были описаны в литературе (Viney JL et al. (1996). *J Immunol.* 157, 2488–2497; Yu Y et al (2013). *J Biol Chem.* 288, 6284–6294; Yu Y et al (2012). *J Cell Biol.* 196, 131–146, содержание которых включены в настоящее описание в полном объеме в качестве ссылки). Тщательный структурный, механистический и функциональный подробный анализ человеческих молекулярных структур (Chen J et al (2003). *Nat Struct Biol.* 10, 995–1001; de Chateau M et al (2001). *Biochemistry.* 40, 13972–13979) и мышинных молекулярных структур (Day ES et al (2002). *Cell Commun Adhes.* 9, 205–219; Hoshino H et al (2011). *J Histochem Cytochem.* 59, 572–583) показал, что любое взаимодействие MAdCAM с $\alpha 4\beta 7$ зависит от трех двухкатионных сайтов связывания, присутствующих в домене, подобном субзвену I интегрина бета 7, и что эти сайты связывания с металлом могут быть координированы с Ca^{2+} , Mn^{2+} и Mg^{2+} . Анализы на клеточную адгезию, анализы с помощью проточной цитометрии и/или анализы в проточной камере, проводимые в присутствии высоких уровней Ca^{2+} , но в присутствии или в отсутствии Mn^{2+} или Mg^{2+} , показали, что взаимодействие MAdCAM/ $\alpha 4\beta 7$ происходит с меньшей функциональной аффинностью и обеспечивает адгезию «катящихся» лимфоцитов, тогда как при низком уровне Ca^{2+} , но при более высоких уровнях Mn^{2+} или Mg^{2+} , которые активируют интегрин, взаимодействие MAdCAM/ $\alpha 4\beta 7$ происходит с более высокой функциональной аффинностью и опосредует жесткую адгезию лимфоцитов (Chen J et al (2003). *Nat Struct Biol.* 10, 995–1001). Несколькими группами специалистов было показано, что анализы на адгезию/взаимодействие различных клеток, клеток:мембранных препаратов и/или клеток:белков могут быть проведены с помощью FACS путем подсчета числа клеток в проточной камере или путем подсчета ридов посредством ИГХ для мониторинга влияния анти-MAdCAM или анти- $\alpha 4\beta 7$ антител на взаимодействие MAdCAM с $\alpha 4\beta 7$, что позволит идентифицировать блокирующие или неблокирующие антитела (Nakache, M et al (1989). *Nature.* 337, 179–181; Streeter, PR et al (1988). *Nature.* 331. 41–46; Yang Y et al (1995). *Scand J Immunol.* 42. 235–247; Leung E et al (2004). *Immunol Cell Biol.* 82. 400–409; Pullen N et al (2009). *В J. Pharmacol.* 157. 281–293; Soler D et al (2009). *J Pharmacol Exp Ther.* 330. 864–875; Qi J et al (2012). *J Biol Chem.* 287. 15749–15759).

Это было проиллюстрировано на примере параметров мышинной системы для идентификации антител против мышинового MAdCAM, таких как MECA–89 (неблокирующее антитело) и MECA–367 (блокирующее антитело) (Nakache, M et al. (1989). *Nature.* 337, 179–181; Streeter, PR et al (1988). *Nature.* 331. 41–46; Yang Y et al (1995). *Scand J Immunol.* 42. 235–247). В системе человека были идентифицированы антитела, которые блокируют взаимодействие человеческого MAdCAM с человеческим $\alpha 4\beta 7$, такие как антитело против человеческого MAdCAM PF–00547659 (Pullen N et al (2009). *В J. Pharmacol.* 157. 281–293) и антитело против человеческого $\alpha 4\beta 7$, ведолизумаб (Soler D et al (2009). *J Pharmacol Exp Ther.* 330. 864–875), а также антитела, которые не блокируют взаимодействие, такие как антитело против человеческого MAdCAM, клон 17F5 (Soler D et al (2009). *J Pharmacol Exp Ther.* 330. 864–875), и антитело против

человеческого $\alpha 4\beta 7$, клон J19 (Qi J et al (2012). J Biol Chem. 287. 15749–15759). Таким образом, антитело может представлять собой блокирующее или неблокирующее антитело исходя из желаемого эффекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антителом является неблокирующее антитело против MAdCAM. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антителом является блокирующее антитело против MAdCAM. Один из неограничивающих примеров иллюстрации блокирующего антитела или неблокирующего антитела можно найти в Примере 6, но может быть использован любой метод. Каждый из описанных здесь документов включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления изобретения, агонист PD-1 заменяют на мутеин IL-2, такой как, но не ограничивающийся ими, мутеин, описанный в настоящей заявке.

В другом примере и как показано на фиг. 4, N-конец гомодимера содержит два идентичных Fab-домена, состоящих из двух идентичных легких цепей, которые представляют собой отдельные полипептиды, граничащие с N-концевыми VH-CH1-доменами каждой тяжелой цепи посредством взаимодействия VH/VL и взаимодействия C-каппа или C-лямбда с CH1. Присутствующая нативная дисульфидная связь между C-каппа или C-лямбда с CH1 создает ковалентный якорь между легкими и тяжелыми цепями. У C-конца этой конструкции находится два идентичных звена VH (хотя молекулы, не являющиеся антителом, могут быть также заменены в данном положении или в любом из четырех концевых положений присоединения/связывания), где (в этом примере) за C-концом CH3-домена Fc расположен гибкий гидрофильный линкер, обычно состоящий (но не ограничивающийся ими) из сериновых, глициновых, аланиновых и/или треониновых остатков, за которыми расположен VH-домен на основе семейства VH3 зародышевой линии независимо от его растворимости. Два таких звена находятся у C-конца этой молекулы, что обусловлено гомодимерной природой центральной молекулы у Fc.

В другом неограничивающем примере, как показано на фиг.5, N-конец гомодимера содержит два идентичных Fab-домена, состоящих из двух идентичных легких цепей, которые, в отличие от доменов, показанных на фиг. 3 и фиг. 4, физически связаны с тяжелой цепью у N-конца посредством линкера, расположенного между C-концом C-каппа или C-лямбда и N-концом VH. Линкер может иметь длину в 36–80 аминокислот и состоит из сериновых, глициновых, аланиновых и треониновых остатков. Физически связанные N-концевые легкие цепи граничат с N-концевыми VH-CH1-доменами каждой тяжелой цепи посредством взаимодействия VH/VL и взаимодействия C-каппа или C-лямбда с CH1. Присутствующая нативная дисульфидная связь между C-каппа или C-лямбда с CH1 создает дополнительную стабильность между легкими и тяжелыми цепями. У C-конца этой конструкции находятся два идентичных звена Fab, где (в этом примере) за C-концом CH3-домена Fc расположен гибкий гидрофильный линкер, обычно состоящий (но не ограничивающийся ими) из сериновых, глициновых, аланиновых и/или треониновых остатков, за которыми расположен CH1-домен, а за ним следует VH-домен

у С-конца. Легкая цепь, сконструированная для спаривания с С-концевыми CH1/VH-доменами, экспрессируется как отдельный полипептид, в отличие от N-концевой легкой цепи, которая была присоединена к N-концевым VH/CH1-доменам, как описано в настоящей заявке. С-концевые легкие цепи образуют пограничную область между VH/VL и С-каппа или С-ламбда с CH1. Нативный дисульфид связывается эту легкую цепь с тяжелой цепью. И в этом случае, любые молекулы антитела в любом из четырех положений присоединения/связывания могут быть заменены молекулой, не являющейся антителом, например, молекулой, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, которая не содержит молекулу антитела.

Биспецифические антитела могут быть также асимметричными как показано в нижеследующих неограничивающих примерах. Неограничивающий пример также представлен на фиг. 6, фиг. 7 и фиг. 8, где проиллюстрирован способ получения асимметрической молекулы/гетеродимера. И в этом случае, в любой из этих форм, любые молекулы антитела в любом из четырех положений присоединения/связывания могут быть заменены молекулой, не являющейся антителом, например, молекулой, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, которая не содержит молекулу антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пограничная область димеризации находится в центре, а вокруг нее расположены CH2-CH3-домены человеческого IgG1, которые димеризуются посредством контактирующей пограничной области, охватывающей оба CH2/CH2 и CH3/CH3. Однако, для достижения гетеродимеризации, вместо гомодимеризации каждой тяжелой цепи, мутации вводят в каждый CH3-домен. Гетеродимеризующими мутациями являются мутация T366W (по Кэбату) на одном CH3-домене и мутации T366S, L368A и Y407V (по Кэбату) в другом CH3-домене. Гетеродимеризующая пограничная область может быть дополнительно стабилизирована с использованием *de novo* дисульфидных связей посредством замены природных остатков на цистеиновые остатки, такие как S354 и Y349 на противоположных сторонах пограничной области CH3/CH3. Полученные и представленные биспецифические антитела имеют общую валентность, состоящую из четырех связывающих звеньев. С применением этого подхода может быть сконструирована общая молекула так, чтобы она была биспецифичной только у одного конца и моноспецифичной у другого конца (с общей триспецифичностью) или биспецифичной у обоих концов с общей молекулярной специфичностью 2 или 4. В описанных ниже иллюстративных примерах, С-конец содержит два идентичных связывающих домена, которые могут, например, сообщать двухвалентную моноспецифичность для мишени, связанной с тканью. У N-конца всех трех соединений иллюстративных примеров, оба связывающих домена содержат различные распознающие элементы/паратопы, которые могут распознавать два различных эпитопа на одной и той же эффекторной молекуле-мишени или они могут распознавать, например, Т-клеточный ингибирующий рецептор и CD3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, N-концевые связывающие молекулы могут быть заменены другими одноцепочечными полипептидами, такими как

полипептиды, имеющие, например, конфигурацию scFv, одноцепочечного Fab, tandemного scFv, или антитела с VH– или VHH–доменами. Может быть также использован распознающий элемент другого типа, такой как линейные или циклические пептиды.

Пример асимметрической молекулы представлен на фиг. 6. Как видно на фиг. 6, N–конец молекулы состоит из первой легкой цепи, спаренной с первой тяжелой цепью посредством взаимодействий VH/VL и взаимодействия С–каппа или С–лямбда с CH1, а ковалентная связь состоит из нативной дисульфидной связи тяжелой/легкой цепи. С противоположной стороны этой гомодимерной молекулы, у N–конца присутствует вторая легкая цепь и вторая тяжелая цепь, которые физически связаны посредством линкера, расположенного между С–концом С–каппа или С–лямбда и N–концом VH. Линкер может иметь длину в 36–80 аминокислот и состоит из сериновых, глициновых, аланиновых и треониновых остатков. Физически связанные N–концевые легкие цепи граничат с N–концевыми VH–CH1–доменами каждой тяжелой цепи посредством взаимодействия VH/VL и взаимодействия С–каппа или С–лямбда с CH1. Присутствующая нативная дисульфидная связь между С–каппа или С–лямбда с CH1 создает дополнительную стабильность между легкими и тяжелыми цепями. У С–конца молекулы присутствуют два идентичных растворимых домена VH, принадлежащих к семейству VH3 и присоединенных посредством N–концевого линкера на основе глицина/серины/аланина/треонина к С–концу CH3–домена тяжелой цепи 1 и тяжелой цепи 2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, асимметрическая молекула может представлять собой молекулу, проиллюстрированную на фиг. 7. Так, например, N–конец молекулы состоит из двух различных растворимых VH–доменов на основе VH3 зародышевой линии, связанных с шарнирной областью человеческого IgG1 посредством линкера на основе глицина/серины/аланина/треонина. VH–домен, соединенный с первой тяжелой цепью, отличается от VH–домена, соединенного со второй тяжелой цепью. У С–конца каждой тяжелой цепи присутствуют дополнительный растворимый VH–домен на основе VH3 зародышевой линии, который идентичен доменам на каждой из двух тяжелых цепей. Тяжелая цепь гетеродимеризуется посредством описанных ранее узлов с образованием мутаций в виде дырок, присутствующих в пограничной области CH3 Fc–модуля.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, асимметрическая молекула может представлять собой молекулу, проиллюстрированную на фиг. 8. Этот пример молекулы аналогичен молекуле, представленной на фиг. 7, за исключением того, что оба N–концевых звена Fab имеют конфигурацию, при которой легкая цепь 1 и легкая цепь 2 физически связаны с тяжелой цепью 1 и тяжелой цепью 2 посредством линкера, расположенного между С–концом С–каппа или С–лямбда и N–концом каждого соответствующего VH. В каждом случае, линкер может иметь длину в 36–80 аминокислот и состоит из сериновых, глициновых, аланиновых и треониновых остатков. Физически

связанные N–концевые легкие цепи граничат с N–концевыми VH–CH1–доменами каждой тяжелой цепи посредством взаимодействия VH/VL и взаимодействия C–каппа или C–лямбда с CH1. Присутствующая нативная дисульфидная связь между C–каппа или C–лямбда с CH1 создает дополнительную стабильность между легкими и тяжелыми цепями.

Биспецифические молекулы могут также иметь смешанную форму. Эта форма проиллюстрирована, например, на фиг. 9, фиг. 10 и фиг. 11.

Так, например, на фиг. 9 проиллюстрирован способ на основе гомодимера Fc (см. фиг. 3, 4 и 5), объединенный со способом отбора молекул в форме, представленной на фиг. 7, где общая молекулярная валентность равна четырем, но ее специфичность ограничена двумя специфичностями. N–конец состоит из двух идентичных растворимых VH–доменов на основе VH3 зародышевой линии, а C–конец состоит из двух идентичных растворимых VH–доменов на основе VH3 зародышевой линии со специфичностью, отличающейся от специфичности N–концевых доменов. Следовательно, каждая специфичность имеет валентность 2. И в этом случае, при таком формате, любые молекулы антитела в любом из четырех положений присоединения/связывания могут быть заменены молекулой, не являющейся антителом, например, молекулой, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, которая не содержит молекулу антитела.

На фиг. 10 проиллюстрирован другой пример. В этом примере, молекула состоит из четырех растворимых VH–доменов на основе VH3 зародышевой линии. Первые два домена имеют одну и ту же специфичность (например, к ингибирующему рецептору), 3–й домен от N–конца может обладать специфичностью к антигену ткани, а четвертый домен от N–конца может обладать специфичностью к альбумину человеческой сыворотки (HSA), что сообщает молекуле более длительное время полужизни в отсутствии Fc–домена Ig. Три линкера, богатых глицином, серином, аланином и/или треонином, расположены между доменами 1 и 2, доменами 2 и 3 и доменами 3 и 4. Такая форма молекулы может иметь тетраспецифическую конфигурацию, но в каждом случае, она является одновалентной, либо в каждом случае, она может быть биспецифичной и двухвалентной. Порядок расположения доменов может быть изменен. И в этом случае, при таком формате, любые молекулы антитела могут быть заменены молекулой, не являющейся антителом, например, молекулой, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, которая не содержит молекулу антитела.

На фиг. 11 проиллюстрирован еще один способ. Этот пример аналогичен примеру, проиллюстрированному на фиг. 3 и 4, в том, что он представляет собой гомодимер Fc на основе двух идентичных звеньев Fab (с двухвалентной моноспецифичностью) у N–конца молекулы. Этот пример отличается тем, что C–конец каждой тяжелой цепи дополнен тамдным scFv. Таким образом, в каждом случае, C–конец CH3–домена Fc связан посредством линкера на основе глицина/серины/аланина/треонина с N–концом первого VH–домена, который связан посредством C–конца линкером из 12–15 аминокислот, богатых глицином/серином, с N–концом первого VL–домена, который связан посредством

линкера из 25–35 аминокислот на основе глицина/серина/аланина/треонина у С–конца с N–концом второго VH–домена, который связан у С–конца линкером из 12–15 аминокислот на основе глицином/серином, с N–концом 2–го VL–домена. В этой молекуле на основе гомодимера Fc присутствуют два идентичных tandemных scFv у С–конца молекулы, что сообщает четырехвалентность для одного антигена ткани или, например, двухвалентность для двух различных молекул. Этот формат может быть также адаптирован с использованием гетеродимерной сердцевины Fc, что сообщает двум различным tandemным scFv у С–конца Fc одновалентную тетраспецифичность у С–конца и сохраняет двухвалентную моноспецифичность у N–конца или одновалентную биспецифичность у N–конца благодаря конфигурациям одноцепочечного Fab, как показано на фиг. 5, 6 и 7. Следовательно, эта молекула может иметь конфигурацию, при которой она будет иметь специфичности 2, 3, 4, 5 или 6. Порядок расположения доменов scFv в звеньях tandemного scFv может быть таким, что от N–конца до С–конца будет присутствовать либо VH–линкер–VL, либо VL–линкер–VH. И в этом случае, при таком формате, любые молекулы антитела в любом из четырех положений присоединения/связывания могут быть заменены молекулой, не являющейся антителом, например, молекулой, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, которая не содержит молекулу антитела.

Биспецифические антитела могут быть также сконструированы так, чтобы они имели, например, менее продолжительное системное фармакокинетическое действие и повышенную способность проникать в ткань. Антитела этих типов могут быть получены на основе, например, доменного антитела, содержащего человеческий VH3. Эти антитела проиллюстрированы, например, на фиг. 12, 13 и 14. На фиг. 12, 13 и 14 представлено каждое антитело, состоящее из растворимых модулей VH–доменов на основе семейства VH3 зародышевой линии. Каждый домен имеет размер приблизительно 12,5 кДа, что соответствует небольшой общей молекулярной массе, которая, как можно предположить, не ограничиваясь какой–либо конкретной теорией, должна быть подходящей для повышения степени проникновения в ткань. В этих примерах, ни один из VH–доменов не распознает какие–либо мишени, увеличивающие время полужизни, такие как FcRn или HSA. Как показано на фиг. 12, эта молекула состоит из двух VH–доменов, связанных посредством гибкого гидрофильного линкера на основе глицина/серина, расположенного между С–концом первого домена и N–концом второго домена. В этом примере, один домен может распознавать T–клеточный костимулирующий рецептор, а второй домен может распознавать антиген, связывающийся с тканью. Как показано на фиг. 13, эта молекула состоит из трех VH–доменов с N–С–концевыми связями гидрофильных линкеров на основе глицина/серина. Эта молекула может иметь конфигурацию, при которой она будет триспецифичной, но одновалентной для каждой мишени. Эта молекула может быть биспецифичной и двухвалентной для одной мишени и одновалентной для другой мишени. Как показано на фиг. 14, эта молекула состоит из четырех VH–доменов с N–С–концевыми линкерами, богатыми глицином/серином и расположенными между

каждым доменом. Эта молекула может иметь конфигурацию, при которой, в каждом случае, она будет тетраспецифичной, триспецифичной или биспецифичной с различными антигенными валентностями. И в этом случае, при таком формате, любые молекулы антитела могут быть заменены молекулой, не являющейся антителом, например, молекулой, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, которая не содержит молекулу антитела.

Другие варианты биспецифических антител проиллюстрированы на фиг. 15 и 16. На фиг. 15 и 16 представлены молекулы, состоящие из природной гетеродимеризующей сердцевины пограничной области CH1/C-каппа человеческого IgG, включая C-концевую дисульфидную связь тяжелой/легкой цепи, которая ковалентно заякоривает такой взаимодействие. Молекула такого формата не содержит Fc или каких-либо молекул, увеличивающих время полужизни. Как показано на фиг. 15, молекула у N-конца константного домена каппа дополнена фрагментом scFv, состоящим из N-концевого VH-домена, связанного своим C-концом с N-концом VL-домена посредством линкера из 12–15 аминокислот на основе gly/ser, который своим C-концом связан с N-концом константного домена каппа посредством нативной последовательности витка VL-C-каппа. CH1-домен присоединен у N-конца к фрагменту scFv, состоящему из N-концевого VL-домена, связанного своим C-концом с N-концом VH-домена посредством линкера из 12–15 аминокислот на основе gly/ser, который своим C-концом связан с N-концом CH1-доменов посредством нативной последовательности витка VH-CH1. Как показано на фиг. 16, эта молекула имеет такую же N-концевую конфигурацию как и молекула Примера 13. Однако, C-конец константных доменов каппа и CH1-доменов дополнен модулями scFv, которые могут иметь конфигурацию VH-VL или VL-VH, и которые могут быть специфичными к одному и тому же антигену или к двум различным антигенам. Междоменные линкеры VH/VL могут иметь длину в 12–15 аминокислот и состоять из остатков gly/ser. scFv-связывающие субъединицы могут быть заменены растворимыми VH-доменами или пептид-распознающими элементами или даже элементами тандемного scFv. Этот метод может быть также адаптирован для использования переменных доменов лямбда и/или константных доменов лямбда. И в этом случае, при таком формате, любые молекулы антитела в любом положении присоединения/связывания могут быть заменены молекулой, не являющейся антителом, например, молекулой, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, которая не содержит молекулу антитела.

На фиг. 17 проиллюстрирован другой вариант. На фиг. 17 представлена тандемная форма scFv, состоящая из первого N-концевого VL-домена, связанного своим C-концом с N-концом первого VH-домена посредством линкера из 12–15 аминокислот, богатого gly/ser, а за этим линкером расположен первый VH, связанный своим C-концом посредством линкера из 25–30 аминокислот на основе gly/ser/ala/thr с N-концом второго VL-домена. Второй VL-домен связан своим C-концом с N-концом второго VH-домена посредством линкера из 12–15 аминокислот на основе gly/ser. Каждый scFv распознает другой антиген-мишень, такой как костимулирующую T-клеточную молекулу и мишень,

связывающуюся с тканью. И в этом случае, при таком формате, любые молекулы антитела могут быть заменены молекулой, не являющейся антителом, например, молекулой, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, которая не содержит молекулу антитела.

На фиг. 18 проиллюстрирован другой вариант. На фиг. 18 представлен гибрид $F(ab')_2$ -scFv. Этот гибрид состоит из двух идентичных компонентов Fab, связанных посредством двух дисульфидных связей в нативной шарнирной области человеческого IgG1, находящейся у С-конца CH1-домена человеческого IgG. Домены CH2 и CH3 человеческого IgG1 отсутствуют. У С-конца тяжелых цепей 1 и 2 присутствуют два идентичных фрагмента scFv, связанных посредством линкера, богатого gly/ser/ala/thr, с С-концом шарнирной области человеческого IgG1. В указанной конфигурации, VH представляет собой N-концевой VH в каждом звене scFv и связан посредством линкера из 12–15 аминокислот, богатого gly/ser, с N-концом VL-домена. Альтернативная конфигурация может представлять собой N-конец–VL–линкер–VH–С-конец. При такой конфигурации, эта конструкция является биспецифичной и двухвалентной для каждой мишени. И в этом случае, при таком формате, любые молекулы антитела в любом положении присоединения/связывания могут быть заменены молекулой, не являющейся антителом, например, молекулой, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, которая не содержит молекулу антитела.

Используемый здесь термин «молекула CD39» означает полипептид, имеющий последовательность CD39, которая, как часть терапевтического соединения, является достаточной для фосфогидролиза АТФ в АМР. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула CD39 фосфогидролизует АТФ в АМР на уровне, эквивалентном, или по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% эквивалентном уровню природной молекулы CD39, например, CD39, от которой происходит молекула CD39. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула CD39 имеет последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100% идентична, или по существу, идентична природной молекуле CD39.

Может быть использована любая функциональная изоформа (с CD39 или другими обсуждаемыми здесь белками). Репрезентативной последовательностью CD39 является последовательность, имеющаяся в GenBank под рег.№ NP_001767.3, или зрелая форма, происходящая от нижеследующей последовательности:

```
MEDTKESNVKTFCSKNILAILGFSSIIAVIALAVGLTQNKALPENVKYGIVLDAG
SSHTSLYIYKWPAEKENDTGVVHQVEECRVKGPISKFVQKVNEIGIYLTDCMERAREV
IPRSQHQETPVYLGATAGMRLLRMESEELADRVLDVVERSLSNYPDFDQGARIITGQEEG
AYGWITINYLLGKFSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTFVPQNQTIESPDN
ALQFRLYGKDYNVYTHSFLCYGKDQALWQKLAKDIQVASNEILRDPCFHPGYKKVVN
VSDLYKTPCTKRFEMTLPFQQFEIQGIGNYQQCHQSILELFNTSYCPYSQCAFNGIFLPPL
QGDFGAFSAFYFVMKFLNLTSEKVSQEKVTEMMKKFCAQPWEEIKTSYAGVKEKYLSE
YCFSGTYILSLLLQGYHFTADSWENIHFIGKIQGS DAGWTLGYMLNLTNMIPAEQPLSTP
```

LSHSTYVFLMVLFSLVLFTVAIIIGLLIFHKPSYFWKDMV (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула CD39 содержит растворимую каталитически активную форму CD39, которая, как было обнаружено, присутствует в человеческой или мышинной сыворотке, см. например, «Metabolism of circulating ADP in the bloodstream is mediated via integrated actions of soluble adenylate kinase-1 and NTPDase1/CD39 activities», Yegutkin et al. FASEB J. 2012 Sep; 26(9):3875–83. Растворимый рекомбинантный фрагмент CD39 также описан в «Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39», Gayle, et al., J Clin Invest. 1998 May 1; 101(9):1851–1859.

Используемый здесь термин «молекула CD73» означает полипептид, имеющий последовательность CD73, которая, как часть терапевтического соединения, является достаточной для дефосфорилирования внеклеточного АМР в аденозин. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула CD73 дефосфорилирует внеклеточный АМР в аденозин на уровне, эквивалентном, или меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% эквивалентном уровню природной молекулы CD73, например, CD73, от которой происходит молекула CD73. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула CD73 имеет последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100% идентична, или по существу, идентична природной молекуле CD73. Репрезентативными последовательностями CD73 является последовательность, имеющаяся в GenBank AAH65937.1, 5'-нуклеотидаза, экто(CD73) [Homo sapiens] или зрелая форма, происходящая от нижеследующей последовательности:

MCPRAARAPATLLLALGAVLWPAAGAWELTILHTNDVHSRLEQTSSEDSSKCVN
ASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLLLDAGDQYQGTIWFTVYKGAEVAHFMNALRY
DAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKFPILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLPVGDEV
VGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDKCLKTLNVNKHIALGHSGFEMDKLIAQ
KVRGVDVVVGHSNTFLYTGNPPSKEVPAGKYPFIVTSDDGRKVPVVQAYAFGKYLGY
LKIEFDERGNVISHHGNPILLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQ
SCRFRECNMGNLICDAMINNNLRHADETFWNHVSMCILNGGGIRSPIDERNNGTITWEN
LAAVLFPFGGTFDLVQLKGSTLKKAFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDLSRKPGDR
VVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDEVYKVILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDIN
VVSTYISKMKVIYPAVEGRIKFSTGSHCHGSFSLIFLSLWAVIFVLYQ (SEQ ID NO: 2).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула CD73 содержит растворимую форму CD73, которая может высвобождаться из мембраны эндотелиальных клеток посредством протеолитического расщепления или гидролиза GPI-якоря под действием сдвигового напряжения, см., например, ссылку: Yegutkin G, Bodin P, Burnstock G. Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase и 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. Br J Pharmacol 2000; 129: 921–6. Описание функции CD73 см., Colgan et al., Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73), Purinergic Signalling, June 2006, 2:351.

Используемый здесь термин «молекула, связывающаяся с молекулой клеточной

поверхности» означает молекулу, обычно полипептид, который связывается, например, специфически связывается с молекулой клеточной поверхности на клетке, например, на иммуносупрессорной иммунной клетке, например, Treg. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула, связывающаяся с клеточной поверхностью, имеет достаточную последовательность природного лиганда молекулы клеточной поверхности, которая может специфически связываться с молекулой клеточной поверхности (лигандом молекулы клеточной поверхности). В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекулой, связывающейся с клеточной поверхностью, является молекула антитела, которая связывается, например, специфически связывается с молекулой клеточной поверхности.

Используемый здесь термин «донор–специфическая нацеливающая молекула» означает молекулу, например, молекулу антитела, которая, как компонент терапевтического соединения, обеспечивает локализацию терапевтического соединения преимущественно в имплантируемую донорскую ткань в отличие от ткани реципиента. Донор–специфическая нацеливающая молекула, как компонент терапевтического соединения, обеспечивает сайт–специфическую иммунологическую предпочтительность для трансплантируемой ткани, например, органа, взятого у донора.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, донор–специфическая нацеливающая молекула связывается с продуктом, например, полипептидным продуктом аллеля, присутствующего в локусе, но не присутствующего в локусе у индивидуума (реципиента). В некоторых вариантах осуществления изобретения, донор–специфическая нацеливающая молекула связывается с эпитопом на продукте, где указанный эпитоп не присутствует у индивидуума (реципиента).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, донор–специфическая нацеливающая молекула, как компонент терапевтического соединения, преимущественно связывается с мишенью или антигеном донора, например, обладает аффинностью связывания с мишенью донора, где указанная аффинность связывания с антигеном или тканью донора, например, по меньшей мере в 2, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 5000 или 10000 раз превышает аффинность связывания с антигеном или тканью индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения, донор–специфическая нацеливающая молекула имеет аффинность связывания с продуктом аллеля локуса, присутствующего в донорской ткани (но не присутствующего у индивидуума), где указанная аффинность связывания по меньшей мере в 2, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 5000 или 10000 раз превышает аффинность связывания с продуктом аллеля локуса, присутствующего у индивидуума (где указанный аллель не присутствует в донорской ткани). Аффинность терапевтического соединения, компонентом которого является донор–специфическая молекула, может быть оценена в клеточной суспензии, например, аффинность суспендированных клеток, имеющих такой аллель, сравнивают с аффинностью суспендированных клеток, не имеющих такого аллеля. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аффинность связывания с аллелем донорских клеток

составляет ниже 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аффинность связывания с аллелем донорских клеток составляет ниже 100 пМ, 50 пМ или 10 пМ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, специфичность к продукту донорского аллеля является достаточной, если донор–специфическая нацеливающая молекула связывается с иммуноингибирующим эффектором, и если: i) иммунная атака имплантированной ткани, например, как было определено гистологически путем оценки воспалительного ответа, числа инфильтрирующих эффекторных Т–клеток или функции органов в клиническом анализе, например, анализе на креатинин почек, была значительно снижена, например, по сравнению с атакой, наблюдаемой в другом аналогичном имплантате, но в отсутствии донор–специфической нацеливающей молекулы, связанной с иммуноингибирующим эффектором; и/или ii) иммунная функция у реципиента за пределами или на расстоянии от имплантированной ткани в значительной степени сохранялась. В некоторых вариантах осуществления изобретения, наблюдались один или более из нижеследующих признаков: при терапевтических уровнях терапевтического соединения, число лимфоцитов периферической крови не было значительно изменено, например, уровень Т–клеток составляет 25, 50, 75, 85, 90 или 95% от нормальных уровней, уровень В–клеток составляет 25, 50, 75, 85, 90 или 95% от нормальных уровней, и/или уровень гранулоцитов (PMN) составляет 25, 50, 75, 85, 90 или 95% от нормальных уровней, или уровень моноцитов составляет 25, 50, 75, 85, 90 или 95% от нормальных уровней; при терапевтических уровнях терапевтического соединения, пролиферативная функция *ex vivo* МКПК (моноклеарных клеток периферической крови) против непатологических релевантных антигенов, в основном, является нормальной или составляет 70, 80 или 90% от нормы; при терапевтических уровнях терапевтического соединения, вероятность развития или риск развития условно–патогенных инфекций и рака, ассоциированных с иммуносупрессией, почти не увеличивается по сравнению с нормой; или при терапевтических уровнях терапевтического соединения, вероятность развития или риск развития условно–патогенных инфекций и рака, ассоциированных с иммуносупрессией, в основном, меньше, чем это наблюдается в случае стандартного лечения или ненацеленной иммуносупрессии. В некоторых вариантах осуществления изобретения, донор–специфическая нацеливающая молекула содержит молекулу антитела, мишень–специфический связывающий полипептид или молекулу, связывающуюся с лигандом мишени.

Используемый здесь термин «эффектор» означает вещество, например, клетку или молекулу, например, растворимую молекулу или молекулу клеточной поверхности, которая опосредует иммунный ответ.

Используемый здесь термин «молекула, связывающаяся с лигандом эффектора», означает полипептид, который имеет достаточную последовательность природного противолганда эффектора, то есть, он может связываться с достаточной специфичностью и может служить в качестве молекулы, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта молекула связывается

с эффектором по меньшей мере с 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 95% аффинностью природного противолганда. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта последовательность по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100% идентична или, по существу, идентична последовательности природного противолганда эффектора.

Используемый здесь термин «молекула, специфически связывающаяся с эффектором, означает полипептид, который может связываться с достаточной специфичностью, то есть, он может служить в качестве молекулы, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, специфически связывающийся полипептид содержит молекулу, связывающуюся с лигандом эффектора.

Используемый здесь термин «повышенный риск» означает риск развития расстройства у индивидуума, где указанный индивидуум имеет в анамнезе одно или более расстройств или симптомов расстройства; биомаркер, ассоциированный с расстройством или симптомом расстройства, или имеет в семейном анамнезе расстройство или симптом этого расстройства.

Используемый здесь термин «функциональная молекула антитела против эффектора или ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки» означает молекулу антитела, которая, если она присутствует в качестве молекулы ICIM–связывающей/ICIM–модулирующей молекулы мультимеризованного терапевтического соединения, может связываться с эффекторной молекулой или с ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки и повышать активность эффекторной молекулы или ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула антитела против эффекторной молекулы или ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки, если она связывается в качестве мономера (или связывается в случае, если терапевтическое соединение не является мультимеризованным) с эффекторной молекулой или ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки, не ингибирует, в основном, не ингибирует, предотвращает связывание или, в основном, предотвращает связывание эндогенного противолганда ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки с ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула антитела против эффекторной молекулы или ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки, если она связывается в качестве мономера (или связывается в случае, если терапевтическое соединение не является мультимеризованным) с ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки, не повышает активность или, в основном, не повышает активность эффекторной или ингибирующей молекулы.

Используемый здесь термин «ICIM–связывающая/ICIM–модулирующая молекула» означает молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, которая, как часть терапевтического соединения, связывается с ингибирующей молекулой клеточной поверхности и повышает активность такой молекулы, например, ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки, например, PD–1, или

связывается с молекулой передачи клеточного сигнала или модулирует эту молекулу, например, связывается с FCRL, например, FCRL1–6, или связывается с молекулой и ингибирует молекулу, которая стимулирует иммунную функцию.

Используемый здесь термин «ПС–связывающая/ПС–модулирующая молекула» означает молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, которая, как часть терапевтического соединения, связывается с иммуносупрессорной иммунной клеткой. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ПС–связывающая/ПС–модулирующая молекула повышает число или концентрацию иммуносупрессорных иммунных клеток в сайте связывания.

Используемый здесь термин «ICSM–связывающая/ICSM–модулирующая молекула» означает молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, которая ингибирует иммуностимулирующий эффект стимулирующей, например, костимулирующей связывающей пары. Используемая стимулирующая или костимулирующая связывающая пара включает два члена: 1) молекулу на поверхности иммунной клетки; и 2) партнера по связыванию с клеточной молекулой, который может представлять собой дополнительную иммунную клетку или неиммунную клетку. Обычно, после связывания одного члена с другим, если выполняются все другие требования, то этот член, например, костимулирующая молекула, на поверхности иммунной клетки стимулирует иммунную клетку, что приводит к стимуляции иммунного ответа. В тех случаях, когда костимулирующая молекула и противоструктура костимулирующей молекулы экспрессируется на иммунных клетках, то может происходить двунаправленная активация обеих клеток. В одном из вариантов осуществления изобретения, ICSM–связывающая/ICSM–модулирующая молекула связывается с иммунной клеткой и повышает активность иммунной клетки, которая экспрессирует член связывающей пары. Так, например, эта молекула связывается с OX40 и повышает его активность. В другом варианте осуществления изобретения, ICSM–связывающая/ICSM–модулирующая молекула связывается с членом связывающей пары и повышает активность члена связывающей пары, который сам связывается с членом, экспрессируемым иммунной клеткой, например, связывается с OX40L и повышает ее активность. В любом случае достигается ингибирование стимуляции или костимуляции иммунной клетки. В одном из вариантов осуществления изобретения, ICSM–связывающая/ICSM–модулирующая молекула снижает число или активность иммуностимулирующих иммунных клеток в сайте связывания.

Используемый здесь термин «молекула мутеина IL–2» означает вариант IL–2, который связывается с высокой аффинностью с CD25 (альфа–цепью IL–2R) и с низкой аффинностью с другими компонентами, передающими сигнал IL–2R, CD122 (IL–2R–бета) и CD132 (IL–2R–гамма). Такая молекула мутеина IL–2 преимущественно активирует клетки Treg. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL–2, используемый отдельно или как компонент терапевтического соединения, активизирует Treg по меньшей мере в 2, 5, 10 или 100 раз выше, чем цитотоксические или эффекторные

Т-клетки. Репрезентативные молекулы мутеина IL-2 описаны в WO2010085495, WO2016/164937, US2014/0286898A1, WO2014153111A2, WO2010/085495, WO2016014428A2, WO2016025385A1 и US20060269515. Мутеины, раскрытые в этих документах, и включающие дополнительные домены, например, Fc-домен или другой домен, увеличивающий время полужизни, могут быть использованы в описанных здесь терапевтических соединениях и способах без указанных дополнительных доменов. В другом варианте осуществления изобретения, IC-связывающая/IC-модулирующая молекула содержит мутеин IL-2 или его активный фрагмент, который связан, например, соединен с другим полипептидом, например, с полипептидом, который увеличивает время полужизни *in vivo*, например, с константной областью иммуноглобулина или его мультимером или димером, например, AMG 592. В одном из вариантов осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит часть IL-2 AMG 592. В одном варианте, терапевтическое соединение содержит часть IL-2, но не содержит части иммуноглобулина AMG 592. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин не содержит Fc-область. Некоторые мутеины IL-2 были сконструированы так, чтобы они содержали Fc-область, поскольку было обнаружено, что такая область увеличивает время полужизни мутеина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, увеличенное время полужизни является необязательным для осуществления описанных и заявленных здесь способов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-область, присоединенная к мутеину IL-2, содержит мутации N297, такие как, но не ограничивающиеся ими, N297A. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-область, присоединенная к мутеину IL-2, не содержит мутацию N297, такую как, но не ограничивающуюся ими, N297A.

Используемый здесь термин «молекула лиганда ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки» означает полипептид, имеющий достаточную последовательность лиганда ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки, например, в случае молекулы PD-L1, достаточная последовательность PD-L1, если она присутствует как ICIM-связывающая/ICIM-модулирующая молекула мультимеризованного терапевтического соединения, может связываться с когнатной ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки и повышать ее активность, например, в случае молекулы PD-L1, она может связываться с PD-1 и повысить ее активность.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула лиганда ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки, например, молекула PD-L1, если она связывается в качестве мономера (или связывается в том случае, когда терапевтическое соединение является мультимеризованным) с ее когнатным лигандом, например, PD-1, не ингибирует или, по существу, не ингибирует или предотвращает связывание, или значительно предотвращает связывание эндогенного лиганда ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки с ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки. Так, например, в случае молекулы PD-L1, эта молекула

PD-L1 не ингибирует связывание эндогенного PD-L1 с PD-1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, лиганд ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки, если он связывается в качестве мономера с его когнатной ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки не повышает, или значительно не повышает активность ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки. Так, например, молекула PD-L1, если она связывается с PD-1, не повышает или значительно не повышает активность PD-1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула лиганда ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки имеет последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100% идентична или, по существу, идентична последовательности природного лиганда ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки.

Репрезентативными молекулами лиганда ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки являются молекула PD-L1, которая связывается с ингибирующей молекулой PD-1 иммунной контрольной точки, и в некоторых вариантах осуществления изобретения имеет последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100% идентична или, по существу, идентична последовательности природного PD-L1, например: молекула PD-L1, содержащая последовательность

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALI
VYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVY
RCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSD
HQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLA
HPPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET

(SEQ ID NO: 3), или ее активный фрагмент, где, в некоторых вариантах осуществления изобретения, активный фрагмент содержит остатки 19–290 последовательности PD-L1; молекула HLA-G, которая связывается с любой ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки KIR2DL4, LILRB1 и LILRB2, и в некоторых вариантах осуществления изобретения, имеет последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100% идентична или, по существу, идентична последовательности природной HLA-G. Репрезентативными последовательностями HLA-G являются, например, зрелая форма, представленная в последовательности, имеющейся в GenBank P17693.1 RecName: Full=антиген комплекса гистосовместимости HLA класса I, альфа-цепь G; AltName: Full=антиген HLA-G; AltName: Full=антиген G MHC класса I; Flags: предшественник, или в последовательности

MVVMAPRTLFLLLSGALTLTETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRIAMGYVD
DTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYN
QSEASSHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYALNEDLRSWTAADTAAQIS
KRKCEAANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLQRADPPKTHVTHHPVFDYEAT
LRCWALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTGFKWAAVVVPSGEEQRYT
CHVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPIMGIVA (SEQ ID NO: 4).

Используемый здесь термин «молекула противолиганда ингибирующей молекулы» означает полипептид, имеющий достаточную последовательность противолиганда ингибирующей молекулы, которая, если она присутствует в качестве ICIM–связывающей/ICIM–модулирующей молекулы мультимеризованного терапевтического соединения, может связываться с когнатной ингибирующей молекулой и повышать активность такой молекулы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула противолиганда ингибирующей молекулы, если она связывается в качестве мономера (или связывается, если терапевтическое соединение не является мультимеризованным) с ингибирующей молекулой, не ингибирует, значительно не ингибирует, предотвращает связывание или, в основном, предотвращает связывание эндогенного противолиганда ингибирующей молекулы с ингибирующей молекулой. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула противолиганда ингибирующей молекулы, если она связывается в качестве мономера (или связывается, если терапевтическое соединение не является мультимеризованным) с ингибирующей молекулой, не повышает активность или, в основном, не повышает активность ингибирующей молекулы.

Используемые здесь термины «идентичность последовательностей», «процент идентичности» и родственные термины означают сходство двух последовательностей, например, двух последовательностей нуклеиновой кислоты или двух аминокислотных или полипептидных последовательностей. Используемый здесь термин «по существу, идентичный», если он употребляется в отношении аминокислотной последовательности, означает, что первая аминокислотная последовательность содержит достаточное или минимальное число аминокислотных остатков, которые i) идентичны аминокислотным остаткам выравниваемой второй аминокислотной последовательности или ii) имеют консервативные замены, причем, первая и вторая аминокислотные последовательности могут иметь общий структурный домен и/или общую функциональную активность. Так, например, аминокислотные последовательности, содержащие общий структурный домен, имеют последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична эталонной последовательности, например, последовательности, представленной в настоящей заявке.

Используемый здесь термин «по существу, идентичный», если он употребляется в отношении нуклеотидной последовательности, означает, что первая последовательность нуклеиновой кислоты содержит достаточное или минимальное число нуклеотидов, которые идентичны нуклеотидам выравниваемой второй нуклеотидной последовательности, причем, первая и вторая нуклеотидные последовательности кодируют полипептид, имеющий общую функциональную активность, или кодируют общий структурный полипептидный домен или общую функциональную полипептидную активность. Так, например, нуклеотидные последовательности имеют последовательности, которые по меньшей мере приблизительно на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны эталонной последовательности,

например, последовательности, представленной в настоящей заявке.

Термин «функциональный вариант» означает полипептиды, которые имеют аминокислотную последовательность, по существу, идентичную природной последовательности, или кодируются, по существу, идентичными нуклеотидными последовательностями, и обладают одной или более активностями природной последовательности.

Вычисление гомологии или сходства последовательностей (эти термины используются здесь как синонимы) осуществляют следующим образом.

Для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновой кислоты, эти последовательности выравнивают для оптимального сравнения (например, в одну или обе первую и вторую аминокислотную последовательность или последовательности нуклеиновой кислоты могут быть введены пробелы для оптимального выравнивания, и не-гомологичные последовательности могут не учитываться при сравнении). В предпочтительном варианте осуществления изобретения, длина сравниваемой последовательности, выравниваемой для сравнения, составляет по меньшей мере 30%, предпочтительно, по меньшей мере 40%, более предпочтительно, по меньшей мере 50%, 60%, а еще более предпочтительно, по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 100% от длины эталонной последовательности. Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или нуклеотидов. Если положение в первой последовательности занято таким же аминокислотным остатком или нуклеотидом, как и соответствующее положение во второй последовательности, то это означает, что молекулы являются идентичными в этом положении (используемый здесь термин «идентичность» аминокислот или нуклеиновых кислот эквивалентен термину «гомология» аминокислот или нуклеиновых кислот).

Процент идентичности двух последовательностей зависит от числа идентичных положений этих последовательностей, числа пробелов и длины каждого пробела, которые должны быть введены для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Сравнение последовательностей и определение процента идентичности двух последовательностей может быть осуществлено с использованием математического алгоритма. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, процент идентичности двух аминокислотных последовательностей определяют с использованием алгоритма Needleman и Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:444–453), который был включен в программу GAP пакета программ GCG (имеющегося на сайте <http://www.gcg.com>) с использованием матрицы Blossum 62 или матрицы PAM250, и веса пробелов 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В еще одном предпочтительном варианте изобретения, процент идентичности двух нуклеотидных последовательностей определяют с использованием программы GAP пакета программ GCG (имеющегося на сайте <http://www.gcg.com>) с использованием матрицы NWSgapdna.CMP и веса пробелов 40, 50, 60, 70, или 80 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Особенно предпочтительной серией

параметров (и параметров, которые должны быть использованы, если это не оговорено особо) является оценочная матрица Blossum 62 со штрафом за пробел 12, штрафом за пробел–удлинение 4 и штрафом за пробел со сдвигом рамки считывания 5.

Процент идентичности двух аминокислотных или нуклеотидных последовательностей может быть определен с использованием алгоритма E. Meyers и W. Miller ((1989) CABIOS, 4: 11–17), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0) с использованием таблицы веса остатков PAM120, штрафа за длину пробела 12 и штрафа за пробел 4.

Описанные здесь последовательности нуклеиновой кислоты и белков могут быть использованы в качестве «запрашиваемой последовательности» для поиска последовательностей в общедоступных базах данных, например, для идентификации других членов семейств или родственных последовательностей. Такой поиск может быть осуществлен с использованием программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403–10. Поиск нуклеотидов в BLAST может быть осуществлен с использованием программы NBLAST, с весом=100, с длиной слова 12 для выявления нуклеотидных последовательностей, гомологичных, например, любой представленной здесь последовательности нуклеиновой кислоты. Поиск белков в BLAST может быть осуществлен с использованием программы XBLAST, с весом=50, с длиной слова 3 для выявления аминокислотных последовательностей, гомологичных последовательностям молекул белка, описанным в настоящей заявке. Для выравнивания с введением пробелов в целях сравнения может быть использована программа Gapped BLAST, описанная Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389–3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут быть использованы параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Используемый здесь термин «гибридуется в условиях низкой жесткости, умеренной жесткости, высокой жесткости или очень высокой жесткости» описывает условия гибридизации и промывки. Описание реакций гибридизации можно найти в руководстве Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1–6.3.6, которое вводится посредством ссылки. При этом могут быть применены любые водные и безводные методы, описанные в этом руководстве. Ниже приводятся следующие описанные здесь конкретные условия гибридизации: 1) условия гибридизации низкой жесткости в $6\times$ хлориде натрия/цитрате натрия (SSC) приблизительно при 45°C с последующими двумя промывками в $0,2\times$ SSC, 0,1% ДЧН по меньшей мере при 50°C (в условиях низкой жесткости, температура промывок может быть увеличена до 55°C); 2) условия гибридизации умеренной жесткости в $6\times$ SSC приблизительно при 45°C с последующими одной или более промывками в $0,2\times$ SSC, 0,1% ДЧН при 60°C; 3) условия гибридизации высокой жесткости в $6\times$ SSC приблизительно при 45°C с последующими одной или более промывками в $0,2\times$ SSC, 0,1% ДЧН при 65°C и предпочтительно, 4) условия гибридизации очень высокой жесткости в 0,5M фосфате натрия, 7% ДЧН при 65°C с последующими одной или более промывками в $0,2\times$ SSC, 1% ДЧН при 65°C.

Условия очень высокой жесткости (4) являются предпочтительными условиями и всегда должны быть использованы, если это не оговорено особо.

Следует отметить, что молекулы и соединения согласно вариантам осуществления изобретения могут иметь дополнительные консервативные замены или замены заменимых аминокислот, которые не оказывают значительного влияния на их функции.

Термин «аминокислота» охватывает все молекулы, независимо от того, являются ли они природными или синтетическими, и включают функциональную аминогруппу и кислотную функциональную группу и могут быть включены в полимер из природных аминокислот. Репрезентативными аминокислотами являются природные аминокислоты; их аналоги, производные и представители того же рода; аминокислотные аналоги, имеющие модифицированные боковые цепи, и все стереоизомеры любых вышеупомянутых аминокислот. Используемый здесь термин «аминокислота» включает оптические D- или L-изомеры и пептидомиметики. «Консервативной аминокислотной заменой» является замена, при которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, определены в литературе. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Молекула CD39, молекула CD73, молекула, связывающаяся с молекулой клеточной поверхности, донор-специфическая нацеливающая молекула, молекула, связывающаяся с лигандом эффектора, ICIM-связывающая/ICIM-модулирующая молекула, IC-связывающая/IC-модулирующая молекула, молекула лиганда ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки, молекула противолганда ингибирующей молекулы, SM-связывающая/SM-модулирующая молекула или ICSM-связывающая/ICSM-модулирующая молекула.

Используемый здесь термин «SM-связывающая/SM-модулирующая молекула» означает молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, которая, как часть терапевтического соединения, стимулирует иммуносупрессорное локальное микроокружение, например, благодаря присутствию близости от мишени вещества, которое ингибирует или минимизирует атаку мишени иммунной системой. В некоторых вариантах осуществления изобретения, SM-связывающая/SM-модулирующая молекула содержит молекулу или связывается с молекулой, которая ингибирует или минимизирует атаку мишени иммунной системой. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит SM-связывающую/SM-модулирующую молекулу, которая связывается с растворимым веществом и аккумулирует растворимое вещество,

например, эндогенное или экзогенное вещество, обладающее иммуносупрессорной функцией. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу, которая связывает и ингибирует, секвестрирует, разлагает или как–либо иначе нейтрализует вещество, например, растворимое вещество, а обычно эндогенное растворимое вещество, которое стимулирует иммунную атаку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу, которая включает иммуносупрессорное вещество, например, фрагмент белка, который, как известно, является иммуносупрессорным. Так, например, молекула, связывающаяся с эффекторной молекулой, связывается с веществом или включает вещество, например, молекулу CD39 или молекулу CD73, которая истощает компонент, стимулирующий функцию иммунной эффекторной клетки, например, АТР или АМР.

Используемый здесь термин «специфическая нацеливающая молекула» означает донор–специфическую нацеливающую молекулу или тканеспецифическую нацеливающую молекулу.

Используемый здесь термин «индивидуум» означает млекопитающее, например, человек. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуум представляет собой млекопитающее, не являющееся человеком, например, лошадь, собаку, кошку, корову, козу или свинью.

Используемый здесь термин «молекула, связывающаяся с лигандом мишени», означает полипептид, который имеет достаточную последовательность природного противوليганда лиганда мишени, то есть, он может связываться с лигандом мишени на ткани–мишени (например, донорской ткани или ткани–мишени индивидуума) с достаточной специфичностью и может служить в качестве специфической нацеливающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта молекула связывается с тканью или с клетками мишени по меньшей мере с 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 95% аффинностью природного противوليганда. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта последовательность по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100% идентична или, по существу, идентична последовательности природного противوليганда лиганда мишени.

Используемый здесь термин «сайт–мишень» означает сайт, содержащий молекулу, например, эпитоп, связанный с нацеливающей молекулой. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сайтом–мишенью является сайт, в котором достигается иммунологическая предпочтительность.

Используемый здесь термин «сайт–специфическая нацеливающая молекула» означает молекулу, например, молекулу антитела, которая, как компонент терапевтической молекулы, обеспечивает локализацию терапевтической молекулы преимущественно в ткани–мишени по сравнению с другой тканью индивидуума. Тканеспецифическая нацеливающая молекула, как компонент терапевтического

соединения, обеспечивает сайт-специфическую иммунологическую предпочтительность для ткани-мишени, например, в органе или ткани, которые подвергаются аутоиммунной атаке или могут подвергаться риску аутоиммунной атаки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, тканеспецифическая нацеливающая молекула связывается с продуктом, например, с полипептидным продуктом, который не присутствует за пределами ткани-мишени или присутствует на достаточно низких уровнях, а при терапевтических концентрациях терапевтической молекулы, неприемлемые уровни иммунной супрессии отсутствуют или, в основном, отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления изобретения, тканеспецифическая нацеливающая молекула связывается с эпитопом, который не присутствует за пределами или, в основном, не присутствует за пределами сайта-мишени.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, тканеспецифическая нацеливающая молекула, как компонент терапевтического соединения, преимущественно связывается с тканью-мишенью или с антигеном ткани-мишени, например, обладает аффинностью связывания с тканью-мишенью или с антигеном-мишенью, где указанная аффинность связывания с антигеном или тканью-мишенью, например, по меньшей мере в 2, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 5000 или 10000 раз превышает аффинность связывания с тканью или антигеном, не являющимися мишенью и находящимися за пределами ткани-мишени. Аффинность терапевтического соединения, компонентом которого является тканеспецифическая молекула, может быть оценена в клеточной суспензии, например, аффинность суспендированных клеток, имеющих такой антиген-мишень, сравнивают с аффинностью суспендированных клеток, не имеющих такого антигена-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аффинность связывания с клетками, несущими антиген-мишень, составляет ниже 10 нМ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, аффинность связывания с клетками, несущими антиген-мишень, составляет ниже 100 пМ, 50 пМ или 10 пМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, специфичность к антигену-мишени является достаточной, если тканеспецифическая нацеливающая молекула связывается с иммуноингибирующим эффектором, и если: i) иммунная атака ткани-мишени, например, как было определено гистологически путем оценки воспалительного ответа, числа инфильтрирующих эффекторных Т-клеток или функции органов в клиническом анализе, например, в анализе на креатинин почек, была значительно снижена, например, по сравнению с атакой, наблюдаемой в другом аналогичном имплантате, но в отсутствии тканеспецифической нацеливающей молекулы, связанной с иммуноингибирующим эффектором; и/или ii) иммунная функция у реципиента за пределами или на расстоянии от ткани-мишени в значительной степени сохранялась.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, наблюдались один или более из нижеследующих признаков: при терапевтических уровнях терапевтического соединения, число лимфоцитов периферической крови значительно не изменялось, например, уровень Т-клеток составляет 25, 50, 75, 85, 90 или 95% от нормальных уровней,

уровень В-клеток составляет 25, 50, 75, 85, 90 или 95% от нормальных уровней и/или уровень гранулоцитов (PMN) составляет 25, 50, 75, 85, 90 или 95% от нормальных уровней, или уровень моноцитов составляет 25, 50, 75, 85, 90 или 95% от нормальных уровней; при терапевтических уровнях терапевтического соединения, пролиферативная функция *ex vivo* МКПК (моноклеарных клеток периферической крови) против непатологических релевантных антигенов, в основном, является нормальной или составляет 70, 80 или 90% от нормы; при терапевтических уровнях терапевтического соединения, вероятность развития или риск развития условно-патогенных инфекций и рака, ассоциированных с иммуносупрессией, почти не увеличивается по сравнению с нормой; или при терапевтических уровнях терапевтического соединения, вероятность развития или риск развития условно-патогенных инфекций и рака, ассоциированных с иммуносупрессией, в основном, меньше, чем это наблюдается в случае стандартного лечения или ненацеленной иммуносупрессии. В некоторых вариантах осуществления изобретения, тканеспецифическая нацеливающая молекула содержит молекулу антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения, донор-специфическая нацеливающая молекула содержит молекулу антитела. мишень-специфический связывающий полипептид или молекулу, связывающуюся с лигандом мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, тканеспецифическая нацеливающая молекула связывается с продуктом или сайтом на продукте, которые присутствуют или экспрессируются исключительно или почти исключительно на ткани-мишени.

ICIM-связывающие/ICIM-модулирующие молекулы: молекулы, связывающиеся с эффектором/модулирующие эффектор, которые связываются с ингибирующими рецепторами

Описанные здесь способы и соединения относятся к терапевтическому соединению, имеющему молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор и включающую ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, которая непосредственно связывается с ингибирующим рецептором и активирует ингибирующий рецептор на поверхности иммунной клетки, что приводит, например, к снижению или элиминации или, в основном, к элиминации способности иммунной клетки опосредовать иммунную атаку. Связывание ICIM-связывающей/ICIM-модулирующей молекулы с нацеливающей молекулой стимулирует сайт-специфическое или локальное ингибирование иммунного клеточного ответа, например, на участке, по существу, ограниченном участком, имеющим сайты связывания с нацеливающей молекулой. Таким образом, по существу, сохраняется нормальная системная иммунная функция. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICIM-связывающая/ICIM-модулирующая молекула содержит молекулу противолганда ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки, например, природный лиганд или фрагмент природного лиганда (например, PD-L1 или HLA-G) ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICIM-связывающая/ICIM-модулирующая молекула содержит функциональную молекулу антитела, например,

функциональную молекулу антитела, включающую scFv–связывающий домен, который связывается с ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICIM–связывающая/ICIM–модулирующая молекула, содержащая, например, функциональную молекулу антитела или молекулу лиганда ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки, связывается с ингибирующим рецептором, но не предотвращает связывание природного лиганда ингибирующего рецептора с ингибирующим рецептором. В некоторых вариантах используется формат, при котором нацеливающая молекула связывается, например, присоединяется к ICIM–связывающей/ICIM–модулирующей молекуле, содержащей, например, домен scFv, и имеет такую конфигурацию, при которой, после связывания ингибирующего рецептора в растворе (например, в крови или в лимфе) (и предположительно, в мономерной форме), терапевтическая молекула: i) не активирует или, в основном, не активирует (например, активирует менее, чем 30, 20, 15, 10 или 5% от уровня, наблюдаемого в случае полностью активирующей молекулы) ингибирующий рецептор на иммунной клетке; и/или ii) не ингибирует или, в основном, не ингибирует (например, ингибирует менее, чем 30, 20, 15, 10 или 5% от уровня, наблюдаемого в случае полностью ингибирующей молекулы) ингибирующий рецептор на иммунной клетке. Молекула–кандидат может быть оценена на ее агонистическую или неагонистическую активность по ее способности повышать или снижать иммунный ответ в клеточном анализе *in vitro*, где мишень не экспрессируется, например, с помощью анализа на основе MLR (смешанной реакции лимфоцитов).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICIM–связывающие/ICIM–модулирующие молекулы–кандидаты могут снижать, полностью или значительно элиминировать системную иммуносупрессию и системную иммунную активацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающий домен терапевтического соединения, если он связывается с мишенью, служит для кластеризации или мультимеризации терапевтического соединения на поверхности ткани, где желательна иммунная защита. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICIM–связывающая/ICIM–модулирующая молекула, например, ICIM–связывающая/ICIM–модулирующая молекула, содержащая домен scFv, должна иметь кластеризованное или мультимерное состояние для доставки агонистического и иммуносупрессорного сигнала или повышенных уровней такого сигнала в локальные иммунные клетки. Терапевтическое соединение этого типа может обеспечивать, например, локальную иммунную супрессию, но при этом, не влиять или существенно не влиять на системную иммунную функцию. То есть, иммунная супрессия локализуется где это необходимо, в отличие от системной супрессии, и не локализуется на участке или в ткани конкретного типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, после связывания с мишенью, например, с органом, тканью или клеткой–мишенью определенного типа, терапевтическое соединение покрывает такую мишень, например, орган, ткань или клетку–мишень определенного типа. Если лимфоциты кровотока попытаются связаться с мишенью и

разрушить ее, то такое терапевтическое соединение будет «отключать» сигнал только на участке аккумуляции терапевтического соединения или, в основном, на этом участке.

Терапевтическое соединение–кандидат может быть оценено на его способность связываться, например, специфически связываться с мишенью, например, с помощью ELISA, клеточного анализа или поверхностного плазмонного резонанса. Это свойство должно быть, в основном, максимизировано, поскольку оно опосредует сайт–специфичность и локальную природу иммунологической предпочтительности. Терапевтическое соединение–кандидат может быть оценено на способность ингибировать иммунную клетку при ее связывании с мишенью, например, с помощью клеточного анализа на активность. Это свойство должно быть, в основном, максимизировано, поскольку оно опосредует сайт–специфичность и локальную природу иммунологической предпочтительности. Уровень ингибирования, достигаемый с использованием терапевтического соединения–кандидата в мономерной (или несвязанной) форме, может быть оценен, например, с помощью клеточного анализа на активность. Это свойство должно быть, в основном, минимизировано, поскольку оно опосредует системное ингибирование иммунной системы. Уровень антагонистической активности ингибирующей молекулы клеточной поверхности, например, ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки, достигаемый с использованием терапевтического соединения–кандидата в мономерной (или несвязанной) форме, может быть оценен, например, с помощью клеточного анализа на активность. Это свойство должно быть, в основном, минимизировано, поскольку оно опосредует системную нежелательную активацию иммунной системы. Вообще говоря, эти свойства должны быть выбраны и сбалансированы так, чтобы они обеспечивали достаточно надежную сайт–специфическую иммунологическую предпочтительность в отсутствии каких–либо неприемлемых уровней сайт–неспецифической агонистической или антагонистической активности ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки.

Репрезентативные ингибирующие молекулы иммунной контрольной точки

Репрезентативные ингибирующие молекулы (например, ингибирующую молекулу иммунной контрольной точки)(вместе с их противוליгандами) можно найти в таблице 1. В этой таблице перечислены молекулы, с которыми могут связываться репрезентативные ICIM–связывающие молекулы.

Таблица 1: Ингибирующие молекулы клеточной поверхности, например, ингибирующие молекулы иммунной контрольной точки (столбец А), противוליганды (столбец В) и типы клеток, на которые они влияют (столбец С).		
А	В	С
PD–1	PD–L1, PD–L2	Т–клетки, В–клетки
Щелочная фосфатаза		
В7–Н3	Неизвестны	Т–клетки
В7–Н4	Нейрофилин 1, Нейрофилин 2,	Т–клетки

	Плексин 4А	
BTLA	HVEM	Т–клетки, В–клетки
CTLA–4	CD80, CD86	Т–клетки
IDO1	Триптофан	Лимфоциты
TDO2	Триптофан	Лимфоциты
KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR3DL1, KIR3DL2	МНС HLA класса I	NK–клетки
LAG3	МНС HLA класса I II	Т–клетки
TIM–3	Галектин–9	Т–клетки
VISTA	Неизвестны	Т–клетки, миелоидные клетки
TIGIT	CD155	Т–клетки
KIR2DL4	HLA–G	NK–клетки
LILRB1	HLA–G	Т–клетки, NK–клетки, В– клетки, моноциты, дендритные клетки
LILRB2	HLA–G	Моноциты, дендритные клетки, нейтрофилы, некоторые опухолевые клетки
NKG2A	Неклассические гликопротеины МНС класса I	Т–клетки, NK–клетки
FCRL1–6	FCRL1–2, неизвестен, FCRL4=IgA FCRL5=IgG FCRL6=МНС класса II	В–клетки
	Бутирофилины, например, BTN1A1, BTN2A2, BTNL2, BTNL1, BTNL8	Модуляция иммунных клеток

Путь PD–L1/PD–1

Белок запрограммированной клеточной гибели 1 (часто обозначаемый PD–1) представляет собой рецептор клеточной поверхности, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов. PD–1 экспрессируется на Т–клетках и на клетках других типов, включая, но не ограничиваясь ими, В–клетки, миелоидные клетки, дендритные клетки, моноциты, регуляторные Т–клетки, iNK–Т–клетки. PD–1 связывается с двумя лигандами,

PD-L1 и PD-L2, и представляют собой ингибирующую молекулу иммунной контрольной точки. Связывание с конгатным лигандом, PD-L1 или PD-L2, если оно рассматривается в контексте связывания нагруженного антигеном MCH с Т-клеточным рецептором на Т-клетке, минимизирует или предотвращает активацию и функционирование Т-клеток. Ингибирующий эффект PD-1 может включать стимуляцию апоптоза (запрограммированную клеточную гибель) антигенспецифических Т-клеток в лимфоузлах и снижение апоптоза регуляторных Т-клеток (супрессорных Т-клеток).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, которая активирует ингибирование PD-1. ICIM-связывающая/ICIM-модулирующая молекула может включать молекулу противолиганда ингибирующей молекулы, например, содержащую фрагмент лиганда PD-1 (например, фрагмент PD-L1 или PD-L2) или другую молекулу, например, функциональную молекулу антитела, содержащую, например, домен scFv, который связывается с PD-1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит нацеливающую молекулу, которая преимущественно связывается с донорным антигеном, не присутствует или присутствует на значительно более низких уровнях у индивидуума, например, с донорным антигеном в Таблице 2, и локализуется в донорской ткани трансплантата у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта молекула не связывается или, в основном, не связывается с другими тканями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение может включать нацеливающую молекулу, которая является специфичной к HLA-A2 и специфически связывается с донорской тканью аллотрансплантата, но не связывается или, в основном, не связывается с тканями хозяина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, например, молекулу противолиганда ингибирующей молекулы, например, содержащую фрагмент лиганда PD-1 (например, фрагмент PD-L1 или PD-L2) или другую молекулу, например, функциональную молекулу антитела, содержащую, например, домен scFv, который связывается с PD-1, а поэтому терапевтическое соединение, например, при его связывании с мишенью, активирует PD-1. Терапевтическое соединение нацелено на аллотрансплантат и обеспечивает докальную иммунологическую предпочтительность в этом аллотрансплантате.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит нацеливающую молекулу, которая преимущественно связывается с антигеном Таблицы 3, и локализуется в мишени у индивидуума, например, у индивидуума, страдающего аутоиммунным расстройством, например, аутоиммунным расстройством, указанным в Таблице 3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта молекула не связывается или, в основном, не связывается с другими тканями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, например, молекулу противолиганда

ингибирующей молекулы, например, содержащую фрагмент лиганда PD-1 (например, фрагмент PD-L1 или PD-L2) или другую молекулу, например, функциональную молекулу антитела, содержащую, например, домен scFv, который связывается с PD-1, а поэтому терапевтическое соединение, например, при его связывании с мишенью, активирует PD-1. Терапевтическое соединение нацелено на ткань индивидуума, подвергаемую аутоиммунной атаке, и обеспечивает докальную иммунологическую предпочтительность в этой ткани.

PD-L1 и PD-L2 или происходящие от них полипептиды могут способствовать образованию ICIM-связывающих молекул-кандидатов. Однако, в мономерной форме, например, если терапевтическое соединение циркулирует в крови или в лимфе, то эта молекула может давать нежелательный эффект ингибирования пути PD-L1/PD-1, и может активировать путь PD-1 только при кластеризации или мультимеризации на поверхности мишени, например, органа-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, включающую функциональную молекулу антитела, например, домен scFv, который является инертным или, в основном, инертным для пути PD-1 в растворимой форме, но активирует и запускает ингибирующий сигнал, если он мультимеризуется (посредством нацеливающей молекулы) на поверхности ткани.

Путь HLA-G: KIR2DL4/LILRB1/LILRB2

KIR2DL4, LILRB1 и LILRB2 представляют собой ингибирующие молекулы, присутствующие на Т-клетках, NK-клетках и миелоидных клетках. HLA-G представляет собой противוליганд для каждой из них.

KIR2DL4 также известна как CD158D, G9P, KIR-103AS, KIR103, KIR103AS, KIR, KIR-2DL4, рецептор, подобный иммуноглобулину клеток-киллеров, и имеет два домена Ig и длинный цитоплазматический хвост 4. LILRB1 также известна как LILRB1, CD85J, ILT-2, ILT2, LIR-1, LIR1, MIR-7, MIR7, PIR-B, PIRB, рецептор B1, подобный иммуноглобулину лейкоцитов. LILRB2 также известна как CD85D, ILT-4, LIR-2, LIR2, MIR-10, MIR10 и ILT4.

Терапевтическое соединение, содержащее молекулу HLA-G, может быть использовано для передачи ингибирующих сигналов в иммунную клетку, содержащую любую из KIR2DL4, LILRB1 и LILRB2, например, посредством мультимеризованных молекул терапевтического соединения, содержащих молекулу HLA-G, что тем самым будет обеспечивать сайт-специфическую иммунологическую предпочтительность.

Терапевтическое соединение, содержащее агонистическую молекулу антитела против KIR2DL4, LILRB1 или LILRB2, может быть использовано для передачи ингибирующих сигналов в иммунную клетку, содержащую любую из KIR2DL4, LILRB1 и LILRB2.

HLA-G доставляет ингибирующий сигнал только в случае мультимеризации, например, экспрессии на поверхности клетки или конъюгирования на поверхности сферы. В некоторых вариантах осуществления изобретения описано терапевтическое соединение,

содержащее молекулу HLA-G, где указанное терапевтическое соединение не мультимеризуется в растворе (или не мультимеризуется в степени, достаточной для достижения значимых уровней активации ингибирующей молекулы). Использование молекул HLA-G, которые минимизируют мультимеризацию в растворе, будет минимизировать системную активацию иммунных клеток и нежелательную иммунную супрессию.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что HLA-G, вероятно, не является эффективной для ингибирования, если только она не является мультимеризованной, и что связывание терапевтического соединения с мишенью посредством нацеливающей молекулы приводит к мультимеризации ICIM-связывающей молекулы, и что мультимеризованная ICIM-связывающая молекула связывается с ингибирующими молекулами и кластеризует ингибирующие молекулы на поверхности иммунной клетки, что, тем самым опосредует передачу негативного сигнала, который ингибирует иммунную клетку. Таким образом, инфильтрирующие иммунные клетки, действие которых направлено на повреждение ткани-мишени, включая антигенпрезентирующие клетки и другие миелоидные клетки, NK-клетки и Т-клетки, ингибируются.

Хотя молекулы HLA-G минимизируют антагонистическое действие, то, в случае, если желательной является мономерная форма, избыток LILRB1 и LILRB2 будет минимизировать влияние на системный эффект даже при некотором антагонистическом действии этой мономерной формы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, включающую молекулу HLA-G, например, в изоформе, не содержащей B2M (например, HLA-G5), см. Carosella et al., *Advances in Immunology*, 2015, 127:33. В формате, не содержащем B2M, HLA-G преимущественно связывается с LILRB2.

Подходящими последовательностями для конструирования молекул HLA-G являются молекулы GenBank P17693.1 RecName: Full=антиген комплекса гистосовместимости HLA класса I, альфа-цепь G; AltName: Full=антиген HLA-G; AltName: Full=антиген G MHC класса I; Flags: предшественник, или

MVVMAPRTLFLLLSGALTLTETWAGSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRFIAMGYVD
DTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKANAQTDRMNLQTLRGYYN
QSEASSHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYALNEDLRSWTAADTAAQIS
KRKCEAANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLQRADPPKTHVTNHPVFDYEAT
LRCWALGFYP AEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTQKWA AVVVPSGEEQRYT
CHVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPIMGIVAGLVVLA AVVTGA AVAVLWRKKSSD
(SEQ ID NO: 5). Молекула-кандидат HLA-G может быть протестирована на возможность ее применения в способах и соединениях, например, методами, аналогичными методом, описанным в «Synthetic HLA-G proteins for therapeutic use in transplantation» LeMaoult et al., 2013 *The FASEB Journal* 27:3643.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит нацеливающую молекулу, которая преимущественно связывается с донорным антигеном, не присутствует или присутствует на значительно более низких уровнях у индивидуума, например, с донорным антигеном, указанным в Таблице 2, и локализуется в донорской ткани трансплантата у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта молекула не связывается или, в основном, не связывается с другими тканями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение может включать нацеливающую молекулу, которая является специфичной к HLA-A2 и специфически связывается с донорским аллотрансплантатом, но не связывается с тканями хозяина и объединена с ICIM-связывающей/ICIM-модулирующей молекулой, которая содержит молекулу HLA-G, связывающуюся с KIR2DL4, LILRB1 или LILRB2, а поэтому терапевтическое соединение, например, при его связывании с мишенью, активирует KIR2DL4, LILRB1 или LILRB2. Терапевтическое соединение нацелено на аллотрансплантат и обеспечивает докальную иммунологическую предпочтительность в этом аллотрансплантате.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит нацеливающую молекулу, которая преимущественно связывается с тканеспецифическим антигеном, например, антигеном, указанным в Таблице 3, и локализуется в сайте-мишени у индивидуума, например, у индивидуума, страдающего аутоиммунным расстройством, например, аутоиммунным расстройством, указанным в Таблице 3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта молекула не связывается или, в основном, не связывается с другими тканями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, которая содержит молекулу HLA-G, связывающуюся с KIR2DL4, LILRB1 или LILRB2, в результате чего терапевтическое соединение, например, при его связывании с мишенью, активирует KIR2DL4, LILRB1 или LILRB2. Терапевтическое соединение нацелено на ткань индивидуума, подвергаемую аутоиммунной атаке, и обеспечивает докальную иммунологическую предпочтительность в этой ткани.

Очевидно, что можно сконструировать стабильный и растворимый гибридный белок HLA-G-B2M, который может также связываться с LILRB1. Так, например, кристаллическая структура HLA-G была определена с использованием мономеров HLA-G/B2M (Clements et al. 2005 PNAS 102:3360).

Семейство FCRL

FCRL-6, в основном, ингибирует активацию или функцию В-клеток. Эти трансмембранные гликопротеины типа 1 состоят из различных комбинаций иммуноглобулин-подобных доменов 5 типов, где каждый белок состоит из 3–9 доменов, и во всех белках FCRL отсутствуют какие-либо отдельные домены консервативного типа. В основном, экспрессия FCRL ограничивается лимфоцитами, причем, первичная экспрессия наблюдается в В-лимфоцитах. Вообще говоря, функция FCRL заключается в подавлении

активации В-клеток.

ICIM–связывающая/ICIM–модулирующая молекула может содержать агонистическую молекулу анти–BCMA антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит молекулу анти–FCRL антитела и молекулу антитела против В–клеточного рецептора (BCR). Не ограничиваясь какой–либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что терапевтическое соединение, содержащее молекулы антитела с обеими специфичностями, вероятно, будет способствовать тесному взаимодействию FCRL с BCR и ингибировать передачу сигналов BCR.

Бутирофилины и бутирофилин–подобные молекулы

Молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, может содержать агонист или антагонист бутирофилина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит агонистическую или функциональную молекулу BTN1A1, молекулу BTN2A2, молекулу BTNL2 или молекулу BTNL1.

Используемый здесь термин функциональная молекула BTNXi (где Xi=1A1, 2A2, L2 или L1) означает полипептид, имеющий достаточную последовательность BTNXi, которая как часть терапевтического соединения, ингибирует Т–клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула BTNXi имеет последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100% идентична или, по существу, идентична последовательности природного бутирофилина или бутирофилин–подобной молекулы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, представляет собой антагонистическую молекулу BTNL8.

Используемый здесь термин «антагонистическая молекула BTNL8» означает полипептид, имеющий достаточную последовательность BTNL8, которая как часть терапевтического соединения, ингибирует активацию, пролиферацию или секрецию цитокинов покоеющимися Т–клетками. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула BTNL8 имеет последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100% идентична или, по существу, идентична последовательности природного бутирофилина.

ПС–связывающие/ПС–модулирующие молекулы: молекулы, связывающиеся с эффектором/модулирующие эффектор, которые обеспечивают рекрутинг иммуносупрессорных Т–клеток

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, например, ПС–связывающую/ПС –модулирующую молекулу, которая связывает, активирует или сохраняет иммуносупрессорные клетки, например, иммуносупрессорные Т–клетки в сайте, опосредуемом нацеливающей молекулой, что способствует сообщению сайт–

специфической иммунологической предпочтительности. ИС–связывающая/ИС–модулирующая молекула, например, ИС–связывающая/ИС–модулирующая молекула, содержащая молекулу антитела, включающую, например, scFv–связывающий домен, связывается с иммуносупрессорными клетками определенных типов, например, с Treg, например, Foxp3⁺–CD25⁺–Treg. Толерантность органов, тканей или клеток конкретного типа ассоциируется с чрезмерным увеличением Treg рядом с органом–мишенью и с инфильтрацией этих клеток в орган–мишень; а в некоторых вариантах, описанные здесь способы и соединения синтетически воссоздают и имитируют такое физиологическое состояние. После аккумуляции Treg создается иммуносупрессорное микроокружение, служащее для защиты представляющего интерес органа от иммунной системы.

GARP–связывающие молекулы как молекула, нацеливающая на Treg и TGFB

GARP представляет собой мембранный рецептор белка для латентного TGF–бета, экспрессируемого на поверхности активированных Treg (Tran et al. 2009 PNAS 106: 13445 и Wang et al. 2009 PNAS 106: 13439). В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит ИС–связывающую молекулу, которая связывается с одной или более клетками, экспрессирующими GARP и растворимый GARP, такими как активированные человеческие Treg, и нацеливающую молекулу, которая доставляет терапевтическое соединение в представляющую интерес ткань–мишень. ИС–связывающая/ИС–модулирующие молекулы, которые содержат GARP–связывающую молекулу, включают ИС–связывающую/ИС–модулирующую молекулу, содержащую молекулу анти–GARP антитела, например, домен анти–GARP scFv. Не ограничиваясь какой–либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что терапевтическое соединение, содержащее GARP–связывающую молекулу, вероятно, эффективно аккумулирует GARP–экспрессирующие Treg в сайте, который является мишенью для нацеливающей молекулы терапевтического соединения, например, в трансплантате или на участке повреждения органа. И в этом случае, не ограничиваясь какой–либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что терапевтическое соединение, содержащее GARP–связывающую молекулу, вероятно, также эффективно аккумулирует растворимый GARP на участке повреждения органа и служит для связывания и активации TGFB1, иммуносупрессорного цитокина в локальном участке (Fridrich et al. 2016 PLoS One 11:e0153290; doi: 10.1371/journal.pone.0153290 и Hahn et al. 2013 Blood 15:1182). Таким образом, молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, которая содержит GARP–связывающую молекулу, может действовать как ИС–связывающая/ИС–модулирующая молекула или SM–связывающая/SM–модулирующая молекула.

CTLA4 как молекула, нацеливающая на Treg и осуществляющая сайленсинг эффекторных Т–клеток

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, например, содержит молекулу антитела, например, домен scFv, который связывается с CTLA4, экспрессируемым на поверхности Treg. Терапевтическая молекула аккумулирует или сохраняет CTLA4⁺–Treg в сайте–мишени с

последующей локальной иммуносупрессией.

Хотя CTLA4 экспрессируется, в основном, на Treg, однако, он также экспрессируется и на активированных Т-клетках. Терапевтическое соединение, содержащее молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, например, анти-CTLA4 антитело или функциональное анти-CTLA4 антитело, может ингибировать экспрессию CTLA4 Т-клетками. Таким образом, в терапевтическом соединении, содержащем молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, которая связывается с CTLA4, эффекторная молекула может также действовать как ICIM-связывающая/ICIM-модулирующая молекула.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула, связывающаяся с анти-CTLA4 антителом, не обладает ни антагонистическим, ни агонистическим действием, если она присутствует в мономерной форме, и обладает только агонистическим действием, если она кластеризуется или мультимеризуется после связывания с мишенью.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что связывание терапевтического соединения с мишенью посредством нацеливающей молекулы, вероятно, приводит к мультимеризации терапевтического соединения. В случае Т-клеток памяти и активированных Т-клеток, CTLA4, связанный с молекулой терапевтического соединения, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, кластеризуется и ингибирует сигнал посредством связывания с CTLA4, экспрессируемым клетками памяти и активированными Т-клетками.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула, связывающаяся с анти-CTLA4 антителом, не обладает ни антагонистическим, ни агонистическим действием, если она присутствует в мономерной форме, и обладает только агонистическим действием, если она кластеризуется или мультимеризуется после связывания с мишенью.

Молекулы мутеина IL-2: Молекулы, которые связываются с рецептором IL-2 и активируют Treg

Молекулы мутеина IL-2, которые преимущественно способствуют размножению или стимуляции клеток Treg (по сравнению с цитотоксическими Т-клетками), могут быть использованы в качестве IC-связывающей/IC-модулирующей молекулы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, IC-связывающая/IC-модулирующая молекула содержит молекулу мутеина IL-2. Используемый здесь термин «молекула мутеина IL-2» или «мутеин IL-2» означает вариант IL-2, который преимущественно активирует клетки Treg. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула мутеина IL-2, используемая отдельно или как компонент терапевтического соединения, активирует Treg по меньшей мере в 2, 5, 10 или 100 раз сильнее, чем цитотоксические Т-клетки. Подходящий анализ для оценки предпочтительной активации клеток Treg можно найти в патенте США No. 9580486, например, в примерах 2 и 3, или в WO2016014428, например, в примерах 3, 4 и 5, которые

включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Последовательность зрелого IL-2 представляет собой:

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT
FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP
RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFC
QSIISTLT (последовательность зрелого IL-2) (SEQ ID NO: 6)

Незрелая последовательность IL-2 может быть представлена как:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDL
QMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEL
LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTF
MCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT (SEQ ID NO: 15).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ИС-связывающая/ИС-модулирующая молекула содержит мутеин IL-2 или его активный фрагмент, связанный с другим полипептидом, например, присоединенный к другому полипептиду, например, полипептиду, который увеличивает время полужизни *in vivo*, например, к константной области иммуноглобулина или его мультимера или димера.

Молекула мутеина IL-2 может быть получена путем мутации одного или более остатков IL-2. Неограничивающие примеры мутеинов IL-2 можно найти в WO2016/164937, US9580486, US7105653, US9616105, US9428567, US2017/0051029, US2014/0286898A1, WO2014153111A2, WO2010/085495, WO2016014428A2, WO2016025385A1, и US20060269515, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, аланин в положении 1 вышеуказанной последовательности является делетированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула мутеина IL-2 содержит замену цистеина на серин в положении 125 зрелой последовательности IL-2. Другие комбинации мутаций и замен, которые присутствуют в молекулах мутеина IL-2, описаны в US20060269515, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления изобретения, цистеин в положении 125 также заменен валином или аланином. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула мутеина IL-2 содержит замену V91K. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула мутеина IL-2 содержит замену N88D. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула мутеина IL-2 содержит замену N88R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула мутеина IL-2 содержит замену H16E, D84K, V91N, N88D, V91K или V91R в любых их комбинациях. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эти молекулы мутеина IL-2 также содержат замену в положении 125 как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула мутеина IL-2 содержит одну или более замен, выбранных из группы, состоящей из T3N, T3A, L12G, L12K, L12Q, L12S, Q13G, E15A, E15G, E15S, H16A, H16D, H16G, H16K, H16M, H16N, H16R, H16S, H16T, H16V, H16Y, L19A, L19D, L19E, L19G, L19N,

L19R, L19S, L19T, L19V, D20A, D20E, D20H, D20I, D20Y, D20F, D20G, D20T, D20W, M23R, R81A, R81G, R81 S, R81T, D84A, D84E, D84G, D84I, D84M, D84Q D84R, D84S, D84T, S87R, N88A, N88D, N88E, N88I, N88F, N88G, N88M, N88R, N88S, N88V, N88W, V91D, V91E, V91G, V91 S, I92K, I92R, E95G и Q126. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотная последовательность молекулы мутеина IL-2 отличается от аминокислотной последовательности, представленной зрелой последовательностью IL-2, заменой C125A или C125S и одной заменой, выбранной из T3N, T3A, L12G, L12K, L12Q L12S, Q13G, E15A, E15G, E15S, H16A, H16D, H16G, H16K, H16M, H16N, H16R, H16S, H16T, H16V, H16Y, L19A, L19D, L19E, L19G, L19N, L19R, L19S, L19T, L19V, D20A, D20E, D20F, D20G, D20T, D20W, M23R, R81A, R81G, R81S, R81T, D84A, D84E, D84G, D84I, D84M, D84Q, D84R, D84S, D84T, S87R, N88A, N88D, N88E, N88F, N88I, N88G, N88M, N88R, N88S, N88V, N88W, V91D, V91E, V91G, V91S, I92K, I92R, E95G, Q126I, Q126L и Q126F. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотная последовательность молекулы мутеина IL-2 отличается от аминокислотной последовательности, представленной зрелой последовательностью IL-2, заменой C125A или C125S и одной заменой, выбранной из D20H, D20I, D20Y, D20E, D20G, D20W, D84A, D84S, H16D, H16G, H16K, H16R, H16T, H16V, I92K, I92R, L12K, L19D, L19N, L19T, N88D, N88R, N88S, V91D, V91G, V91K и V91S. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутации N88R и/или D20H.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула мутеина IL-2 содержит мутацию полипептидной последовательности в положении, выбранном из группы, состоящей из аминокислоты 30, аминокислоты 31, аминокислоты 35, аминокислоты 69 и аминокислоты 74. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутацией в положении 30 является N30S. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутацией в положении 31 является Y31H. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутацией в положении 35 является K35R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутацией в положении 69 является V69A. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутацией в положении 74 является Q74P. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин содержит мутацию V69A, мутацию Q74P, мутацию N88D или N88R, и одну или более мутаций L53I, L56I, L80I или L118I. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин содержит мутацию V69A, мутацию Q74P, мутацию N88D или N88R, и мутацию L на I, выбранную из группы, состоящей из мутаций: L53I, L56I, L80I или L118I. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию V69A, Q74P, N88D или N88R и мутацию L53I. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию V69A, Q74P, N88D или N88R и мутацию L56I. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию V69A, Q74P, N88D или N88R и мутацию L80I. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию V69A, Q74P, N88D или N88R и мутацию L118I. Как описано в настоящей заявке, мутеины могут также содержать мутацию C125A

или C125S.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула мутеина IL-2 содержит замену, выбранную из группы, состоящей из: N88R, N88I, N88G, D20H, D109C, Q126L, Q126F, D84G или D84I по сравнению с описанной выше зрелой последовательностью человеческого IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула мутеина IL-2 содержит замену D109C и одну или обе замены N88R и C125S. В некоторых вариантах осуществления изобретения, цистеин, который присутствует в молекуле мутеина IL-2 в положении 109, присоединен к молекуле полиэтиленгликоля, где молекула полиэтиленгликоля имеет молекулярную массу от 5 до 40 кДа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, любые описанные здесь замены присутствуют в комбинации с заменой в положении 125. Такой заменой может быть замена C125S, C125A или C125V.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, помимо описанных здесь замен или мутаций, мутеин IL-2 имеет замену/мутацию в одном или более положениях 73, 76, 100 или 138, соответствующих SEQ ID NO: 15, или в одном или более положениях 53, 56, 80 или 118, соответствующих SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию в положениях 73 и 76; 73 и 100; 73 и 138; 76 и 100; 76 и 138; 100 и 138; 73, 76 и 100; 73, 76, и 138; 73, 100 и 138; 76, 100 и 138; или в каждом из положений 73, 76, 100 и 138, которое соответствует SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию в положениях 53 и 56; 53 и 80; 53 и 118; 56 и 80; 56 и 118; 80 и 118; 53, 56, и 80; 53, 56 и 118; 53, 80 и 118; 56, 80 и 118; или в каждом из положений 53, 56, 80 и 118, которые соответствуют SEQ ID NO: 6. Поскольку IL-2 может быть присоединен к другим белкам или связан с другими белками, используемыми в настоящей заявке, то термин «соответствует упомянутому SEQ ID NO: 6 или 15» означает что, последовательности должны быть выровнены с использованием параметров по умолчанию для компьютерной программы по выравниванию, такой как компьютерная программа, которая может быть использована и имеется в web-сайте NCBI. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутацией является замена лейцина на изолейцин. Таким образом, мутеин IL-2 может содержать один или более изолейцинов в положениях 73, 76, 100 или 138, которые соответствуют SEQ ID NO: 15, или в одном или более положениях 53, 56, 80 или 118, которые соответствуют SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин содержит мутацию в L53, которое соответствует SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин содержит мутацию в L56, которое соответствует SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин содержит мутацию в L80, которое соответствует SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин содержит мутацию в L118, которое соответствует SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутацией является замена лейцина на изолейцин. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, мутеин также содержит мутацию в положениях 69, 74, 88, 125 или в любых их комбинациях, которые соответствуют SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутацией является мутация V69A. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутацией является мутация Q74P. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутацией является мутация N88D или N88R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутацией является мутация C125A или C125S.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 может содержать мутацию в одном или более положениях 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108 и 145, которые соответствуют SEQ ID NO: 15, или в одном или более положениях 29, 31, 35, 37, 48, 69, 71, 74, 88 и 125, которые соответствуют SEQ ID NO: 6. Замены могут быть использованы отдельно или в комбинации друг с другом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит замены в положениях 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или в каждом из положений 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108 и 145. Неограничивающими примерами таких комбинаций являются, но не ограничиваются ими, мутации в положениях 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108 и 145; 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94 и 108; 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91 и 94; 49, 51, 55, 57, 68, 89 и 91; 49, 51, 55, 57, 68 и 89; 49, 51, 55, 57 и 68; 49, 51, 55 и 57; 49, 51 и 55; 49 и 51; 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108 и 145; 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94 и 108; 51, 55, 57, 68, 89, 91 и 94; 51, 55, 57, 68, 89 и 91; 51, 55, 57, 68 и 89; 55, 57 и 68; 55 и 57; 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108 и 145; 55, 57, 68, 89, 91, 94 и 108; 55, 57, 68, 89, 91 и 94; 55, 57, 68, 89 и 91; 55, 57, 68 и 89; 55, 57 и 68; 55 и 57; 57, 68, 89, 91, 94, 108 и 145; 57, 68, 89, 91, 94 и 108; 57, 68, 89, 91 и 94; 57, 68, 89 и 91; 57, 68 и 89; 57 и 68; 68, 89, 91, 94, 108 и 145; 68, 89, 91, 94 и 108; 68, 89, 91 и 94; 68, 89 и 91; 68 и 89; 89, 91, 94, 108 и 145; 89, 91, 94 и 108; 89, 91 и 94; 89 и 91; 91, 94, 108 и 145; 91, 94 и 108; 91 и 94; или 94 и 108. Каждая мутация может быть объединена друг с другом. Те же самые замены могут быть сделаны в SEQ ID NO: 6, но нумерация должна быть соответствующим образом скорректирована как это следует из настоящего изобретения (в нумерации, на 20 меньше, чем для SEQ ID NO: 15, что соответствует положениям в SEQ ID NO: 6).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию в одном или более положениях 35, 36, 42, 104, 115 или 146, которые соответствуют SEQ ID NO: 15, или в эквивалентных положениях в SEQ ID NO: 6 (например, в положениях 15, 16, 22, 84, 95 или 126). Эти мутации могут быть объединены с другими описанными здесь заменами лейцина на изолейцин или с мутацией в положениях 73, 76, 100 или 138, которые соответствуют SEQ ID NO: 15, или в одном или более положениях 53, 56, 80 или 118, которые соответствуют SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутацией является E35Q, H36N, Q42E, D104N, E115Q или Q146E, или любая их комбинация. В некоторых вариантах осуществления изобретения, одна или более этих замен являются заменами дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит остаток дикого типа в одном или более положениях 35, 36, 42, 104, 115 или 146, которые соответствуют SEQ ID NO: 15 или в эквивалентных положениях в SEQ ID NO: 6 (например, в положениях 15, 16,

22, 84, 95 или 126).

Мутации в этих положениях могут быть объединены с любыми другими описанными здесь мутациями, включая, но не ограничиваясь ими, замены в положениях 73, 76, 100 или 138, которые соответствуют SEQ ID NO: 15, или в одном или более положениях 53, 56, 80 или 118, которые соответствуют SEQ ID NO: 6 как описано здесь и выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию N49S, которая соответствует SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию Y51S или Y51H, которые соответствуют SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию K55R, которая соответствует SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию T57A, которая соответствует SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию K68E, которая соответствует SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию V89A, которая соответствует SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию N91R, которая соответствует SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию Q94P, которая соответствует SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию N108D или N108R, которая соответствует SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию C145A или C145S, которая соответствует SEQ ID NO: 15. Эти замены могут быть использованы отдельно или в комбинации друг с другом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин содержит каждую из этих замен. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 этих мутаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин содержит остаток дикого типа в одном или более положениях 35, 36, 42, 104, 115 или 146, которые соответствуют SEQ ID NO: 15 или в эквивалентных положениях в SEQ ID NO: 6 (например, в положениях 15, 16, 22, 84, 95 и 126).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию N29S, которая соответствует SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию Y31S или Y31H, которые соответствуют SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию K35R, которая соответствует SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию T37A, которая соответствует SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию K48E, которая соответствует SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию V69A, которая соответствует SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию N71R, которая соответствует SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию Q74P, которая

соответствует SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию N88D или N88R, которая соответствует SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит мутацию C125A или C125S, которая соответствует SEQ ID NO: 6. Эти замены могут быть использованы отдельно или в комбинации друг с другом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 этих мутаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин содержит каждую из этих замен. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин содержит остаток дикого типа в одном или более положениях 35, 36, 42, 104, 115 или 146, которые соответствуют SEQ ID NO: 15 или в эквивалентных положениях в SEQ ID NO: 6 (например, в положениях 15, 16, 22, 84, 95, и 126).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, для любого из описанных здесь мутеинов IL-2, одно или более положений 35, 36, 42, 104, 115 или 146, которые соответствуют SEQ ID NO: 15 или эквивалентные положения в SEQ ID NO: 6 (например, положения 15, 16, 22, 84, 95 или 126), являются положениями дикого типа (например, как показано в SEQ ID NO: 6 или 15). В некоторых вариантах осуществления изобретения, 2, 3, 4, 5, 6 или каждое из положений 35, 36, 42, 104, 115 или 146, которые соответствуют SEQ ID NO: 15 или эквивалентные положения в SEQ ID NO: 6 (например, положения 15, 16, 22, 84, 95 или 126), являются положениями дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит последовательность:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDL
QMILNGISNHKNPRLARMLTFKFYMPEKATEIKHLQCLEEE
LKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO: 16)

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит последовательность:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDL
QMILNGISNHKNPRLARMLTFKFYMPEKATELKHLCLEEE
LKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO: 17)

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит последовательность:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDL
QMILNGISNHKNPRLARMLTFKFYMPEKATELKHLCLEEE
LKPLEEALRLAPSKNFHIRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMC
EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO: 18)

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 содержит последовательность:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDL

QMILNGISNHKNPRLARMLTFKFYMPEKATELKHLQCLEEE
 LKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSETTFMC
 EYADETATIVEFINRWITFSQSIISTLT (SEQ ID NO: 19)

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь последовательности мутеина IL-2 не содержат лидерной последовательности IL-2. Лидерная последовательность IL-2 может быть представлена последовательностью MYRMQLLSIALSLALVTNS (SEQ ID NO: 20). Следовательно, в некоторых вариантах осуществления изобретения, проиллюстрированные выше последовательности могут также содержать пептиды без лидерной последовательности. Хотя SEQ ID NO: 16–20 проиллюстрированы только с мутацией в одном из положений 73, 76, 100 или 138, которые соответствуют SEQ ID NO: 15, или в одном или более положениях 53, 56, 80 или 118, которые соответствуют SEQ ID NO: 6, однако, эти пептиды могут содержать одну, две, три или 4 мутации в этих положениях. В некоторых вариантах осуществления изобретения, заменой в каждом положении являются замена на изолейцин или на другую аминокислоту консервативного типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лейцин в указанных положениях независимо заменен изолейцином, валином, метионином или фенилаланином.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула мутеина IL-2 присоединена к Fc-области или к другой линкерной области, описанной в настоящей заявке. Примеры таких гибридных белков можно найти в US9580486, US7105653, US9616105, US 9428567, US2017/0051029, WO2016/164937, US2014/0286898A1, WO2014153111A2, WO2010/085495, WO2016014428 A2, WO2016025385A1, US2017/0037102 и US2006/0269515, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-область содержит мутацию, которая известна как мутация LALA. В соответствии с нумерацией Fc-области по Кэбату, эта мутация соответствует L247A, L248A и G250A. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в соответствии с EU-нумерацией Fc-области, эта Fc-область содержит мутацию L234A, мутацию L235A и/или мутацию G237A. В некоторых вариантах осуществления изобретения, независимо от используемой системы нумерации, Fc-часть может содержать мутации, соответствующие этим остаткам. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-область содержит мутации N297G или N297A (в соответствии с нумерацией по Кэбату). Нумерация по Кэбату основана на полноразмерной последовательности, но может быть использована и во фрагменте в соответствии с традиционным выравниванием, проводимым специалистами для Fc-области.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-область содержит последовательность:

DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR

VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG. (SEQ ID NO: 21)

или

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG. (SEQ ID NO: 28).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин IL-2 связан с Fc-областью. Неограничивающими примерами линкеров являются глициновые/сериновые линкеры. Так, например, глициновые/сериновые линкеры могут представлять собой последовательность GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 22) или GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 30). Этот пример представлен просто как неограничивающий пример, и линкер может иметь различное число повторов GGGGS (SEQ ID NO: 23) или GGGGA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 повторов GGGGS (SEQ ID NO: 23) или GGGGA (SEQ ID NO: 29).

Таким образом, гибрид IL-2/Fc может быть представлен формулой $Z_{IL-2M}-L_{gs}-Z_{Fc}$, где Z_{IL-2M} представляет собой описанный здесь мутеин IL-2, L_{gs} представляет собой описанную здесь линкерную последовательность (например, глициновый/сериновый линкер), а Z_{Fc} представляет собой Fc-область, описанную в настоящей заявке или известную специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта формула может быть представлена в обратной ориентации $Z_{Fc}-L_{gs}-Z_{IL-2M}$.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гибрид IL-2/Fc содержит последовательность:

MYRMQLLSIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPR
LARMLTFKFYMPEKATEIKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLEL
KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGDKT
HTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 24)

MYRMQLLSIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPR
LARMLTFKFYMPEKATELKHQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLEL
KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGSGDKT
HTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 25)

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPR
LARMLTFKFYMPEKATELKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHIRPRDLISDINVIVLEL
KGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKT
HTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 26)

MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISNHKNPR
LARMLTFKFYMPEKATELKHLQCLEEELKPLEEALRLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLEL
KGSETTFMCEYADETATIVEFINRWITFSQSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKT
HTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 27).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, гибрид IL-2/Fc содержит последовательность, выбранную из последовательностей, представленных в Таблице 2:

Таблица 2: Аминокислотные последовательности гибридного белка IL-2/Fc

Идентификация последовательностей	Последовательность
SEQ ID NO: 7	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFS QSIISTLTGGGGAGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK

SEQ ID NO: 8	APTSSSTKKTQLQLEHLLLHLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFS QSIISTLTVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 9	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFS QSIISTLTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
SEQ ID NO: 10	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFS QSIISTLTGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 11	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFS QSIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
SEQ ID NO: 12	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFS QSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYHTQ KSLSLSPG
SEQ ID NO: 13	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISRINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFS QSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 14	APTSSSTKKTQLQLEHLLLHLQMILNGINNYKNPKLTRMLT FKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRP RDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFS QSIISTLTGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYPVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
---------------	---

В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеины IL-2 содержат одну или более последовательностей, представленных в нижеследующей таблице, где, в некоторых вариантах осуществления изобретения, показано, что мутеин IL-2 связан с другими белками или линкерами. В этой таблице также представлены последовательности ряда Fc-доменов или вариантов, где IL-2 может быть связан с Fc:

SEQ ID NO:	Краткое описание	Аминокислотная последовательность
31	Человеческий IL-2 с мутацией C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
32	Человеческий IL-2 с мутациями C125S и T3A	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
33	Человеческий IL-2 с N88R и C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
34	Человеческий IL-2 с мутациями V69A, Q74P и C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEALNLAPSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSET TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
35	Человеческий IL-2 с мутациями V69A,	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL

	Q74P, N88D и C125S	EEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
36	Человеческий IL-2 с мутациями V69A, Q74P, N88R и C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEALNLAPSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
37	Человеческий IL-2 с N88D и C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
38	Человеческий IL-2 с мутациями L53I, V69A, Q74P, N88D и C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATEIKHLQCLEEELKPL EEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
39	Человеческий IL-2 с мутациями L56I, V69A, Q74P, N88D и C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHIQCLEEELKPL EEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
40	Человеческий IL-2 с мутациями V69A, Q74P, L80I, N88D и C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEALNLAPSKNFHIRPRDLISDINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
41	Человеческий IL-2 с мутациями V69A, Q74P, N88D, L118I, и C125S	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSET TFMCEYADx`ETATIVEFINRWITFSQSIISTLT
42	Человеческий Fc IgG1 (N-концевые гибриды) с мутациями L234A, L235A, и G237A	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGS

	GGGGS GGGGS GGGGS S (15 аминокислот)	
22	Линкер GGGGS GGGGS GGGGS SGGGGS (20 аминокислот)	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
23	Линкер GGGGS (5 аминокислот)	GGGGS
43	Человеческий Fc IgG1 (усеченный) с мутацией N297G	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
44	Домены CH1–CH2– CH3 тяжелой цепи антитела (человеческий IgG1 с L234A, L235A, и G237A)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAEEAAGAPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
45	Константный домен каппа антитела (человеческого)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
46	IL-2-G4Sx3-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGG GGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAEEAAGAPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV

		KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
47	IL-2 T3A-G4Sx3-Fc	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGG GGSGGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGAPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
48	IL-2 N88R-G4Sx3-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGG GGSGGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGAPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
49	IL-2 V69A, Q74P,- G4Sx3-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEALNLAPSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGG GSGGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVF

		LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG
50	IL-2 N88D V69A, Q74P-G4Sx3-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGG GSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG
51	IL-2 N88R V69A, Q74P-G4Sx3-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEALNLAPSKNFHLRPRDLISRINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGG GSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG
52	IL-2 N88D-G4Sx3-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEVLNLAQSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGG

		GGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAAGAPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
53	IL-2 L53I N88D V69A, Q74P-G4Sx4-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATEIKHLQCLEEELKPL EEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAA GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
54	IL-2 L56I N88D V69A, Q74P-G4Sx4-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHQCLEEELKPL EEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAA GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
55	IL-2 L80I N88D V69A, Q74P-G4Sx4-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHQCLEEELKPL EEALNLAPSKNFHIRPRDLISDINVIVLELKGSET

		TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAA GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
56	IL-2 L118I N88D V69A, Q74P-G4Sx4- Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFINRWITFSQSIISTLTGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAA GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
57	IL-2 N88D V69A, Q74P-G4Sx4-Fc	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKN PKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPL EEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELKGSET TFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPEAA GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
58	Fc-G4S-IL-2 N88D V69A, Q74P	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH

		NAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEALNLAPSKNFHLRPRDLISDINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTL T
--	--	---

В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательности, представленные в таблице или во всем описании, содержат или не содержат одной или более мутаций, которые соответствуют положениям L53, L56, L80 и L118. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательности, представленные в таблице или во всем описании настоящей заявки, содержат или не содержат одной или более мутаций, которые соответствуют положениям L59I, L63I, L24I, L94I, L96I и L132I или других замен в тех же самых положениях. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутацией является замена лейцина на изолейцин. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутеин не содержит другой мутации, отличающейся от мутации, представленной или описанной в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид содержит последовательность SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-часть гибрида не была включена. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид состоит, в основном, из мутеина IL-2, описанного в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белок не содержит Fc-части.

Варианты мутеина IL-2, связанного с Fc и с нацеливающей молекулой, представлены лишь в иллюстративных целях на фиг. 19.

Эти последовательности представлены лишь в иллюстративных целях и не рассматриваются как ограничение объема изобретения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, соединение содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, 54, 55 или 56. В некоторых вариантах осуществления изобретения, соединение содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, 54, 55 или 56 с мутацией C125A или C125S или без этой мутации.

В одном варианте, молекула мутеина IL-2 содержит последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90, 95 или 97% идентична или гомологична последовательности природной молекулы человеческого IL-2, например, природной последовательности IL-2, описанной в настоящей заявке, или последовательности, включенной посредством ссылки.

Как описано в настоящей заявке, мутеины IL-2 могут представлять собой часть биспецифической молекулы, содержащей связывающую молекулу, такую как анти-MAdCAM антитело, которое нацеливает мутеин IL-2 на MAdCAM-экспрессирующую клетку. Как описано в настоящей заявке, биспецифическая молекула может быть получена из двух полипептидных цепей. В некоторых вариантах осуществления изобретения могут быть использованы следующие соединения:

Таблица соединений, биспецифичных к MAdCAM-мутеину IL-2						
Детали	ID последовательности компонента N-концевой-С-концевой молекулы цепи 1				ID последовательности компонента N-концевой-С-концевой молекулы цепи 2	
	VH-домен антитела	Домены CH1-CH2-CH3 тяжелой цепи антитела	Линкер 1	С-концевая молекула	VK-домен легкой цепи	СК-домен легкой цепи
1. Анти-MAdCa m-Fc-L-2 N88D V69A, Q74P	Крысиное анти-MAdCam – VH1	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 35	Крысиное анти-MAdCam – VK1	SEQ ID NO: 45
2. Анти-MAdCa m-Fc-IL-2 N88D V69A, Q74P	Крысиное анти-MAdCam–VH2	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 35	Крысиное анти-MAdCam – VK2	SEQ ID NO: 45

3. Анти- MAdCa m –Fc- IL-2 L118I N88D V69A, Q74P	Крысиное анти- MAdCam – VH1	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 41	Крысиное анти- MAdCam – VK3	SEQ ID NO: 45
4. TTJ2- Fc-IL-2 L118I N88D V69A, Q74P	Человеческ ий TTJ2- VH	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 41	Человеческ ий TTJ2- VK	SEQ ID NO: 45
5. Анти hu.MAd CAM- Fc-IL-2 L118I N88D V69A, Q74P	Человеческ ий VH3 против- MAdCam	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 41	Человеческ ий VK3 против MAdCam	SEQ ID NO: 45
6. анти hu.MAd CAM- Fc-IL-2 L118I N88D V69A, Q74P	Человеческ ий VH4 против- MAdCam	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 41	Человеческ ий VK4 против MAdCam	SEQ ID NO: 45
7. анти hu.MAd CAM- Fc-IL-2 L118I	Человеческ ий VH5 против- MAdCam	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 41	Человеческ ий VK5 против MAdCam	SEQ ID NO: 45

N88D V69A, Q74P						
-----------------------	--	--	--	--	--	--

Белки могут быть получены в присутствии или в отсутствии мутации С125А или С125S в мутеине IL-2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, константный домен каппа в любой из легких цепей может быть заменен константным доменом лямбда.

GITR–связывающие молекулы

GITR(CD357) представляет собой маркер клеточной поверхности, присутствующий на Treg. Блокада взаимодействия GITR–GITRL сохраняет функцию Treg. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит ИС–связывающую молекулу, которая связывается с GITR–экспрессирующими клетками Treg, и нацеливающую молекулу, которая доставляет терапевтическое соединение в представляющую интерес ткань–мишень.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит молекулу анти–GITR антитела, например, молекулу анти–GITR антитела, которая ингибирует связывание GITR с GITRL.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит молекулу анти–GITR антитела, молекулу анти–GITR антитела, которая ингибирует связывание GITR с GITRL, и агонист PD-1, молекулу мутеина IL-2 или другие описанные здесь эффекторы.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что терапевтическое соединение, содержащее GITR–связывающую молекулу, способствует аккумуляции GITR–экспрессирующих Treg на участке, который является мишенью для нацеливающей молекулы терапевтического соединения, например, в трансплантате или на участке поражения органа.

Бутирофилины/бутирофилин–подобные молекулы

Молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, может содержать агонистическую молекулу BTNL2. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что агонистические молекулы BTNL2 могут индуцировать клетки Treg.

Используемый здесь термин агонистическая молекула BTNL2 означает полипептид, имеющий достаточную последовательность BTNL2, которая, как часть терапевтического соединения, индуцирует клетки Treg. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула BTNL2 имеет последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100% идентична или, по существу, идентична последовательности природного бутирофилина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит антагонистическую молекулу BTNL8.

Терапевтические соединения, содержащие SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу: модификация локального микроокружения

Терапевтическое соединение может содержать молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, которая стимулирует иммуносупрессорное локальное микроокружение, например, благодаря близости к мишени вещества, которое ингибирует или минимизирует атаку мишени иммунной системой, и эта молекула называется здесь SM–связывающей/SM–модулирующей молекулой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, SM–связывающая/SM–модулирующая молекула содержит молекулу, которая ингибирует или минимизирует атаку мишени иммунной системой (эта молекула называется здесь SM–связывающей/SM–модулирующей молекулой). В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу, которая связывает и аккумулирует растворимое вещество, например, эндогенное или экзогенное вещество, обладающее иммуносупрессорной функцией. В некоторых вариантах осуществления изобретения, В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу, например, молекулу CD39 или молекулу CD73 или молекулу щелочной фосфатазы, которая связывает, ингибирует, секвестрирует, разлагает или как-либо иначе нейтрализует растворимое вещество, а обычно эндогенное растворимое вещество, например, АТР, в случае молекулы CD39 или молекулы щелочной фосфатазы, или АМР, в случае молекулы CD73, которая стимулирует иммунную атаку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу, которая включает иммуносупрессорное вещество, например, фрагмент белка, который является иммуносупрессорным.

Терапевтические соединения, содержащие ICSM–связывающую/ICSM–модулирующую молекулу: Ингибирование стимуляции, например, ингибирование костимуляции иммунных клеток

Терапевтическое соединение может содержать ICSM–связывающую/ICSM–модулирующую молекулу, которая ингибирует или подавляет стимулирующую, например, костимулирующую связывающуюся пару, например, ОХ40 и ОХ40L. ICSM–связывающая/ICSM–модулирующая молекула может связываться с любым членом этой пары и ингибировать его.

В одном варианте изобретения, ICSM–связывающая/ICSM–модулирующая молекула содержит молекулу антитела, которая связывается с любым членом стимулирующей, например, костимулирующей связывающейся пары и ингибирует его. В одном варианте изобретения, ICSM–связывающая/ICSM–модулирующая молекула содержит антагонистический аналог одного из членов связывающейся пары. В таких вариантах осуществления изобретения, ICSM–связывающая/ICSM–модулирующая молекула может содержать растворимый фрагмент одного из членов, который связывается с другим членом. Обычно, аналог имеет последовательность, которая по меньшей мере на

50, 60, 70, 80, 90, 95 или 98% гомологична или идентична последовательности с природным членом, который связывается с членом–мишенью этой пары. В случае ICSM–связывающей/ICSM–модулирующей молекулы, которая связывается с членом, присутствующим на поверхности иммунной клетки, ICSM–связывающая/ICSM–модулирующая молекула обычно связывается с противочленом, но не активирует его, или позволяет эндогенному противочлену связываться и активироваться.

Таким образом, в случае связывающейся пары, которая включает, например, член OX40 иммунной клетки и противочлен OX40L, ICSM–связывающая/ICSM–модулирующая молекула может содержать любую из следующих молекул:

а) молекулу антитела, которая связывается с членом OX40 иммунной клетки и подавляет стимуляцию, например, посредством блокирования связывания эндогенного противочлена OX40L;

б) молекулу антитела, которая связывается с противочленом OX40L и ингибирует стимуляцию, например, посредством блокирования эффективного связывания эндогенного противочлена OX40L с членом OX40 иммунной клетки;

с) растворимый фрагмент или аналог противочлена OX40L, который связывается с членом OX40 иммунной клетки и ингибирует стимуляцию; и

с) растворимый фрагмент или аналог члена OX40 иммунной клетки, который связывается с противочленом OX40L и ингибирует стимуляцию.

Так, например, ICSM–связывающая/ICSM–модулирующая молекула, например, молекула антитела или антагонистический аналог или аналог противочлена могут связываться с CD2, ICOS, CD40L, CD28, LFA1, SLAM, TIM1, CD30, OX40 (CD134), 41BB (CD137), CD27, HVEM, DR3, GITR, BAFFR, TACI, BCMA или CD30, CD40. В другом варианте осуществления изобретения, ICSM–связывающая/ICSM–модулирующая молекула, например, молекула антитела или антагонистический аналог или аналог противочлена могут связываться с B7.1, B7.2, ICOSL (B7–H2, B7RP1), LFA3, CD48, CD58, ICAM1, SLAM, TIM4, CD40, CD30L, OX40L (CD252), 41BBL (CD137L), CD70, LIGHT, TLIA, GITRL, BAFF, APRIL или CD30, CD40L.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICSM–связывающая/ICSM–модулирующая молекула связывает, ингибирует или активирует костимулирующую молекулу, например, костимулирующую молекулу, присутствующую на иммунной клетке, или связывается с противочленом, что позволяет предотвратить активацию противочлена костимулирующей молекулой, присутствующей на иммунной клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICSM содержит молекулу антитела–антагониста, например, молекулу антитела, которая связывается с костимулирующей молекулой на иммунной клетке или связывается с противочленом ICSM, что позволяет предотвратить активацию противочлена костимулирующей молекулой, присутствующей на иммунной клетке, и приводит к ингибированию активности костимулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ICSM содержит молекулу аналога–антагониста, например, фрагмент молекулы, который связывается с

костимулирующей молекулой, что приводит к ингибированию активности костимулирующей молекулы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, один член связывающейся пары будет присутствовать на поверхности иммунной клетки, например, Т-, В- или NK-клетки или дендритной клетки, а противочлен может присутствовать на другой иммунной клетке или на АПК, такой как дендритная клетка, или на неиммунных клетках, таких как клетки гладких мышц или эндотелиальные клетки.

В нижеследующей таблице приводятся неограничивающие примеры костимулирующей молекулы и пар противоструктур.

Таблица 2: Костимулирующая молекула и пары противоструктур	
Костимулирующая молекула (например, на Т-клетках)	Противоструктура
CD28	B7.1 или B7.2
ICOS	ICOSL (B7H-2, B7RP1)
CD2	LFA3, CD48, CD58
LFA1	ICAM1
SLAM	SLAM
TIM1	TIM4
CD40L	CD40
CD30	CD30L
OX40/CD134	OX40L (CD252)
41BB/CD137	41BBL (CD137L)
CD27	CD70
HVEM	LIGHT
DR3	TL1A
GITR	GITRL
Костимулирующая молекула (например, на В-клетках)	Противоструктура
BAFFR	BAFF
TACI	BAFF и APRIL
BCMA	BAFF и APRIL
CD40	CD40L
CD30L	CD30

Донорская ткань

Описанные здесь терапевтические соединения и способы могут быть применены в

комбинации с трансплантацией донорской ткани индивидууму и могут минимизировать отторжение, минимизировать повреждение, опосредуемое иммунными эффекторными клетками, увеличивать доступность или увеличивать функциональное время полужизни ткани трансплантата, взятой у донора. Тканью может быть ткань ксенотрансплантата или аллотрансплантата. Трансплантированная ткань может содержать ткань всего органа или части органа, например, печени, почек, сердца, поджелудочной железы, тимуса, кожи или легких. В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь терапевтические соединения снижают или устраняют потребность в системной иммунной супрессии. Описанные здесь терапевтические соединения и способы могут быть также применены для лечения БТПХ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки-хозяева покрывают терапевтическим соединением, которое содержит, в качестве молекулы, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, молекулу PD-L1.

В Таблице 2 представлены молекулы-мишени, показанные для трансплантации. Молекулой-мишенью является мишень, с которой связывается нацеливающая молекула. Как обсуждается в настоящей заявке, в некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающую молекулу выбирают так, чтобы она связывалась с продуктом аллеля, присутствующего на донорской ткани, и не экспрессировалась у индивидуума (реципиента) или экспрессировалась на другом уровне (например, на пониженном или существенно пониженном уровне).

Таблица 2: Молекулы-мишени, показанные для трансплантации		
Показания	Тип органа/клетки	Мишень
Ткань аллотрансплантата, например, аллотрансплантата твердого органа, БТПХ	Все	HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ or HLA-DR
Трансплантат	Почки	Антигены, экспрессируемые в почках, где инфильтрируются иммунные клетки, включая, но не ограничиваясь ими интерстициальную область канальцев, например, уромодулин, SLC22A2, SLC22A6, FXYP4, SLC5A10, SLC6A13, AQP6, SLC13A3, TMEM72, BSND, NPR3, и эпителий проксимальных и дистальных канальцев, такие как OAT1, OCT2

Аутоиммунные расстройства

Описанные здесь терапевтические соединения и способы могут быть применены для лечения индивидуума, у которого наблюдается нежелательный аутоиммунный ответ или у индивидуума с риском развития нежелательного аутоиммунного ответа, например, аутоиммунного ответа при диабете типа 1, рассеянном склерозе, кардиомиозите, витилиго, алопеции, воспалительном заболевании кишечника (ВЗК, например, при болезни Крона или язвенном колите), синдроме Сьегрена, фокальном сегментарном гломерулосклерозе (ФСГС), склеродермии/системном склерозе (СС) или ревматоидном артрите. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лечение позволяет минимизировать отторжение, минимизировать повреждение, опосредуемое иммунными эффекторными клетками, увеличивать продолжительность жизни ткани индивидуума, подвергающегося аутоиммунной атаке или индивидуума с риском аутоиммунной атаки. В таблице 3 представлены молекулы–мишени, показанные для лечения некоторых аутоиммунных расстройств, и типы органов/клеток. Молекулой–мишенью является мишень, с которой связывается нацеливающая молекула.

Таблица 3: Молекулы–мишени, показанные для лечения аутоиммунных заболеваний		
Показания	Тип органов/клеток	Молекула–мишень
Диабет типа 1 и трансплантация	Поджелудочная железа/Панкреатические островки, бета–клетки	SEZ6L2, LRP11, DISP2, SLC30A8, FXYD2 TSPAN7 TMEM27 (см. Hald et al. 2012 Diabetologia 55:154); FXYD2; GPR119; HEPACAM2, DPP6 или MAdCAM
Рассеянный склероз	ЦНС/миелиновая оболочка олигодендроцитов	MOG, PLP, MBP
Кардиомиозит, ревматоидный артрит	Кардиомиоциты, моноциты, макрофаги, миелоидные клетки	SIRPA (CD172a)
Воспалительное заболевание кишечника (язвенный колит, болезнь Крона) или БТПХ; глютенная болезнь	Тонкий кишечник	MAdCAM
Аутоиммунный гепатит (АИГ);	Печень	MAdCAM

первичный склерозирующий холангит (ПСХ); первичный билиарный склероз (ПБС); Трансплантация		
Фокальный сегментарный гломерулосклероз (ФСГС) и другие заболевания, которые могут поражать почки, например, волчаночный нефрит, системная склеродермия, мембранозная гломерулярная нефропатия (МГН); мембранозная нефропатия (МН); болезнь минимальный замен (БМЗ); IgA– нефропатия; ANCA– ассоциированный васкулит (AAV)	Почки, подоциты, каналы, эпителиальные клетки	COL1A1, кадгерин 2, VCAM–1, Thy1, подоцин, KIM1 (Hodgin et al, Am J Pathol 177:1675 2010); PLA2R; OAT1; OCT2; K– кадгерин 6
Синдром Сьегрена	Слюнные железы, эпителиальные клетки, почки	FCGR3B, HLAB, KIM1 (Hu et al. Arth and Rheum 56:3588 2007)
Склеродермия, системный склероз (СС)	Кожа, почки, легкие, фибробласты, соединительная ткань	Коллаген I, III, VI, VII, фибронектин (Wang et al Arth and Rheum 54:2271 2006)
Витилиго	Кожа, эпидермис, клетки Лангерганса, кератиноциты,	COL17A1, CD1A, CD207, десмоглеин 1–4, кератин 1

	меланоциты	
Гнездная алопеция	Кожа, волосяные фолликулы/волосяная луковица, дерма	CD133 (Yang and Cotsarelis, J. Dermatol Sci 57:2 2010)

Другими примерами аутоиммунных расстройств и заболеваний, которые могут быть подвергнуты лечению описанными здесь соединениями, являются, но не ограничиваются ими, миокардит, синдром постмиокардиального инфаркта, постперикардитомический синдром, подострый бактериальный эндокардит, нефрит, вызываемый антителами против гломерулярной базальной мембраны, интерстициальный цистит, волчаночный нефрит, мембранозная гломерулонефropатия, хроническая болезнь почек («ХБП»), аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит, антисинтетазный синдром, гнездная алопеция, аутоиммунный ангиоотек, аутоиммунный прогестероновый дерматит, аутоиммунная крапивница, буллезный пемфигоид, рубцующийся пемфигоид, герпетиформный дерматит, дисковидная красная волчанка, приобретенный буллезный эпидермолиз, узловатая эритема, пемфигоид беременных, гнойный гидраденит, плоский лишай, склеротический лишай, болезнь прямых цепей IgA (Iad), кольцевидная склеродермия, вульгарная пузырчатка, лишаеподобный петириаз и острое воспаление вен, болезнь Мухи–Хабермана, псориаз, системная склеродермия, витилиго, болезнь Аддисона, аутоиммунный полиэндокринный синдром (АПС) типа 1, аутоиммунный полиэндокринный синдром (АПС) типа 2, аутоиммунный полиэндокринный синдром (АПС) типа 3, аутоиммунный панкреатит (АИП), сахарный диабет типа 1, аутоиммунный тиреоидит, тиреоидит Орда, болезнь Грейвса, аутоиммунный оофорит, эндометриоз, аутоиммунный орхит, синдром Сьегрена, аутоиммунная энтеропатия, глютенная болезнь, болезнь Крона, микроскопический колит, язвенный колит, тромбоцитопения, адипоз, полиалгезия, болезнь Стилла взрослых, анкилозирующий спондилит, синдром CREST, волчанка, вызываемая лекарственными средствами, артрит, ассоциированный с энтезитом, эозинофильный фасцит, синдром Фелти, IgG4-ассоциированное заболевание, ювенильный артрит, болезнь Лайма (хроническая), смешанная болезнь соединительной ткани (СБСТ), палиндромный ревматизм, синдром Пэрри–Ромберга, синдром Парсонса–Тернера, псориазический артрит, реактивный артрит, рецидивирующий полихондрит, ретроперитонеальный фиброз, ревматическая лихорадка, ревматоидный артрит, саркоидоз, синдром Шницлера, системная красная волчанка (СКВ), недифференцированное заболевание соединительной ткани (НЗСТ), дерматомиозит, фибромиалгия, миозит телец включения, миозит, тяжелая миастения, нейромитотония, паранеопластическая дегенерация мозжечка, полимиозит, острый диссеминированный энцефаломиелит (АДЭМ), острая невропатия двигательных аксонов, энцефалит, вызываемый антителами против рецептора N-метил-D-аспартата (анти-NMDA), концентрический склероз Бало, энцефалит Бикерстаффа, хроническая воспалительная

демиелинизирующая полинейропатия, синдром Гийена–Барре, энцефалопатия Хашимото, идиопатические воспалительные демиелинизирующие заболевания, миастенический синдром Ламберта–Итона, рассеянный склероз, синдром Ошторана, детское аутоиммунное нервно–психическое расстройство, вызываемое стрептококком (PANDAS), прогрессирующая воспалительная невропатия, синдром усталых ног, синдром «негнувшегося человека», хорей Сиденхэма, поперечный миелит, аутоиммунная ретинопатия, аутоиммунный увеит, синдром Когана, офтальмопатия Грейвса, промежуточный увеит, конъюнктивит связок, язва Мурена, нейромиелит зрительного нерва, синдром «пляшущих глаз», неврит зрительного нерва, склерит, синдром Сусака, симпатическая офтальмия, синдром Толоса–Ханта, аутоиммунная болезнь внутреннего уха (АБВУ), болезнь Меньера, болезнь Бехчета, эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (ЭГПА), гигантоклеточный артерит, гранулематоз с полиангиитом (ГПА), IgA–васкулит (IgAV), болезнь Кавасаки, лейкоцитокластный васкулит, волчаночный васкулит, ревматоидный васкулит, микроскопический полиангиит (МПА), узелковый полиартерит (УПА), ревматическая полимиалгия, васкулит, первичный иммунодефицит и т.п.

Другими примерами потенциальных аутоиммунных расстройств и заболеваний, а также сопутствующих аутоиммунных заболеваний, которые могут быть подвергнуты лечению описанными здесь соединениями, являются, но не ограничиваются ими, синдром хронической усталости, комплексный региональный болевой синдром, эозинофильный эзофагит, гастрит, коллагеноз легких, синдром POEMS, синдром Рейно, первичный иммунодефицит, гангренозная пиодермия, агаммаглобулинемия, амилоидоз, амиотрофический боковой склероз, нефрит, вызываемый антителами против базальной мембраны канальцев, атопическая аллергия, атопический дерматит, аутоиммунная периферическая невропатия, синдром Блау, болезнь Каслмана, болезнь Шагаса, хроническая обструктивная болезнь легких, хронический рецидивирующий мультифокальный остеомиелит, дефицит компонента комплемента 2, контактный дерматит, синдром Кушинга, кожный лейкоцитокластный ангиит, болезнь Дего, экзема, эозинофильный гастроэнтерит, эозинофильная пневмония, эритробластоз плода, прогрессирующая костная фибродисплазия, желудочно–кишечный пемфигоид, гипогаммаглобулинемия, идиопатический гигантоклеточный миокардит, идиопатический фиброз легких, IgA–нефропатия, заболевание, вызываемое иммунорегуляторными липопротеинами, синдром IPeX, конъюнктивит складок, синдром Маджида, нарколепсия, энцефалит Расмуссена, шизофрения, сывороточная болезнь, спондилоартропатия, синдром Свита, артерит Такаясу и т.п.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, аутоиммунное расстройство не включает вульгарную пузырчатку и пузырчатку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аутоиммунное расстройство не включает листовидную пузырчатку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аутоиммунное расстройство не включает буллезный пемфигоид. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, аутоиммунное расстройство не включает болезнь Гудпасчера. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аутоиммунное расстройство не включает псориаз. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аутоиммунное расстройство не включает кожную болезнь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, расстройство не включает новообразование, например рак.

Терапевтические соединения

Терапевтическое соединение включает специфически нацеливающую молекулу, функционально связанную с молекулой, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, специфически нацеливающая молекула и молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, связаны друг с другом посредством ковалентной или нековалентной связи, например, посредством прямой ковалентной или нековалентной связи друг с другом. В других вариантах осуществления изобретения, специфически нацеливающая молекула и молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, связаны, например, ковалентно или нековалентно посредством линкерной молекулы. Так, например, в случае гибридного полипептида, полипептидная последовательность, содержащая специфически нацеливающую молекулу, и полипептидная последовательность могут быть непосредственно связаны друг с другом или связаны друг с другом посредством одной или более линкерных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкерная молекула содержит полипептид. Однако, линкеры не ограничиваются полипептидами. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкерная молекула содержит и другие остовы, например, непептидный полимер, например, полимер ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкерная молекула может содержать частицу, например, наночастицу, например, полимерную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкерная молекула может содержать разветвленную молекулу или дендример. Однако, в тех вариантах изобретения, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу (которая связывается с эффектором, подобным PD-1), структуры, которые приводят к кластеризации в отсутствие связывания с мишенью, должны быть удалены, поскольку они могут вызывать кластеризацию в отсутствие связывания с мишенью. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение имеет такую структуру, например, достаточно ограниченные копии ICIM, при которой кластеризация в отсутствие связывания с мишенью была минимизирована или, по существу, элиминирована или полностью элиминирована, или минимизирована в степени, достаточной для подавления значительной системной иммуносупрессии.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит полипептид, включающий специфически нацеливающую молекулу, ковалентно или нековалентно связанную с молекулой, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическая молекула

содержит гибридный белок, включающий специфически нацеливающую молекулу, присоединенную, например, непосредственно или посредством линкерной молекулы, содержащей один или более аминокислотных остатков, к молекуле, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическая молекула содержит полипептид, включающий специфически нацеливающую молекулу, связанную посредством нековалентной связи или ковалентной связи, например, ковалентной связи, не являющейся пептидной связью, например, сульфгидрильной связи, с молекулой, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит полипептид, например, гибридный полипептид, включающий:

1.a) специфически нацеливающую молекулу, содержащую полипептид, специфически связывающийся с мишенью;

1.b) специфически нацеливающую молекулу, содержащую полипептид, связывающийся с лигандом мишени;

1.c) специфически нацеливающую молекулу, содержащую молекулу антитела;

1.d) специфически нацеливающую молекулу, содержащую одноцепочечную молекулу антитела, например, домен scFv; или

1.e) специфически нацеливающую молекулу, содержащую первую переменную область легкой или тяжелой цепи молекулы антитела, где другая переменная область ковалентно или нековалентно связана с первой переменной областью; и

2.a) молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, которая включает полипептид, специфически связывающийся с эффектором;

2.b) молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, которая включает молекулу, связывающийся с лигандом эффектора;

2.c) молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, которая включает молекулу антитела;

2.d) молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, которая включает одноцепочечную молекулу антитела, например, домен scFv; или

2.e) молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, которая включает первую переменную область легкой или тяжелой цепи молекулы антитела, где другая переменная область ковалентно или нековалентно связана с первой переменной областью.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит 1.a и 2.a.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит 1.a и 2.b

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит 1.a и 2.c

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение

содержит 1.e и 2.d

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит 1.e и 2.e

Раскрытые здесь терапевтические соединения могут, например, содержать множество молекул, связывающихся с эффектором/модулирующих эффектор, и специфически нацеливающих молекул. Для презентации множества молекул могут быть использованы любые подходящие линкеры или остовы. Линкер обычно соединен или связан с одной или более молекулами, связывающимися с эффектором/модулирующими эффектор, и с нацеливающими молекулами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, два (или более) линкера связаны ковалентно или нековалентно, например, с образованием гетеро- или гомодимерного терапевтического соединения. Так, например, линкер может содержать Fc-область, где две Fc-области связаны друг с другом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит две линкерных области, где линкерные области могут связывается друг с другом, например, с образованием двух идентичных Fc-областей. В некоторых вариантах терапевтического соединения, содержащего две линкерных области, эти линкерные области не способны или, по существу, не способны связываться друг с другом, например, две Fc-области могут быть членами пары «узел-дыра».

Неограничивающие репрезентативные конфигурации терапевтических соединений включают следующие конфигурации (например, от N- до C-конца):

R1 – линкерная область A – R2

R3 – линкерная область B – R4,

где каждый R1, R2, R3 и R4 независимо содержит молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, например, ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, IC-связывающую/IC-модулирующую молекулу, ICSM-связывающую/ICSM-модулирующую молекулу или SM-связывающую/SM-модулирующую молекулу; специфически нацеливающую молекулу, или отсутствует;

Линкерная область A и линкер B содержат молекулы, которые могут связываться друг с другом, например, линкер A и линкер B содержат молекулу Fc, при условии, что присутствует молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор и специфически нацеливающая молекула.

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

R1 содержит молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, например, ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, IC-связывающую/IC-модулирующую молекулу, ICSM-связывающую/ICSM-модулирующую молекулу или SM-связывающую/SM-модулирующую молекулу; или отсутствует;

R2 содержит специфически нацеливающую молекулу или отсутствует;

R3 содержит молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, например, ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, IC-связывающую/IC-

модулирующую молекулу, ICSM–связывающую/ICSM–модулирующую молекулу или SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу; или отсутствует;

R4 содержит специфически нацеливающую молекулу или отсутствует;

Линкерная область А и линкер В содержат молекулы, которые могут связываться друг с другом, например, линкер А и линкер В содержат молекулу Fc, при условии, что присутствует один из R1 или R3 и один из R2 или R4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

R1 содержит специфически нацеливающую молекулу или отсутствует;

R2 содержит молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, например, ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу, IC–связывающую/IC–модулирующую молекулу, ICSM–связывающую/ICSM–модулирующую молекулу или SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу; или отсутствует;

R3 содержит специфически нацеливающую молекулу или отсутствует;

R4 содержит молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, например, ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу, IC–связывающую/IC–модулирующую молекулу, ICSM–связывающую/ICSM–модулирующую молекулу или SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу; или отсутствует;

Линкерная область А и линкер В содержат молекулы, которые могут связываться друг с другом, например, линкер А и линкер В содержат молекулу Fc, при условии, что присутствует один из R1 или R3 и один из R2 или R4.

Примерами являются, но не ограничиваются ими:

R1	Линкерная область А	R2	R3	Линкерная область В	R4	Другие
HCVR и LCVR	Fc–область	fcFv	HCVR и LCVR	Fc–область	scFv	Самоспаривающиеся линкерные области
HCVR и LCVR	Fc–область	fcFv	HCVR и LCVR	Fc–область	scFv	Несамоспаривающиеся линкерные области
HCVR и LCVR (или отсутствует)	Fc–область	fcFv	HCVR и LCVR (или отсутствует)	Fc–область	scFv	Самоспаривающиеся линкерные области , Один из R1 или R3 отсутствует.
HCVR и LCVR (или	Fc–область	fcFv	HCVR и LCVR (или	Fc–область	scFv	Несамоспаривающиеся линкерные области ,

отсутств ует)			отсутств ует)			Один из R1 или R3 отсутствует.
HCVR и LCVR	Fc–область	fcFv (или отсутст вует)	HCVR и LCVR	Fc–область	scFv (или отсут ствуе т)	Самоспаривающиеся линкерные области , Один из R2 или R4 отсутствует.
HCVR и LCVR	Fc–область	fcFv (или отсутст вует)	HCVR и LCVR	Fc–область	scFv (или отсут ствуе т)	Несамоспаривающие ся линкерные области , Один из R2 или R4 отсутствует
HCVR и LCVR	Fc–область	fcFv	HCVR и LCVR	Fc–область	scFv	Самоспаривающиеся линкерные области , R1 и R3 являются одинаковыми
HCVR и LCVR	Fc–область	fcFv	HCVR и LCVR	Fc–область	scFv	Не– самоспаривающиеся линкерные области , R1 и R3 являются различными
HCVR и LCVR	Fc–область	fcFv	HCVR и LCVR	Fc–область	scFv	Самоспаривающиеся линкерные области , R2 и R4 являются одинаковыми
HCVR и LCVR	Fc–область	fcFv	HCVR и LCVR	Fc–область	scFv	Не– самоспаривающиеся линкерные области , R2 и R4 являются различными

HCVR и LCVR означают молекулу, содержащую антигенсвязывающую часть вариабельной области тяжелой и легкой цепи, где тяжелая цепь обычно связана с линкерной областью.

Самоспаривание означает, что линкерная область может спариваться сама с собой, например, Fc-область может спариваться со своей копией.

Не-самоспаривание означает, что линкерная область не спаривается сама с собой, или в основном, не спаривается сама с собой, например, Fc-область не спаривается или, в основном, не спаривается сама с собой, например, где линкерная область А и линкерная область В представляют собой члены пары «узел-дырка».

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

каждый из R1, R2, R3 и R4 независимо содержит молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, которая активирует ингибирующий рецептор на иммунной клетке, например, Т-клетке или В-клетке, например, молекулу PD-L1 или функциональную молекулу анти-PD-1 антитела (агониста PD-1); специфически нацеливающую молекулу; или отсутствует;

при условии, что присутствует эффектор-связывающая молекула и специфически нацеливающая молекула.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

R1 и R3 независимо содержат молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, которая активирует ингибирующий рецептор на иммунной клетке, например, Т-клетке или В-клетке, например, молекулу PD-L1 или функциональную молекулу анти-PD-1 антитела (агониста PD-1); и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

R1 и R3 независимо содержат функциональную молекулу анти-PD-1 антитела (агониста PD-1); и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

R1 и R3 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, антитело против антигена ткани; и

R2 и R4 независимо содержат функциональную молекулу анти-PD-1 антитела

(агониста PD-1), например, молекулу scFv.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

R1 и R3 независимо содержат молекулу PD-L1 (агониста PD-1); и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани; и

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

R1 и R3 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, антитело против антигена ткани; и

R2 и R4 независимо содержат молекулу PD-L1 (агониста PD-1).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

каждый из R1, R2, R3 и R4 независимо содержит: SM-связывающую/SM-модулирующую молекулу, которая модулирует, например, связывает и ингибирует, секвестрирует, разлагает или как-либо иначе нейтрализует вещество, например, растворимую молекулу, которая модулирует иммунный ответ, например, АТФ или АМР, например, молекулу CD39 или молекулу CD73; специфически нацеливающую молекулу; или отсутствует;

при условии, что присутствует SM-связывающая/SM-модулирующая молекула и специфически нацеливающая молекула.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются или, в основном, не подвергаются самоспариванию).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

R1 и R3 независимо содержат: SM-связывающую/SM-модулирующую молекулу, которая модулирует, например, связывает и ингибирует, секвестрирует, разлагает или как-либо иначе нейтрализует вещество, например, растворимую молекулу, которая модулирует иммунный ответ, например, АТФ или АМР, например, молекулу CD39 или молекулу CD73; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающую молекулу, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

R1 и R3 независимо содержат молекулу CD39 или молекулу CD73; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающую молекулу, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

каждый R1 и R3 содержит молекулу CD39; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани; и

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

каждый R1 и R3 содержит молекулу CD73; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

один из R1 и R3 содержит молекулу CD39; а другой содержит молекулу CD73; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

каждый из R1, R2, R3 и R4 независимо содержит: молекулу HLA-G; специфически нацеливающую молекулу; или отсутствует;

при условии, что присутствует молекула HLA-G и специфически нацеливающая молекула.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

каждый R1 и R3 содержит молекулу HLA-G; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не

подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

каждый R1 и R3 содержит агонистическую молекулу анти–LILRB1 антитела; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

каждый R1 и R3 содержит агонистическую молекулу анти–KIR2DL4 антитела; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

каждый R1 и R3 содержит агонистическую молекулу анти–LILRB2 антитела; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

каждый R1 и R3 содержит агонистическую молекулу анти–NKG2A антитела; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

один из R1 и R3 содержит первую молекулу, а другой содержит другую молекулу, выбранную из антагонистической молекулы анти–LILRB1 антитела, агонистической молекулы анти–KIR2DL4 антитела и агонистической молекулы анти–NKG2A антитела; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

один из R1 и R3 содержит антагонистическую молекулу анти–LILRB1 антитела, а

другой содержит агонистическую молекулу анти–KR2DL4 антитела; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

один из R1 и R3 содержит антагонистическую молекулу анти–LILRB1 антитела, а другой содержит агонистическую молекулу анти– NKG2A антитела; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В одном из вариантов осуществления изобретения:

каждый из R1, R2, R3 и R4 независимо содержит: молекулу мутеина IL–2; специфически нацеливающую молекулу; или отсутствует;

при условии, что присутствует молекула мутеина IL–2 и специфически нацеливающая молекула.

В одном из вариантов осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

Один из R1, R2, R3 и R4 содержит молекулу мутеина IL–2, один содержит молекулу анти–GITR антитела, например, молекулу анти–GITR антитела, которая ингибирует связывание GITRL с GITR, и один содержит специфически нацеливающую молекулу.

В одном из вариантов осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В одном из вариантов осуществления изобретения:

каждый R1 и R3 содержит молекулу мутеина IL–2; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В одном из вариантов осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В одном из вариантов осуществления изобретения:

один из R1 и R3 содержит GARP–связывающую молекулу, например, молекулу анти–GARP антитела или GITR–связывающую молекулу, например, молекулу анти–GITR антитела, а другой содержит молекулу мутеина IL–2; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В одном из вариантов осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В одном из вариантов осуществления изобретения:

один из R1 и R3 содержит GARP-связывающую молекулу, например, молекулу анти-GARP антитела, а другой содержит молекулу мутеина IL-2; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В одном из вариантов осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В одном из вариантов осуществления изобретения:

один из R1 и R3 содержит G1TR-связывающую молекулу, например, молекулу анти-G1TR антитела, а другой содержит молекулу мутеина IL-2; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В одном из вариантов осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

каждый из R1, R2, R3 и R4 независимо содержит: молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, которая активирует ингибирующий рецептор на В-клетке, например, молекулу анти-FCRL антитела, например, агонистическую молекулу анти-FCRL антитела; специфически нацеливающую молекулу; или отсутствует;

при условии, что присутствует эффектор-связывающая молекула и специфически нацеливающая молекула.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В одном из вариантов осуществления изобретения, молекула анти-FCRL антитела содержит: молекулу анти-FCRL антитела, например, агонистическую молекулу анти-FCRL антитела, направленную против FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4, FCRL5 или FCRL6.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,

каждый R1 и R3 содержит агонистическую молекулу анти-FCRL антитела; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат

молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В одном из вариантов осуществления изобретения, молекула анти-FCRL антитела содержит: молекулу анти-FCRL антитела, например, агонистическую молекулу анти-FCRL антитела, направленную против FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4, FCRL5 или FCRL6.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,

R1 и R3 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы антитела против антигена ткани; и

каждый R2 и R4 содержит молекулу анти-FCRL антитела, например, агонистическую молекулу анти-FCRL антитела, например, молекулу scFv.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

В одном из вариантов осуществления изобретения, молекула анти-FCRL антитела содержит: молекулу анти-FCRL антитела, например, агонистическую молекулу анти-FCRL антитела, направленную против FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4, FCRL5 или FCRL6.

В некоторых вариантах осуществления изобретения,

один из R1, R2, R3 и R4 содержит молекулу анти-BCR антитела, например, антагонистическую молекулу анти-BCR антитела, один содержит молекулу анти-FCRL антитела, и один содержит специфически нацеливающую молекулу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию)

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула анти-FCRL антитела содержит: молекулу анти-FCRL антитела, например, агонистическую молекулу анти-FCRL антитела, направленную против FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4, FCRL5 или FCRL6.

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

один из R1, R2, R3 и R4 содержит молекулу биспецифического антитела, содержащую молекулу анти-BCR антитела, например, антагонистическую молекулу анти-BCR антитела, один содержит молекулу анти-FCRL антитела, и один содержит специфически нацеливающую молекулу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию)

В одном из вариантов осуществления изобретения, молекула анти-FCRL антитела содержит: молекулу анти-FCRL антитела, например, агонистическую молекулу анти-FCRL антитела, направленную против FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4, FCRL5 или

FCRL6.

В некоторых вариантах осуществления изобретения:

каждый R1, R2, R3 и R4 независимо содержит:

i) молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, например, ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу, IC–связывающую/IC–модулирующую молекулу, ICSM–связывающую/ICSM–модулирующую молекулу или SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу, которые минимизируют или ингибируют активность, размножение или функцию Т–клеток (молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор Т–клеток);

ii) молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, например, ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу, IC–связывающую/IC–модулирующую молекулу, ICSM–связывающую/ICSM–модулирующую молекулу или SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу, которые минимизируют или ингибируют активность, размножение или функцию В–клеток (молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор В–клеток);

iii) специфически нацеливающую молекулу; или

iv) отсутствует;

при условии, что присутствуют: молекула, связывающаяся с Т–клеточным эффектором/модулирующая Т–клеточный эффектор, молекула, связывающаяся с В–клеточным эффектором/модулирующая В–клеточный эффектор, и специфически нацеливающая молекула.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, Линкер А и Линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, один из R1, R2, R3 и R4 содержит антагонистическую молекулу анти–PD–1 антитела, и один содержит молекулу HLA–G.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, один из R1, R2, R3 и R4 содержит SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу, например, молекулу CD39 или молекулу CD73. В некоторых вариантах осуществления изобретения, один из R1, R2, R3 и R4 содержит молекулу, которая связывает, активирует или поддерживает регуляторную иммунную клетку, например, клетку Treg или Breg, например, молекулу мутеина IL–2.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, один из R1, R2, R3 и R4 содержит агонистическое анти–PD–1 антитело, один содержит молекулу HLA–G, и один содержит молекулу мутеина IL–2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, анти–PD–1 антитело заменяют молекулой мутеина IL–2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, один из R1, R2, R3 и R4 содержит агонистическое анти–PD–1 антитело, один содержит молекулу HLA–G, и один содержит молекулу CD39 или молекулу CD73. В некоторых вариантах осуществления изобретения, анти–PD–1 антитело заменяют молекулой мутеина IL–2.

Линкерные области

Как обсуждается в настоящей заявке, специфически нацеливающие молекулы и молекулы, связывающиеся с эффектором/модулирующие эффектор, могут быть связаны посредством линкерных областей. В качестве линкера может быть использована любая описанная здесь линкерная область. Так, например, линкерные области А и В могут содержать Fc-области. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит линкерную область, которая может подвергаться самосборке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит линкерную область, которая имеет молекулу, минимизирующую самосборку, а обычно, линкерная область А и линкерная область В являются гетеродимерами. Линкерами также являются глициновые/сериновые линкеры. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер может содержать один или более повторов GGGGS (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер содержит 1, 2, 3, 4 или 5 повторов SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер содержит GGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 22) или GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 30). Эти линкеры могут быть использованы в любых описанных здесь терапевтических соединениях или композициях.

Линкерная область может содержать Fc-область, которая была модифицирована (например, мутирована) с образованием гетеродимера. В некоторых вариантах осуществления изобретения, домен CH3 Fc-области может быть мутирован. Примеры таких Fc-областей можно найти, например, в патенте США No. 9574010, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Определенная здесь Fc-область содержит домен CH3 или его фрагмент и может дополнительно содержать один или более дополнительных доменов константной области или их фрагментов, включая шарнирную область, CH1 или CH2. Следует отметить, что нумерация аминокислотных остатков Fc соответствует EU-индексу как указано в публикации Kabat et al., 1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va. Термин «EU-индекс по Кэбату» означает нумерацию человеческого антитела IgG1 по Кэбату в соответствии с EU-индексом. Для удобства, в Таблице В патента США No. 9574010 представлены аминокислоты, пронумерованные в соответствии с EU-индексом по Кэбату для доменов CH2 и CH3 человеческого IgG1, где указанный патент вводится в настоящее описание посредством ссылки. В Таблице 1.1 патента США No. 9574010 представлены мутации модифицированных гетеродимеров Fc, которые могут быть использованы как линкерные области. Таблица 1.1 патента США No. 9574010 вводится в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкерная область А содержит первый полипептид домена CH3, а линкерная область В содержит второй полипептид домена CH3, где первый и второй полипептид домена CH3 независимо содержат аминокислотные модификации по сравнению с полипептидом домена CH3 дикого типа, где первый полипептид домена CH3 содержит аминокислотные

модификации в положениях T350, L351, F405 и Y407, а второй полипептид домена CH3 содержит аминокислотные модификации в положениях T350, T366, K392 и T394, где аминокислотными модификациями в положении T350 являются T350V, T350I, T350L или T350M; аминокислотной модификацией в положении L351 является L351Y; аминокислотной модификацией в положении F405 является F405A, F405V, F405T или F405S; аминокислотной модификацией в положении Y407 является Y407V, Y407A или Y407I; аминокислотной модификацией в положении T366 является T366L, T366I, T366V или T366M, аминокислотной модификацией в положении K392 является K392F, K392L или K392M, а аминокислотной модификацией в положении T394 является T394W, и где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу по Кэбату.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении K392 является K392M или K392L. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении T350 является T350V. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый полипептид домена CH3 также содержит одну или более аминокислотных модификаций, выбранных из Q347R и одной из S400R или S400E. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй полипептид домена CH3 также содержит одну или более аминокислотных модификаций, выбранных из L351Y, K360E и одной из N390R, N390D или N390E. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый полипептид домена CH3 также содержит одну или более аминокислотных модификаций, выбранных из Q347R и одной из S400R или S400E, а второй полипептид домена CH3 также содержит одну или более аминокислотных модификаций, выбранных из L351Y, K360E и одной из N390R, N390D или N390E. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении T350 является T350V. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении F405 является F405A. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении Y407 является Y407V. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении T366 является T366L или T366I. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении F405 является F405A, аминокислотной модификацией в положении Y407 является Y407V, аминокислотной модификацией в положении T366 является T366L или T366I, а аминокислотной модификацией в положении K392 является K392M или K392L. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый полипептид домена CH3 содержит аминокислотные модификации T350V, L351Y, S400E, F405V и Y407V, а второй полипептид домена CH3 содержит аминокислотные модификации T350V, T366L, N390R, K392M и T394W. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый полипептид домена CH3 содержит аминокислотные модификации T350V, L351Y, S400E, F405T и Y407V, а второй полипептид домена CH3 содержит аминокислотные модификации T350V, T366L, N390R, K392M и T394W. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый полипептид домена CH3 содержит аминокислотные

модификации T350V, L351Y, S400E, F405S и Y407V, а второй полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации T350V, T366L, N390R, K392M и T394W. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации T350V, L351Y, S400E, F405A и Y407V, а второй полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации T350V, L351Y, T366L, N390R, K392M и T394W. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации Q347R, T350V, L351Y, S400E, F405A и Y407V, а второй полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации T350V, K360E, T366L, N390R, K392M и T394W. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации T350V, L351Y, S400R, F405A и Y407V, а второй полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации T350V, T366L, N390D, K392M и T394W. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации T350V, L351Y, S400R, F405A и Y407V, а второй полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации T350V, T366L, N390E, K392M и T394W. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации T350V, L351Y, S400E, F405A и Y407V, а второй полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации T350V, T366L, N390R, K392L и T394W. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации T350V, L351Y, S400E, F405A и Y407V, а второй полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации T350V, T366L, N390R, K392F и T394W.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, выделенный гетеромультимер содержит гетеродимерный домен СНЗ, содержащий первый полипептид домена СНЗ и второй полипептид домена СНЗ, где первый полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации в положениях F405 и Y407, а второй полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации в положениях T366 и T394, где: (i) первый полипептид домена СНЗ также содержит аминокислотную модификацию в положении L351, и (ii) второй полипептид домена СНЗ также содержит аминокислотную модификацию в положении K392, где аминокислотной модификацией в положении F405 является F405A, F405T, F405S или F405V; аминокислотной модификацией в положении Y407 является Y407V, Y407A, Y407L или Y407I; аминокислотной модификацией в положении T394 является T394W; аминокислотной модификацией в положении L351 является L351Y; аминокислотной модификацией в положении K392 является K392L, K392M, K392V или K392F, а аминокислотной модификацией в положении T366 является T366I, T366L, T366M или T366V, где гетеродимерный домен СНЗ имеет температуру плавления (T_m) приблизительно 70°C или более и чистоту более, чем приблизительно 90%, и где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу по Кэбату.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкерная область А содержит первый полипептид домена СНЗ, а линкерная область В содержит второй

полипептид домена СНЗ, где первый полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации в положениях F405 и Y407, а второй полипептид домена СНЗ содержит аминокислотные модификации в положениях T366 и T394, где: (i) первый полипептид домена СНЗ также содержит аминокислотную модификацию в положении L351, и (ii) второй полипептид домена СНЗ также содержит аминокислотную модификацию в положении K392, где аминокислотной модификацией в положении F405 является F405A, F405T, F405S или F405V; аминокислотной модификацией в положении Y407 является Y407V, Y407A, Y407L или Y407I; аминокислотной модификацией в положении T394 является T394W; аминокислотной модификацией в положении L351 является L351Y; аминокислотной модификацией в положении K392 является K392L, K392M, K392V или K392F, а аминокислотной модификацией в положении T366 является T366I, T366L, T366M или T366V, где гетеродимерный домен СНЗ имеет температуру плавления (T_m) приблизительно 70°C или более и чистоту более, чем приблизительно 90%, и где нумерация аминокислотных остатков соответствует EU-индексу по Кэбату. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении F405 является F405A. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении T366 является T366I или T366L. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении Y407 является Y407V. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении F405 является F405A, аминокислотной модификацией в положении Y407 является Y407V, аминокислотной модификацией в положении T366 является T366I или T366L, а аминокислотной модификацией в положении K392 является K392L или K392M. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении F405 является F405A. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении Y407 является Y407V, аминокислотной модификацией в положении T366 является T366L, а аминокислотной модификацией в положении K392 является K392M. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении F405 является F405A, аминокислотной модификацией в положении Y407 является Y407V, аминокислотной модификацией в положении T366 является T366L, а аминокислотной модификацией в положении K392 является K392M. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении F405 является F405A. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении Y407 является Y407V, аминокислотной модификацией в положении T366 является T366L, а аминокислотной модификацией в положении K392 является K392L. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении F405 является F405A, аминокислотной модификацией в положении Y407 является Y407V, аминокислотной модификацией в положении T366 является T366I, а аминокислотной модификацией в положении K392 является K392M. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в

положении F405 является F405A, аминокислотной модификацией в положении Y407 является Y407V, аминокислотной модификацией в положении T366 является T366I, а аминокислотной модификацией в положении K392 является K392L. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый полипептид домена CH3 также содержит аминокислотную модификацию в положении S400, выбранную из S400D и S400E, а второй полипептид домена CH3 также содержит аминокислотную модификацию N390R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, аминокислотной модификацией в положении F405 является F405A, аминокислотной модификацией в положении Y407 является Y407V, аминокислотной модификацией в положении S400 является S400E, аминокислотной модификацией в положении T366 является T366L, а аминокислотной модификацией в положении K392 является K392M.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, модифицированный первый и второй домены CH3 состоят из конструкции Fc на основе иммуноглобулина типа G (IgG). IgG может представлять собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Другие линкерные области A и линкерные области B, содержащие модифицированные домены CH3, описаны в патентах США NN: 9499634 и 9562109, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Линкерная область A и линкерная область B могут представлять собой комплементарные фрагменты белка, например, природного белка, такого как альбумин человеческой сыворотки. В одном варианте, одна из линкерных областей A и B содержит первый, например, N-концевой фрагмент белка, например, hSA, а другая содержит второй, например, C-концевой фрагмент белка, например, hSA. В одном варианте, фрагменты содержат N-концевой и C-концевой фрагмент. В одном варианте, фрагменты содержат два внутренних фрагмента. Обычно, эти фрагменты не перекрываются. В одном варианте, первый и второй фрагмент, взятые вместе, составляют полноразмерную последовательность исходного белка, например, hSA. Первый фрагмент предоставляет N-конец и C-конец для связывания с другими последовательностями, например, для присоединения к другим последовательностям, например, последовательностям R1, R2, R3 или R4 (как определено в настоящей заявке).

Линкерная область A и линкерная область B могут происходить от полипептида альбумина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид альбумина выбран из полипептида нативного альбумина человеческой сыворотки и полипептида человеческого аллоальбумина. Полипептид альбумина может быть модифицирован так, чтобы линкерная область A и линкерная область B взаимодействовали друг с другом с образованием гетеродимеров. Примеры модифицированных полипептидов альбумина описаны в патентах США NN: 9388231 и 9499605, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В соответствии с этим, в настоящей заявке описаны мультифункциональные гетеромультимерные белки формулы R1 – линкерная область A – R2 и R3 – линкерная область B – R4, где линкерная область A и линкерная область B образуют

гетеромультимер. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкерная область А содержит первый полипептид, а линкерная область В содержит второй полипептид, где каждый из указанных первого и второго полипептидов содержит аминокислотную последовательность, включающую сегмент полипептида альбумина, выбранного из полипептида нативного альбумина человеческой сыворотки и полипептида человеческого аллоальбумина, где указанный первый и второй полипептиды получают путем сегментирования указанного полипептида альбумина в сайте сегментации так, чтобы такая сегментация приводила к делеции от 0 до 3 аминокислотных остатков в сайте сегментации, где указанный первый полипептид содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из A194C, L198C, W214C, A217C, L331C и A335C, а указанный второй полипептид содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из L331C, A335C, V343C, L346C, A350C, V455C, и N458C, и где указанные первый и второй полипептид подвергаются самосборке с образованием квази-нативной структуры мономерной формы полипептида альбумина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, сайт сегментации остается на петле полипептида альбумина, который имеет площадь поверхности с высокой доступностью к растворителю (SASA) и ограниченный контакт с остальной структурой альбумина, где б) сегментация приводит к образованию комплементарной пограничной области между транспортными полипептидами. Эти сайты сегментации описаны, например, в патенте США No 9388231, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый полипептид содержит остатки 1–337 или остатки 1–293 полипептида альбумина с одной или более описанными здесь мутациями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй полипептид содержит остатки 342–585 или 304–585 полипептида альбумина с одной или более описанными здесь мутациями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый полипептид содержит остатки 1–339, 1–300, 1–364, 1–441, 1–83, 1–171, 1–281, 1–293, 1–114, 1–337 или 1–336 белка альбумина. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второй полипептид содержит остатки 301–585, 365–585, 442–585, 85–585, 172–585, 282–585 или 115–585, 304–585, 340–585 или 342–585 белка альбумина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый и второй полипептид содержат остатки белка альбумина, представленные ниже в таблице. Последовательность белка альбумина описана ниже.

Остатки первого полипептида	Остатки второго полипептида
1–300	301–585
1–364	365–585
1–441	442–585
1–83	85–585
1–171	172–585

1–281	282–585
1–114	115–585
1–339	340–585
1–337	342–585
1–293	304–585
1–336	342–585

В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый и второй полипептиды содержат линкер, который может образовывать ковалентную связь между ними, такую как дисульфидная связь. Неограничивающим примером линкера является пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептидный линкер содержит GGGGS. Линкер может быть присоединен к С–концу первого полипептида и к N–концу второго полипептида. Линкер может быть также использован для связывания с описанными здесь молекулами, но так, чтобы это не влияло на способность линкеров образовывать дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый и второй полипептиды не содержат линкера, который может образовывать ковалентную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первый и второй полипептиды имеют следующие замены.

Замена первого полипептида	Замена второго полипептида
A217C	V343C
L331C	A350C
A217C	L346C
W214C	V343C
A335C	L346C
L198C	V455C
A217C	A335C
A217C	L331C
L198C	N458C
A194C	V455C

Последовательность полипептида альбумина может представлять собой последовательность человеческого альбумина в виде белка в конечной форме с удаленными N–концевыми сигнал–передающими остатками (MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFR)

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCV
ADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNP
NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFT
ECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQ
RFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKEC
CEKPLLEKSH

CIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLL
 LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFEQLGEYKFQN
 ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL
 HEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQI
 KKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAAASQ
 AALGL (человеческой альбумин).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкерная область А и линкерная область В образуют гетеродимер, описанный в настоящей заявке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, полипептид содержит у N-конца антитело, состоящее из $F(ab')_2$ на Fc-остове IgG1, присоединенном к scFv на C-конце Fc-остова IgG. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-остовом IgG является Fc-остов IgG1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, остов IgG1 заменен остовом IgG4, остовом IgG2 или другим аналогичным остовом IgG. Остовы IgG, описанные в этом параграфе, могут быть использованы во всем описании настоящей заявки, где Fc-область означает часть терапевтического соединения. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело, состоящее из $F(ab')_2$ на Fc-остове IgG1, может представлять собой анти-MAdCAM антитело или анти-PD-1 антитело на Fc IgG1 или любую другую описанную здесь нацеливающую молекулу или молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сегменты scFv, связанные с C-концом, могут представлять собой анти-PD-1 антитело, если N-концевой областью является анти-MAdCAM антитело, или анти-MAdCAM антитело, если N-концевой областью является анти-PD-1 антитело. В этом неограничивающем примере, N-концом может быть нацеливающая молекула, такая как любая из описанных здесь молекул, а C-концом может быть молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, такая как любая из описанных здесь молекул. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления изобретения, N-концом может быть молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, такая как любая из описанных здесь молекул, а C-концом может быть нацеливающая молекула, такая как любая из описанных здесь молекул.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, N-концом может быть нацеливающая молекула, такая как любая из описанных здесь молекул, а C-концом может быть молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, такая как любая из описанных здесь молекул.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит два полипептида, которые подвергаются гомодимеризации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, N-конец полипептида содержит молекулу связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, которая присоединена к Fc-домену человеческого IgG1 (например, к доменам CH2 и/или CH3). В некоторых вариантах осуществления изобретения, C-конец Fc-домена представляет собой другой

линкер, который присоединен к нацеливающей молекуле. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула может быть представлена формулой: R1– линкер А – Fc–область – линкер В – R2, где R1 может представлять собой молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, R2 представляет собой нацеливающую молекулу, а линкер А и линкер В независимо представляют собой описанные здесь линкеры. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер 1 и линкер 2 являются различными.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекула может быть представлена формулой: R1 – линкер А – Fc–область – линкер В – R2, где R1 может представлять собой нацеливающую молекулу, R2 представляет собой молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, а линкер А и линкер В независимо представляют собой описанные здесь линкеры. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В являются различными. Линкеры могут быть выбраны из неограничивающих примеров, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, R1 и R2 независимо выбраны из доменов антитела F(ab')₂ и scFv. В некоторых вариантах осуществления изобретения, R1 и R2 представляют собой различные домены антител. В некоторых вариантах осуществления изобретения, scFv находится в ориентации домена VL–VH.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическим соединением является биспецифическое антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения, биспецифические антитела состоят из четырех полипептидных цепей, включающих:

Цепь 1: nt–VH1–CH1–CH2–CH3–линкер А–scFv[VL2–линкер В–VH2]–ct

Цепь 2: nt–VH1–CH1–CH2–CH3–линкер А–scFv[VL2–линкер В–VH2]–ct

Цепь 3: nt–VL1–CL–ct

Цепь 4: nt–VLI–CL–ct

где цепи 1 и 2 являются идентичными, и цепи 3 и 4 являются идентичными,

где цепь 1 образует гомодимер с цепью 2, а цепи 3 и 4 связаны с цепью 1 и цепью 2. То есть, если каждая легкая цепь связана с каждой тяжелой цепью, то VL связан с VH1, а CL связан с CH1 с образованием двух функциональных звеньев Fab. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что каждое звено scFv является функциональным по своей природе, поскольку VL2 и VH2 ковалентно связаны в tandem с представленным здесь линкером (например, GGGGSG (SEQ ID NO: 23), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 22), или GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 30). Последовательности линкера А и линкера В, которые не зависят друг от друга, могут быть одинаковыми или различными, и так или иначе описаны в настоящей заявке. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А содержит GGGGSG (SEQ ID NO: 23), или два их повтора, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 30) или GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер В содержит GGGGSG (SEQ ID NO: 23), или два их повтора, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 30) или GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

(SEQ ID NO: 22). scFv может быть расположен в ориентации NT–VH2–VL2–CT или NT–VL2–VH2–CT. NT или nt означает N–конец, а CT или ct означает C–конец белка. CH1, CH2 и CH3 представляют собой домены Fc–области IgG, а CL означает константную легкую цепь, которая может представлять собой легкие цепи семейства каппа или лямбда. Другие определения имеют общепринятое значение, используемое в литературе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, домены VH1 и VL1 происходят от эффекторной молекулы, а домены VH2 и VL2 происходят от нацеливающей молекулы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, домены VH1 и VL1 происходят от нацеливающей молекулы, а домены VH2 и VL2 происходят от молекулы, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, домены VH1 и VL1 происходят от анти–PD–1 антитела, а домены VH2 и VL2 происходят от анти–MAdCAM антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения, домены VH1 и VL1 происходят от анти–MAdCAM антитела, а VH2 и VL2 происходят от анти–PD–1 антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А содержит 1, 2, 3, 4 или 5 повторов GGGGSG (SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер В содержит 1, 2, 3, 4 или 5 повторов GGGGSG (SEQ ID NO: 23). Во избежание разночтений, последовательности линкера А и линкера В, которые используются во всем описании настоящей заявки, указываются независимо друг от друга. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В могут быть одинаковыми или различными. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А содержит GGGGSG (SEQ ID NO: 23) или два их повтора, GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 30) или GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер В содержит GGGGSG (SEQ ID NO: 23) или два их повтора, GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 30) или GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 22).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит легкую цепь и тяжелую цепь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, легкая и тяжелая цепи начинаются у N–конца с домена VH нацеливающей молекулы, за которым следует домен CH1 человеческого IgG1, который присоединен к Fc–области (например, CH2–CH3) человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, у C–конца, Fc–область присоединена к описанному здесь линкеру, такому как, но не ограничивающемуся ими, GGGGSG (SEQ ID NO: 23) или два или три их повтора, или GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 22). Затем линкер может быть присоединен к молекуле, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, такой как любая из описанных здесь молекул эффектора. Полипептиды могут гомодимеризоваться посредством гомодимеризации тяжелой цепи, в результате чего может быть получено терапевтическое соединение, имеющее две эффекторных молекулы, таких как два анти–PD–1 антитела. В этой ориентации, нацеливающая молекула имеет форму IgG, при этом присутствуют две цепи Fab, каждая из которых распознает партнера

по связыванию нацеливающей молекулы, например, MAdCAM, связанной с нацеливающей молекулой против MAdCAM.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, если терапевтическое соединение содержит Fc-часть, то Fc-домен (часть) несет мутации, сообщающие Fc-области «отсутствие эффекторных свойств», то есть, неспособность связываться с FcR. Мутации, которые делают Fc-области неэффекторными, являются известными. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мутации в Fc-области, которые пронумерованы в соответствии с известной системой нумерации, выбраны из группы, состоящей из K322A, L234A, L235A, G237A, L234F, L235E, N297, P331S или любых их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-мутации включают мутацию в L234 и/или L235 и/или G237. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-мутации включают мутации в L234A и/или L235A, которые могут обозначаться здесь как мутации LALA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, Fc-мутации включают мутации L234A, L235A и G237A.

В настоящей заявке раскрываются полипептиды линкерной области, терапевтические пептиды и нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептиды (например, терапевтические соединения), векторы, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, и клетки, содержащие нуклеиновые кислоты или векторы.

Терапевтические соединения могут содержать множество специфически нацеливающих молекул. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит множество специфически нацеливающих молекул, множество копий донор-специфических нацеливающих молекул, или множество тканеспецифических нацеливающих молекул. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит первую и вторую донор-специфическую нацеливающую молекулу, например, первую донор-специфическую нацеливающую молекулу, специфичную к первой мишени донора, и вторую донор-специфическую нацеливающую молекулу, специфичную ко второй мишени донора, например, где первая и вторая мишени присутствуют на одной и той же донорской ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит, например, первую специфически нацеливающую молекулу, нацеленную на тканеспецифическую мишень, и вторую специфически нацеливающую молекулу для второй мишени, например, где первая и вторая мишени присутствуют на одной и той же или на различных тканях мишени.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит множество молекул, связывающихся с эффектором/модулирующих эффектор, каждая из которых включает ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, где число ICIM-связывающих/ICIM-модулирующих молекул является достаточно низким, чтобы минимизировать кластеризацию лиганда ICIM-связывающей/ICIM-модулирующей молекулы на иммунных клетках (в отсутствие связывания с мишенью), например, во избежание системной активации иммунных клеток в отсутствие связывания

терапевтического соединения с мишенью.

Полипептиды, происходящие от эталонных, например, от человеческих полипептидов

В некоторых вариантах осуществления изобретения, компонент терапевтической молекулы происходит от эталонной молекулы или был получен на основе эталонной молекулы, например, в случае терапевтической молекулы, используемой для введения человеку, от природного человеческого полипептида. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, все молекулы или часть молекулы CD39, молекулы CD73, молекулы, связывающейся с молекулой клеточной поверхности, донор-специфической нацеливающей молекулы, молекулы, связывающейся с лигандом эффектора, ICIM-связывающей/ICIM-модулирующей молекулы, IC-связывающей/IC-модулирующей молекулы, молекулы лиганда ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки, молекулы противолганда ингибирующей молекулы, SM-связывающей/SM-модулирующей молекулы, специфически нацеливающей молекулы, молекулы, связывающейся с лигандом мишени или тканеспецифической нацеливающей молекулы, могут быть получены на основе или могут происходить от природного человеческого полипептида. Так, например, молекул PD-L1 может быть получена на основе или может происходить от последовательности человеческого PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, компонент терапевтического соединения, например, молекулы PD-L1:

a) содержит весь человеческой полипептид в природной форме или его часть, например, активную часть;

b) содержит весь человеческой полипептид или его часть, например, активную часть, имеющую последовательность, находящуюся в базе данных, например, в базе данных GenBank с 11 января 2017, в природной форме, которая не ассоциируется с патологическим состоянием;

c) содержит человеческой полипептид, последовательность которого отличается не более, чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 или 30 аминокислотных остатков от последовательности a) или b);

d) содержит человеческой полипептид, последовательность которого отличается не более, чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 или 30% аминокислотных остатков от последовательности a) или b)

e) содержит человеческой полипептид, имеющий последовательность, которая, по существу, не отличается от последовательности a) или b); или

f) содержит человеческой полипептид, имеющий последовательность c), d) или e), которые, по своей биологической активности, например, способности усиливать или ингибировать иммунный ответ, по существу, не отличаются от человеческого полипептида, имеющего последовательность a) или b).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтические соединения могут содержать множество молекул, связывающихся с эффектором/модулирующих

эффектор. Так, например, терапевтическое соединение может содержать две или более из нижеследующих молекул, выбранных из:

(а) ICIM–связывающей/ICIM–модулирующей молекулы; (b) IC–связывающей/IC–модулирующей молекулы; (c) SM–связывающей/SM–модулирующей молекулы или (d) ICSM–связывающей/ICSM–модулирующей молекулы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, например, терапевтическое соединение может содержать множество, например, две ICIM–связывающих/ICIM–модулирующих молекулы (где указанные молекулы являются одинаковыми или различными), например, две молекулы, которые активируют или индуцируют PD-1; множество, например, две IC–связывающих/IC–модулирующих молекулы (где указанные молекулы являются одинаковыми или различными); множество, например, две SM–связывающих/SM–модулирующих молекулы (где указанные молекулы являются одинаковыми или различными), или множество, например, две ICSM–связывающих/ICSM–модулирующих молекулы (где указанные молекулы являются одинаковыми или различными). В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение может содержать ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу и IC–связывающую/IC–модулирующую молекулу; ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу и SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу; IC–связывающую/IC–модулирующую молекулу и SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу; ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу и ICSM–связывающую/ICSM–модулирующую молекулу; IC–связывающую/IC–модулирующую молекулу и ICSM–связывающую/ICSM–модулирующую молекулу; или ICSM–связывающую/ICSM–модулирующую молекулу и SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение содержит множество нацеливающих молекул. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нацеливающие молекулы могут быть одинаковыми или различными.

Фармацевтические композиции и наборы

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к композициям, например, фармацевтически приемлемым композициям, которые включают описанное здесь терапевтическое соединение, приготовленное вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и т.п., которые являются физиологически совместимыми.

Носитель может быть подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, ректального, местного, офтальмического, локального, интраспинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или вливания). Используемый здесь термин «носитель» означает разбавитель, адъювант или наполнитель, вместе с которыми вводят соединение. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фармацевтические носители могут также представлять собой

жидкости, такие как вода и масла, включая вазелиновое масло, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Фармацевтические носители могут также представлять собой физиологический раствор, аравийскую камедь, желатин, крахмальную пасту, тальк, кератин, коллоидную двуокись кремния, мочевины и т.п. Кроме того, могут быть использованы вспомогательные, стабилизирующие агенты, загустители, лубриканты и красители. Носители могут быть использованы в фармацевтических композициях, содержащих описанные здесь терапевтические соединения.

Композиции и соединения согласно вариантам изобретения могут быть получены в различных формах. Таковыми формами являются, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и вливания), дисперсии или суспензии, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма зависит от способа введения и терапевтического применения. Типичными композициями являются композиции в форме растворов для инъекций или вливаний. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способом введения является парентеральное введение (например, внутривенное, подкожное, внутрибрюшинное, внутримышечное введение). В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическую молекулу вводят путем внутривенного вливания или внутривенной инъекции. В другом варианте осуществления изобретения, терапевтическую молекулу вводят путем внутримышечной или подкожной инъекции. В другом варианте осуществления изобретения, терапевтическую молекулу вводят местно, например, путем инъекции или местного нанесения на участок-мишень. Используемые здесь термины «парентеральное введение» и «парентерально вводимый» относятся к способам введения, которые не являются способами энтерального и местного введения, а обычно проводятся путем инъекции, и такое введение включает, но не ограничивается ими, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, интракардиальную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутривertebralную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрестермальную инъекцию и инфузию.

Обычно, терапевтические композиции должны быть стерильными и стабильными в условиях их приготовления и хранения. Композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для введения терапевтической молекулы в высокой концентрации. Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения активного соединения (то есть, терапевтической молекулы) в необходимом количестве в соответствующем растворителе вместе с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, если это необходимо, с последующей стерилизацией путем фильтрации. Вообще говоря, дисперсии получают путем включения активного

соединения в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из числа ингредиентов, перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций, предпочтительными методами приготовления являются вакуумная сушка и лиофилизация, в результате которых может быть получен порошок из активного ингредиента плюс любой дополнительный нужный ингредиент ранее стерильно отфильтрованного раствора. Соответствующая текучесть раствора может поддерживаться, например, путем нанесения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии, и с использованием поверхностно-активных веществ. Пролонгированная абсорбция инъецируемых композиций может быть достигнута путем включения в композицию агента, который замедляет всасывание, например, моностеаратных солей и желатина.

Как очевидно для специалиста в данной области, способ и/или схема введения могут варьироваться в зависимости от желаемых результатов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, активное соединение может быть получено с использованием носителя, который защищает соединение от его быстрого высвобождения, например, оно может быть получено в виде препарата с пролонгированным высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие методы приготовления таких препаратов являются запатентованными или, по существу, известными специалистам в данной области. См., например, *Sustained & Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение может быть введено перорально, например, вместе с инертным разбавителем или легко усваиваемым пищевым носителем. Соединение (и другие ингредиенты, если это желательно) могут быть также заключены в твердую или мягкую желатиновую капсулу, спрессованы в таблетки или непосредственно включены в пищу индивидуума. Для перорального терапевтического введения, соединения могут быть введены вместе с наполнителями, и используются в форме таблеток для проглатывания, таблеток для трансбуккального введения, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток и т.п. Для введения соединения другим, не парентеральным, способом может оказаться необходимым покрытие этого соединения веществом, предотвращающим его инактивацию, или совместное введение такого соединения с этим веществом. Терапевтические композиции могут быть также введены с помощью медицинских устройств, известных специалистам.

Схемы введения доз корректируют для обеспечения оптимально нужного ответа (например, терапевтического ответа). Так, например, может быть введена одна ударная доза, а через определенное время могут быть введены несколько дробных доз, либо доза

может быть пропорционально снижена или увеличена по показаниям в случае чрезвычайной терапевтической ситуации. Для облегчения введения и достижения однородной дозы, парентеральные композиции особенно предпочтительно приготавливать в унифицированной лекарственной форме. Используемая здесь унифицированная лекарственная форма означает физически дискретные единицы, подходящие для использования в виде унитарных доз для лечения индивидуума, где каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, вычисленное так, чтобы оно, в комбинации с требуемым фармацевтическим носителем, давало желаемый терапевтический эффект. Спецификация унифицированных лекарственных форм определяется и непосредственно зависит от (а) уникальных свойств активного соединения и конкретно достигаемого терапевтического эффекта, и (b) ограничений, известных специалистам по приготовлению лекарственных средств, таких как активное соединение для устранения гиперчувствительности у индивидуумов.

Репрезентативные неограничивающие пределы для терапевтически или профилактически эффективных количеств терапевтического соединения составляют 0,1–30 мг/кг, а более предпочтительно, 1–25 мг/кг. Дозы и схемы терапевтического введения терапевтического соединения могут быть определены специалистами. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение вводят путем инъекции (например, подкожно или внутривенно) в дозе приблизительно 1–40 мг/кг, например, 1–30 мг/кг, например, приблизительно 5–25 мг/кг, приблизительно 10–20 мг/кг, приблизительно 1–5 мг/кг, 1–10 мг/кг, 5–15 мг/кг, 10–20 мг/кг, 15–25 мг/кг или приблизительно 3 мг/кг. Схема введения доз может варьироваться, например, от одного раза в неделю до одного раза в 2, 3 или 4 недели. В одном из вариантов осуществления изобретения, терапевтическое соединение вводят в дозе приблизительно 10–20 мг/кг раз в неделю. Терапевтическое соединение может быть введено путем внутривенного вливания со скоростью более, чем 20 мг/мин, например, 20–40 мг/мин, а обычно, 40 мг/мин или более, в дозе приблизительно 35–440 мг/м², обычно 70–310 мг/м², а еще чаще приблизительно 110–130 мг/м². В одном из вариантов осуществления изобретения, скорость вливания составляет приблизительно 110–130 мг/м² в дозе приблизительно 3 мг/кг. В других вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение может быть введено путем внутривенного вливания со скоростью менее, чем 10 мг/мин, например, 5 мг/мин или менее в дозе приблизительно 1–100 мг/м², например, приблизительно 5–50 мг/м², приблизительно 7–25 мг/м² или приблизительно 10 мг/м². В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическое соединение вводят путем вливания в течение приблизительно 30 минут. Следует отметить, что величины доз могут варьироваться в зависимости от типа и тяжести состояния, подвергаемого лечению. Следует также отметить, что для любого конкретного индивидуума, конкретные схемы введения доз должны быть скорректированы по времени в соответствии с потребностями индивидуума и профессиональной оценкой специалиста, осуществляющего введение или мониторинг введения композиций, и что описанные здесь интервалы доз приводятся лишь

в иллюстративных целях и не рассматриваются как ограничение объема или практического использования заявленной композиции.

Фармацевтические композиции могут включать «терапевтически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» терапевтической молекулы. «Терапевтически эффективное количество» означает количество, которое при его введении в необходимых дозах и в течение необходимого периода времени, является эффективным для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество терапевтической молекулы может варьироваться в зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, возраст, пол и масса индивидуума и способность терапевтического соединения вырабатывать нужный ответ у индивидуума. Терапевтически эффективным количеством также является количество, которое не дает любых токсических или нежелательных эффектов терапевтической молекулы, превышающих терапевтически благоприятные эффекты. «Терапевтически эффективная доза» предпочтительно, ингибирует детектируемый параметр, например, иммунную атаку по меньшей мере приблизительно на 20%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60%, а еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80%, по сравнению с индивидуумами, не подвергаемыми лечению. Способность соединения ингибировать детектируемый параметр, например, иммунную атаку, может быть оценена у животного с моделью предсказанной эффективности лечения отторжения трансплантата или аутоиммунных расстройств. Альтернативно, такое свойство композиции может быть оценено путем определения способности соединения к ингибированию, такому как ингибирование *in vitro*, с помощью анализов, известных специалистам.

«Профилактически эффективное количество» означает количество, которое при его введении в необходимых дозах и в течение необходимого периода времени, является эффективным для достижения желаемого профилактического результата. Обычно, поскольку профилактическую дозу вводят индивидууму до развития заболевания или на ранней стадии заболевания, то профилактически эффективное количество должно быть меньше, чем терапевтически эффективное количество.

В объем вариантов осуществления изобретения также входит набор, содержащий описанное здесь терапевтическое соединение. Набор может содержать один или более других элементов, включая инструкции по применению, другие реагенты, например, метку, терапевтическое средство или агент, подходящий для образования хелатного комплекса или какого-либо другого связывания терапевтической молекулы с меткой или другим терапевтическим средством, или радиопротективную композицию; устройства или другие материалы для приготовления терапевтической молекулы для введения; фармацевтически приемлемые носители и устройства или другие материалы для их введения индивидууму.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение также включает варианты, которыми являются, но не ограничиваются ими:

1. Терапевтическое соединение, содержащее:

i) специфически нацеливающую молекулу, выбранную из:

a) донор–специфической нацеливающей молекулы, которая, например, преимущественно связывается с донорной мишенью; или

b) тканеспецифической нацеливающей молекулы, которая, например, преимущественно связывается с тканью–мишенью индивидуума; и

ii) молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор и выбранную из:

(a) молекулы, связывающейся с молекулой, ингибирующей иммунную клетку/модулирующей указанную молекулу (ICIM–связывающей/ICIM–модулирующей молекулы);

(b) иммуносупрессорной молекулы, связывающейся с иммунной клеткой/модулирующей иммунную клетку (ПС–связывающей/ПС–модулирующей молекулы);

(c) молекулы, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, которая, как часть терапевтического соединения, стимулирует иммуносупрессорное локальное микроокружение, например, благодаря присутствию поблизости от мишени вещества, которое ингибирует или минимизирует атаку мишени иммунной системой (SM–связывающей/SM–модулирующей молекулы).

2. Терапевтическое соединение варианта 1, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, непосредственно связывается с ингибирующим рецептором и активирует его.

3. Терапевтическое соединение варианта 2, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, представляет собой ингибирующую молекулу иммунной контрольной точки.

4. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–3, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, экспрессируется иммунной клеткой.

5. Терапевтическое соединение варианта 4, где иммунная клетка участвует в выработке нежелательного иммунного ответа.

6. Терапевтическое соединение вариантов 4 или 5, где иммунная клетка вызывает патологическое состояние.

7. Терапевтическое соединение варианта 1, где способность терапевтической молекулы активировать молекулу, с которой связывается молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, повышается, например, в 2, 5, 10, 100, 500 или 1000 раз, если терапевтическое соединение связано с мишенью посредством нацеливающей молекулы, по сравнению с терапевтическим соединением, которое не связано с мишенью посредством нацеливающей молекулы.

8. Терапевтическое соединение вариантов 1–7, где в случае связывания мономера (или связывания, если терапевтическое соединение не является мультимеризованным) со

своим когнатным лигандом, например, ингибирующая молекула иммунной контрольной точки не активирует или, в основном, не активирует когнатный лиганд.

9. Терапевтическое соединение вариантов 1–8, где при терапевтически эффективной дозе терапевтического соединения происходит значительная системная активация молекулы, с которой связывается молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор.

10. Терапевтическое соединение вариантов 1–9, где при терапевтически эффективной дозе терапевтического соединения, активация молекулы, с которой связывается молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, происходит, в основном, только в сайте–мишени, с которым связывается нацеливающая молекула.

11. Терапевтическое соединение вариантов 1–9, где связывание терапевтического соединения со своим когнатным лигандом, например, с ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки, не ингибирует или, в основном, не ингибирует связывание эндогенного противолганда с когнатным лигандом, например, с ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки.

12. Терапевтическое соединение вариантов 1–11, где связывание молекулы, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, со своим когнатным лигандом, ингибирует связывание эндогенного противолганда с когнатным лигандом молекулы, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, менее, чем на 60, 50, 40, 30, 20, 10 или 5%.

14. Терапевтическое соединение вариантов 1–11, где связывание молекулы, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор, с когнатным лигандом, в основном, не приводит к активации когнатного лиганда молекулы, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор.

15. Терапевтическое соединение варианта 1, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу.

16. Терапевтическое соединение варианта 15, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу, которая включает молекулу лиганда ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки.

17. Терапевтическое соединение варианта 16, где молекула противолганда ингибирующей иммунной молекулы содержит молекулу PD–L1.

18. Терапевтическое соединение варианта 15, где ICIM, если она представляет собой молекулу противолганда ингибирующей иммунной молекулы, связывается с когнатной ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки, выбранной из PD–1, KIR2DL4, LILRB1, LILRB или CTLA–4.

19. Терапевтическое соединение варианта 18, где ICIM представляет собой антитело.

20. Терапевтическое соединение варианта 18, где ICIM содержит антитело, которое связывается с PD-1, KIR2DL4, LILRB1, LILRB или CTLA-4.

21. Терапевтическое соединение варианта 20, где антителом является антитело, которое связывается с PD-1.

22. Терапевтическое соединение варианта 20, где антителом является антитело, которое связывается с PD-1 и представляет собой агонист PD-1.

23. Терапевтическое соединение варианта 20, где антителом является антитело, которое связывается с PD-1 и представляет собой агонист PD-1, если оно связывается в сайте-мишени.

22. Терапевтическое соединение варианта 16, где молекула противолганда ингибирующей иммунной молекулы содержит молекулу HLA-G.

25. Терапевтическое соединение варианта 15, где ICIM, если она представляет собой молекулу противолганда ингибирующей иммунной молекулы, связывается с когнатной ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки, выбранной из PD-1, KIR2DL4, LILRB1, LILRB или CTLA-4.

26. Терапевтическое соединение варианта 15, где молекула противолганда ингибирующей иммунной молекулы связывается с когнатной ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки, выбранной из молекул Таблицы 1.

27. Терапевтическое соединение варианта 15, где в случае связывания мономера со своей когнатной ингибирующей молекулой иммунной контрольной точки не происходит активация или, в основном, не происходит активация ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки.

28. Терапевтическое соединение варианта 15, где противолганд ингибирующей иммунной молекулы по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100% гомологичен природному лиганду ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки.

29. Терапевтическое соединение варианта 1, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит ICIM-связывающую/ICIM-модулирующую молекулу, которая включает функциональную молекулу антитела против ингибирующей молекулы клеточной поверхности.

30. Терапевтическое соединение варианта 1, где ингибирующей молекулой клеточной поверхности является ингибирующая молекула иммунной контрольной точки.

31. Соединение варианта 30, где ингибирующая молекула иммунной контрольной точки выбрана из PD-1, KIR2DL4, LILRB1, LILRB, CTLA-4 или из Таблицы 1.

32. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–31, где уровень системной иммунной супрессии при терапевтически эффективной дозе терапевтического соединения меньше, чем уровень, наблюдаемый при стандартном лечении системным иммунодепрессантом (если он используется), или меньше, чем уровень, наблюдаемый при введении эквимольного количества свободной молекулы, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор (не являющейся компонентом терапевтического соединения).

33. Терапевтическое соединение вариантов 1–32, где уровень системной иммунной активации, например, при терапевтически эффективной дозе терапевтического соединения меньше, чем уровень, наблюдаемый при введении эквимольного количества свободной молекулы, связывающейся с эффектором/модулирующей эффектор (не являющейся компонентом терапевтического соединения).

34. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–33, также содержащее другую молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор.

35. Терапевтическое соединение варианта 34, где вторая молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, связывается с другой мишенью, отличающейся от мишени, с которой связывается молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор.

36. Терапевтическое соединение вариантов 34 или 35, где вторая молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, включает ПС–связывающую/ПС–модулирующую молекулу.

Терапевтическое соединение вариантов 34 или 35, где вторая молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, включает SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу.

37. Терапевтическое соединение варианта 1, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, включает ПС–связывающую/ПС–модулирующую молекулу.

38. Терапевтическое соединение варианта 1, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, включает ПС–связывающую/ПС–модулирующую молекулу, которая повышает число, способствует рекрутингу или аккумуляции иммуносупрессорных иммунных клеток в сайте–мишени.

39. Терапевтическое соединение варианта 1, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, включает молекулу, связывающуюся с молекулой клеточной поверхности, которая связывается или специфически связывается с молекулой клеточной поверхности на иммуносупрессорной иммунной клетке.

40. Терапевтическое соединение варианта 1, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, включает молекулу лиганда молекулы клеточной поверхности, которая связывается или специфически связывается с молекулой клеточной поверхности на иммуносупрессорной иммунной клетке.

41. Терапевтическое соединение варианта 1, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, включает молекулу антитела, которая связывается с молекулой клеточной поверхности на иммуносупрессорной иммунной клетке.

42. Терапевтическое соединение любых вариантов 38–41, где иммуносупрессорная иммунная клетка содержит регуляторную Т–клетку, такую как регуляторная Foxp3⁺–CD25⁺–Т–клетка.

43. Терапевтическое соединение любых вариантов 1–42, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, связывается с GARP и,

например, содержит молекулу антитела, которая связывается с GARP на GARP-экспрессирующих иммуносупрессорных клетках, например, Treg.

44. Терапевтическое соединение варианта 1, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит SM-связывающую/SM-модулирующую молекулу.

45. Терапевтическое соединение варианта 44, где SM-связывающая/SM-модулирующая молекула стимулирует иммуносупрессорное локальное микроокружение.

46. Терапевтическое соединение любых вариантов 44 и 45, где молекула, связывающаяся с эффекторной молекулой, повышает доступность, например, посредством увеличения локальной концентрации или количества вещества, которое ингибирует функцию иммунной клетки, например, вещества, которое ингибирует активацию иммунной клетки или функцию активированной иммунной клетки.

47. Терапевтическое соединение любых вариантов 44–46, где молекула, связывающаяся с эффекторной молекулой, связывается с растворимым веществом и аккумулирует растворимое вещество, например, эндогенное или экзогенное вещество, обладающее иммуносупрессорной функцией.

48. Терапевтическое соединение любых вариантов 44–47, где молекула, связывающаяся с эффекторной молекулой, снижает доступность, например, посредством снижения локальной концентрации или секвестрации вещества, которое стимулирует функцию иммунной клетки, например, вещества, которое стимулирует активацию иммунной клетки или функцию активированной иммунной клетки.

49. Терапевтическое соединение любого из вариантов 44–48, где SM-связывающая/SM-модулирующая молекула стимулирует иммуносупрессорное локальное микроокружение, например, благодаря присутствию поблизости от мишени вещества, которое ингибирует или минимизирует атаку мишени иммунной системой.

50. Терапевтическое соединение любого из вариантов 44–49, где SM-связывающая/SM-модулирующая молекула содержит молекулу, которая ингибирует или минимизирует атаку мишени иммунной системой.

51. Терапевтическое соединение любого из вариантов 44–50, где SM-связывающая/SM-модулирующая молекула связывается с растворимым веществом и/или аккумулирует растворимое вещество, например, эндогенное или экзогенное вещество, обладающее иммуносупрессорной функцией.

52. Терапевтическое соединение любого из вариантов 44–51, где SM-связывающая/SM-модулирующая молекула связывает и/или ингибирует, секвестрирует, разлагает или как-либо иначе нейтрализует вещество, например, растворимое вещество, а обычно эндогенное растворимое вещество, которое стимулирует иммунную атаку.

53. Терапевтическое соединение любого из вариантов 44–52, где молекула, связывающаяся с эффекторной молекулой, снижает доступность АТР или АМР.

54. Терапевтическое соединение любого из вариантов 44–53, где SM-связывающая/SM-модулирующая молекула связывается с веществом или содержит

вещество, например, CD39 или CD73, которое истощает компонент, стимулирующий функцию иммунной эффекторной клетки, например, АТР или АМР.

55. Терапевтическое соединение любого из вариантов 44–54, где SM–связывающая/SM–модулирующая молекула содержит молекулу CD39.

56. Терапевтическое соединение любого из вариантов 44–54, где SM–связывающая/SM–модулирующая молекула содержит молекулу CD73.

57. Терапевтическое соединение любого из вариантов 44–54, где SM–связывающая/SM–модулирующая молекула содержит молекулу анти–CD39 антитела.

58. Терапевтическое соединение любого из вариантов 44–54, где SM–связывающая/SM–модулирующая молекула содержит молекулу анти–CD73 антитела.

59. Терапевтическое соединение любого из вариантов 44–54, где молекула, связывающаяся с эффекторной молекулой, содержит иммуносупрессорное вещество, например, фрагмент иммуносупрессорного белка.

60. Терапевтическое соединение любого из вариантов 44–54, где SM–связывающая/SM–модулирующая молекула содержит молекулу щелочной фосфатазы.

61. Терапевтическое соединение варианта 1, где соединение имеет формулу от N–конца до C–конца:

R1– линкерная область А – R2 или R3– линкерная область В – R4,

где каждый R1, R2, R3 и R4 независимо содержит молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, например, ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу, IC–связывающую/IC–модулирующую молекулу или SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу; специфически нацеливающую молекулу, или отсутствует, при условии, что присутствует молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор и специфически нацеливающая молекула.

62. Терапевтическое соединение варианта 61, где каждая из линкерной области А и линкерной области В содержит Fc–область.

63. Терапевтическое соединение варианта 61, где один из R1 и R2 представляет собой анти–PD–1 антитело, и один из R1 и R2 представляет собой анти–MAdCAM антитело.

64. Терапевтическое соединение варианта 61, где R1 представляет собой анти–PD–1 антитело, а R2 представляет собой анти–MAdCAM антитело.

65. Терапевтическое соединение варианта 61, где R1 представляет собой анти–MAdCAM антитело, а R2 представляет собой анти–PD–1 антитело.

66. Терапевтическое соединение варианта 61, где один из R3 и R4 представляет собой анти–PD–1 антитело, и один из R3 и R4 представляет собой анти–MAdCAM антитело.

67. Терапевтическое соединение варианта 61, где R3 представляет собой анти–PD–1 антитело, а R4 представляет собой анти–MAdCAM антитело.

68. Терапевтическое соединение варианта 61, где R3 представляет собой анти–MAdCAM антитело, а R4 представляет собой анти–PD–1 антитело.

69. Терапевтическое соединение любого из вариантов 61–68, где линкер отсутствует.

70. Терапевтическое соединение любого из вариантов 61–68, где линкер представляет собой Fc–область.

71. Терапевтическое соединение любого из вариантов 61–68, где линкер представляет собой глициновый/сериновый линкер, такой как 1, 2, 3, 4 или 5 повторов GGGGSG (SEQ ID NO: 23).

72. Терапевтическое соединение любого из вариантов 61–68, где линкер содержит Fc–область и глициновый/сериновый линкер, такой как 1, 2, 3, 4 или 5 повторов GGGGSG (SEQ ID NO: 23).

73. Терапевтическое соединение любого из вариантов 61–72, где анти–PD–1 антитело представляет собой агонист PD–1.

74. Терапевтическое соединение варианта 61, где:

R1 и R3 независимо содержат функциональную молекулу анти–PD–1 антитела (агониста PD–1); и R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

75. Терапевтическое соединение любого из вариантов 73 и 74, где:

R1 и R3 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, антитела против антигена ткани, и R2 и R4 независимо содержат функциональную молекулу анти–PD–1 антитела (агониста PD–1).

76. Терапевтическое соединение любого из вариантов 73 и 74, где: каждый из R1, R2, R3 и R4 независимо содержит: SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу, которая модулирует, например, связывает и ингибирует, секвестрирует, разлагает или как–либо иначе нейтрализует вещество, например, растворимую молекулу, которая модулирует иммунный ответ, например, АТФ или АМР, например, молекулу CD39 или молекулу CD73; специфически нацеливающую молекулу; или отсутствует;

при условии, что присутствует SM–связывающая/SM–модулирующая молекула и специфически нацеливающая молекула.

77. Терапевтическое соединение варианта 61, где:

R1 и R3 независимо содержат молекулу CD39 или молекулу CD73; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

78. Терапевтическое соединение варианта 77, где:

каждый R1 и R3 содержит молекулу CD39; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

79. Терапевтическое соединение вариантов 61 или 77, где:

каждый R1 и R3 содержит молекулу CD73; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

80. Терапевтическое соединение варианта 61, где:

один из R1 и R3 содержит молекулу CD39, а другой содержит молекулу CD73; и R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

81. Терапевтическое соединение варианта 61, где:

каждый из R1, R2, R3 и R4 независимо содержит молекулу HLA-G; специфически нацеливающую молекулу; или отсутствует;

при условии, что присутствует молекула HLA-G и специфически нацеливающая молекула.

82. Терапевтическое соединение вариантов 61 или 81, где

каждый R1 и R3 содержит молекулу HLA-G; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

83. Терапевтическое соединение любого из вариантов 81 и 82, где:

каждый R1 и R3 содержит агонистическую молекулу анти-LILRB1 антитела; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

84. Терапевтическое соединение любого из вариантов 81 и 82, где:

каждый R1 и R3 содержит агонистическую молекулу анти-KIR2DL4 антитела; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкер А и линкер В содержат молекулы Fc (например, самоспаривающиеся молекулы Fc или молекулы Fc, которые не подвергаются, или в основном, не подвергаются самоспариванию).

85. Терапевтическое соединение любого из вариантов 81–84, где:

каждый R1 и R3 содержит агонистическую молекулу анти-LILRB2 антитела; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

86. Терапевтическое соединение любого из вариантов 81–84, где:

каждый R1 и R3 содержит агонистическую молекулу анти-NKG2A антитела; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

87. Терапевтическое соединение любого из вариантов 81–84, где:

один из R1 и R3 содержит первую молекулу, а другой содержит другую молекулу,

выбранную из антагонистической молекулы анти-LILRB1 антитела, агонистической молекулы анти-KR2DL4 антитела и агонистической молекулы анти-NKG2A антитела; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

88. Терапевтическое соединение любого из вариантов 81–84, где:

один из R1 и R3 содержит антагонистическую молекулу анти-LILRB1 антитела, а другой содержит агонистическую молекулу анти-KR2DL4 антитела; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

89. Терапевтическое соединение любого из вариантов 81–84, где:

один из R1 и R3 содержит антагонистическую молекулу анти-LILRB1 антитела, а другой содержит агонистическую молекулу анти-NKG2A антитела; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

89A. Терапевтическое соединение любого из вариантов 81–84, где:

каждый из R1, R2, R3 и R4 независимо содержит молекулу мутеина IL-2; специфически нацеливающую молекулу или отсутствует; и

при условии, что присутствует молекула мутеина IL-2 и специфически нацеливающая молекула.

89B. Терапевтическое соединение варианта 89A, где:

каждый из R1 и R3 содержит молекулу мутеина IL-2 и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

89C. Терапевтическое соединение вариантов 89A или 89B, где:

один из R1 и R3 содержит MAdCAM-связывающую молекулу, например, молекулу анти-MAdCAM антитела, или GITR-связывающую молекулу, например, молекулу анти-GITR антитела, а другой содержит молекулу мутеина IL-2; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

89D. Терапевтическое соединение вариантов 89A или 89B, где:

один из R1 и R3 содержит GARP-связывающую молекулу, например, молекулу анти-GARP антитела, а другой содержит молекулу мутеина IL-2; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

89E. Терапевтическое соединение вариантов 89A или 89B, где:

один из R1 и R3 содержит GARP-связывающую молекулу, например, молекулу анти-GARP антитела, или GITR-связывающую молекулу, например, молекулу анти-GITR антитела, а другой содержит молекулу мутеина IL-2; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

89F. Терапевтическое соединение вариантов 89А или 89В, где:

один из R1 и R3 содержит GARP-связывающую молекулу, например, молекулу анти-GARP антитела, а другой содержит молекулу мутеина IL-2; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

89G. Терапевтическое соединение вариантов 89А или 89В, где:

один из R1 и R3 содержит G1TR-связывающую молекулу, например, молекулу анти-G1TR антитела, а другой содержит молекулу мутеина IL-2; и

R2 и R4 независимо содержат специфически нацеливающие молекулы, например, молекулы scFv против антигена ткани.

89H. Терапевтическое соединение варианта 1, где соединением является полипептид или белок, где полипептид или белок содержит нацеливающую молекулу, которая связывается с клеткой-мишенью, и молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, представляет собой полипептид мутанта IL-2 (мутеина IL-2).

89I. Терапевтическое соединение варианта 89H, где нацеливающая молекула содержит антитело, которое связывается с белком-мишенью на поверхности клетки-мишени.

89J. Терапевтическое соединение варианта 89I, где антителом является антитело, которое связывается с MAdCAM, OAT1 (SLC22A6), OCT2 (SLC22A2), FXYD2, TSPAN7, DPP6, HEPCAM2, TMEM27 или GPR119.

89K. Терапевтическое соединение варианта 89I, где мутеин IL-2 связывается с рецептором, экспрессируемым иммунной клеткой.

89L. Терапевтическое соединение варианта 89I, где иммунная клетка участвует в выработывании нежелательного иммунного ответа.

89M. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89H-89L, где иммунная клетка вызывает патологическое состояние.

89N. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89H-89M, где нацеливающая молекула содержит анти-MAdCAM антитело.

89O. Терапевтическое соединение варианта 89H, где соединение имеет формулу от N-конца до C-конца:

R1- линкерная область A - R2 или R3- линкерная область B - R4,

где каждый R1, R2, R3 и R4 независимо содержит молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, нацеливающую молекулу или отсутствует.

89P. Терапевтическое соединение варианта 89O, где каждая из линкерной области A и линкерной области B содержит Fc-область.

89Q. Терапевтическое соединение вариантов 89O или 89P, где один из R1 и R2 представляет собой антитело IL-мутеин, и один из R1 и R2 представляет собой анти-MAdCAM антитело.

89R. Терапевтическое соединение вариантов 89O, 89P или 89Q, где R1 представляет собой IL-мутеин, а R2 представляет собой анти-MAdCAM антитело.

89S. Терапевтическое соединение вариантов 89O, 89P или 89Q, где R1 представляет собой анти-MAdCAM антитело, а R2 представляет собой анти-PD-1 антитело.

89T. Терапевтическое соединение вариантов 89O, 89P или 89Q, где один из R3 и R4 представляет собой мутеин IL-2, и один из R3 и R4 представляет собой анти-MAdCAM антитело.

89U. Терапевтическое соединение вариантов 89O, 89P или 89Q, где R3 представляет собой мутеин IL-2, а R4 представляет собой анти-MAdCAM антитело.

89V. Терапевтическое соединение вариантов 89O, 89P или 89Q, где R3 представляет собой анти-MAdCAM антитело, а R4 представляет собой мутеин IL-2.

89W. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89O-89W, где линкер отсутствует.

89X. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89O-89W, где линкер представляет собой или содержит Fc-область.

89Y. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89O-89W, где линкер содержит глициновый/сериновый линкер.

89X. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89O-89W, где линкер содержит последовательность GGGSGGGSGGGSGGGGS, GGGSGGGSGGGGS, GGGSGGGGS или GGGGS.

89Y. Терапевтическое соединение варианта 89H, где мутеин IL-2 содержит последовательность IL-2 SEQ ID NO: 6, где пептид содержит мутацию в положении, которое соответствует положению 53, 56, 80 или 118 SEQ ID NO: 6.

89Z. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89H-89Z, где мутеин IL-2 содержит последовательность IL-2 SEQ ID NO: 6, где пептид содержит мутацию в положении, которое соответствует положению 53, 56, 80 или 118 SEQ ID NO: 6.

89AA. Терапевтическое соединение варианта 89Y, где мутацией является замена L на I в положении 53, 56, 80 или 118.

89BB. Терапевтическое соединение варианта 89Z, где мутацией является замена L на I в положении 53, 56, 80 или 118.

89CC. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89H-89BB, где мутеин IL-2 также содержит мутацию в одном или более положениях 29, 31, 35, 37, 48, 69, 71, 74, 88 и 125, которые соответствуют этим положениям в SEQ ID NO: 6.

89DD. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89H-89CC, где мутеин IL-2 также содержит мутацию в одном или более положениях E15, H16, Q22, D84, E95 или Q126 или в 1, 2, 3, 4, 5, или в каждом из положений E15, H16, Q22, D84, E95 или Q126 дикого типа.

89EE. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89H-89DD, где мутацией в мутеине является одна или более из E15Q, H16N, Q22E, D84N, E95Q или Q126E.

89FF. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89Н–89ЕЕ, где мутеин содержит мутацию N29S в SEQ ID NO: 6.

89GG. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89Н–89FF, где мутеин содержит мутацию Y31S или Y51H.

89НН. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89Н–89GG, где мутеин содержит мутацию K35R.

89И. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89Н–89НН, где мутеин содержит мутацию T37A.

89JJ. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89Н–89И, где мутеин содержит мутацию K48E.

89KK. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89Н–89JJ, где мутеин содержит мутацию V69A.

89LL. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89Н–89KK, где мутеин содержит мутацию N71R.

89MM. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89Н–89LL, где мутеин содержит мутацию Q74P.

89NN. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89Н–89MM, где мутеин содержит мутацию N88D или N88R.

89OO. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89Н–89NN, где мутеин содержит мутацию C125A или C125S.

89PP. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89Н–89OO, где мутеин IL–2 присоединен к Fc–пептиду или связан с Fc–пептидом.

89PP1. Терапевтическое соединение варианта 89PP, где Fc–пептид содержит мутацию в одном или более положениях L234, L247, L235, L248, G237 и G250.

89PP2. Терапевтическое соединение варианта 89PP1, где мутацией является замена L на A или G на A.

89PP3. Терапевтическое соединение варианта 89PP1, где Fc–пептид содержит мутации L247A, L248A, и/или G250A (пронумерованные по Кэбату).

89PP4. Терапевтическое соединение варианта 89PP1, где Fc–пептид содержит мутацию L234A, мутацию L235A и/или мутацию G237A (в соответствии с EU–нумерацией).

89QQ. Терапевтическое соединение варианта 89Н, где соединение содержит полипептид, включающий первую цепь и вторую цепь, образующие полипептид, где:

первая цепь содержит:

V_H – H_c –линкер– C_1 , где V_H представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи, который связывается с клеткой–мишенью с V_L –доменом второй цепи; H_c представляет собой тяжелую цепь антитела, содержащую домен CH1–CH2–CH3; линкер представляет собой глициновый/сериновый линкер, а C_1 представляет собой мутеин IL–2, присоединенный к Fc–белку или связанный с Fc–белком в N–концевой или C–концевой ориентации; и

вторая цепь содержит:

V_L-L_c , где V_L представляет собой переменный домен легкой цепи, который связывается с клеткой-мишенью с V_H -доменом первой цепи, а домен L_c представляет собой домен СК легкой цепи.

89QQ1. Терапевтическое соединение варианта 89QQ, где V_H - и V_L -домены представляют собой переменные домены анти-MAdCAM антитела, которые связываются с MAdCAM, экспрессируемым на клетке.

89QQ2. Терапевтическое соединение варианта 89QQ или 89QQ1, где мутеин IL-2 содержит мутацию в положении, которое соответствует положению 53, 56, 80 или 118 SEQ ID NO: 6.

89QQ3. Терапевтическое соединение варианта 89QQ2, где мутацией является замена L на I в положении 53, 56, 80 или 118.

89QQ4. Терапевтическое соединение варианта 89QQ2 или 89QQ3, где мутация также содержит мутацию в положении, которое соответствует положению 69, 75, 88 и/или 125 или в любых их комбинациях.

89QQ5. Терапевтическое соединение вариантов 89QQ2 или 89QQ3, где мутеин IL-2 содержит мутацию, выбранную из группы, состоящей из L53I, L56I, L80I и L118I и мутаций V69A, Q74P, N88D или N88R, и необязательно C125A или C125S.

89QQ6. Терапевтическое соединение варианта 89QQ5, где мутеин IL-2 содержит мутацию L53I.

89QQ7. Терапевтическое соединение варианта 89QQ5, где мутеин IL-2 содержит мутацию L56I.

89QQ8. Терапевтическое соединение варианта 89QQ5, где мутеин IL-2 содержит мутацию L80I.

89QQ9. Терапевтическое соединение варианта 89QQ5, где мутеин IL-2 содержит мутацию L118I.

89QQ10. Терапевтическое соединение варианта 89QQ5, где мутеин IL-2 не содержит каких-либо других мутаций.

89QQ11. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89QQ–89QQ10, где Fc-пептид содержит мутации L247A, L248A, и G250A или мутацию L234A, мутацию L235A и/или мутацию G237A в соответствии с нумерацией по Кэбату.

89QQ12. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89QQ–89QQ11, где линкер содержит последовательность GGGGSGGGGSGGGGS или GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS.

89QQ13. Терапевтическое соединение любого из вариантов 89QQ–89QQ11, где полипептид содержит Fc-пептид, включающий описанную здесь последовательность.

90. Терапевтическое соединение любого из вариантов 81–84, где:

один из R1, R2, R3 и R4 содержит молекулу анти-BCR антитела, например, антагонистическую молекулу анти-BCR антитела, один содержит молекулу анти-FCRL антитела, и один содержит специфически нацеливающую молекулу.

91. Терапевтическое соединение варианта 90, где:

молекула анти-FCRL антитела содержит: молекулу анти-FCRL антитела, например, агонистическую молекулу анти-FCRL антитела, направленную против FCRL1, FCRL2, FCRL3, FCRL4, FCRL5 или FCRL6.

92. Терапевтическое соединение любого из вариантов 81–84, где: каждый R1, R2, R3 и R4 независимо содержит:

i) молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, например, ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу, IC–связывающую/IC–модулирующую молекулу, или SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу, которые минимизируют или ингибируют активность, размножение или функцию Т–клеток (молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор Т–клеток);

ii) молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, например, ICIM–связывающую/ICIM–модулирующую молекулу, IC–связывающую/IC–модулирующую молекулу, или SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу, которые минимизируют или ингибируют активность, размножение или функцию В–клеток (молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор В–клеток);

iii) специфически нацеливающую молекулу; или

iv) отсутствует;

при условии, что присутствуют: молекула, связывающаяся с Т–клеточным эффектором/модулирующая Т–клеточный эффектор, молекула, связывающаяся с В–клеточным эффектором/модулирующая В–клеточный эффектор, и специфически нацеливающая молекула.

93. Терапевтическое соединение варианта 92, где:

один из R1, R2, R3 и R4 содержит агонистическое анти-PD-1 антитело, и один содержит молекулу HLA-G.

94. Терапевтическое соединение вариантов 92–93, где:

один из R1, R2, R3 и R4 содержит SM–связывающую/SM–модулирующую молекулу, например, молекулу CD39 или молекулу CD73.

95. Терапевтическое соединение любого из вариантов 92–94, где:

один из R1, R2, R3 и R4 содержит молекулу, которая связывает, активирует или поддерживает регуляторную иммунную клетку, например, клетку Treg или Breg.

96. Терапевтическое соединение любого из вариантов 92–95, где: один из R1, R2, R3 и R4 содержит агонистическое анти-PD-1 антитело, и один содержит молекулу HLA-G.

97. Терапевтическое соединение варианта 96, где:

один из R1, R2, R3 и R4 содержит агонистическое анти-PD-1 антитело, один содержит молекулу HLA-G и один содержит молекулу CD39 или молекулу CD73.

98. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–97, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит полипептид.

99. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–98, где молекула,

связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит полипептид, имеющий по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 150, 200 или 250 аминокислотных остатков.

100. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–99, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, имеет молекулярную массу 5, 10, 15, 20 или 40 кД.

101. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–100, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, не содержит ингибитора экспрессии аполипопротеина СIII, протеинкиназы А, киназы Src или интегрин бета–1.

102. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–100, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, не содержит ингибитора экспрессии аполипопротеина СIII, протеинкиназы А, киназы Src или интегрин бета–1.

103. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на ткань, выбранную из ткани легких, кожи, поджелудочной железы, сетчатки, предстательной железы, яичника, лимфоузлов, коры надпочечников, печени и кишечника.

104. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на клетки–мишени канальцев, например, эпителиальные клетки проксимальных канальцев.

105. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на TIE–2, APN, TEM4, TEM6, ICAM–1, рецептор нуклеолина P2Z, Trk–A, FLJ10849, HSPA12B, APP или OX–45.

106. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на белок, экспрессируемый в области просветов.

107. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где мишень донора не содержит мишени, специфичной для сердца.

108. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на ткань легких.

109. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на ткань почек.

110. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на ткань поджелудочной железы.

111. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на ткань кишечника.

112. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на ткань предстательной железы.

113. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на ткань головного мозга.

114. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на CD71.

115. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое

соединение специфически не нацелено на CD90.

116. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на MAdCAM.

117. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на альбумин.

118. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на ангидразу угольной кислоты IV.

119. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на ZG16-p.

120. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на дипептидилпептидазу IV.

121. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на поверхность мембраны васкулярной эндотелиальной клетки просветов.

121. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на ткань сердца.

122. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на опухоль, солидную опухоль или сосудистую систему солидной опухоли.

123. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на ткань кожи.

124. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на эпидермальную ткань.

125. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на базальную мембрану.

126. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на полипептид Dsg.

127. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на Dsg1.

128. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на Dsg3.

129. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на BP180.

130. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение специфически не нацелено на десмоглеин.

131. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение не содержит модулятора комплемента, например, ингибитора комплемента, такого как, но не ограничивающегося ими, ингибитор, описанный в патенте США № 8454963, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

133. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое

соединение не содержит визуализирующего агента.

134. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение не содержит визуализирующего агента, выбранного из группы, состоящей из радиоактивного агента, радиоизотопа, радиофармацевтического средства, контрастирующего агента, наночастицы, фермента, простетической группы, флуоресцентного вещества, люминесцентного вещества и биолуминесцентного вещества, такого как, но не ограничивающегося ими, вещество, описанное в патенте США № 8815235, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

135. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение не содержит радионуклида, такого как, но не ограничивающегося ими, радионуклид, описанный в патенте США № 6232287, который включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

136. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, которое не интернализуется донорской клеткой, с которой оно связывается.

137. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение не проникает в клетку, на которую нацелена специфически нацеливающая молекула.

138. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение не уничтожает клетку, на которую нацелена специфически нацеливающая молекула.

139. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение не проникает в клетку, с которой связывается молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор.

140. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение не уничтожает клетку, с которой связывается молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор.

141. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение не содержит аутоантигенного пептида или полипептида.

142. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение не содержит аутоантигенного пептида или полипептида, например, не содержит пептида или полипептида, против которого вырабатываются аутоантитела у индивидуума.

143. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение не содержит молекулу антитела, происходящую от млекопитающего, например, человека, страдающего аутоиммунным расстройством.

144. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение не содержит молекулу антитела, происходящую от млекопитающего, например, человека, страдающего острой ВП кожнослизистой оболочки.

145. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение не содержит молекулу антитела, происходящую от млекопитающего,

например, человека, страдающего болезнью Гудпасчера.

146. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–101, где терапевтическое соединение не содержит молекулу антитела, происходящую от млекопитающего, например, человека, страдающего вульгарной пузырчаткой.

141. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–146, содержащее донор–специфическую нацеливающую молекулу.

142. Терапевтическое соединение любого из вариантов 141, которое локализуется преимущественно в имплантируемой ткани донора, а не в ткани реципиента.

143. Терапевтическое соединение вариантов 141–142, где донор–специфическая нацеливающая молекула сообщает трансплантированной ткани, например, органа, взятого у донора, сайт–специфическую иммунологическую предпочтительность.

144. Терапевтическое соединение вариантов 141–143, где донор–специфическая нацеливающая молекула связывается с продуктом, например, полипептидом аллеля, присутствующего в локусе донора, но отсутствующего в локусе реципиента.

145. Терапевтическое соединение любого из вариантов 141–144, где донор–специфическая нацеливающая молекула преимущественно связывается с аллелем гена, экспрессируемого на донорской ткани, например, ткани трансплантата, например, органа, по сравнению с аллелем гена, экспрессируемого на ткани индивидуума.

146. Терапевтическое соединение вариантов 141–145, где донор–специфическая нацеливающая молекула имеет аффинность связывания с аллелем гена, экспрессируемого на донорской ткани, например, ткани трансплантата, например, органа, где такая аффинность по меньшей мере в 2, 4, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 или 10000 раз превышает аффинность связывания с аллелем гена, экспрессируемого на ткани индивидуума.

147. Терапевтическое соединение любого из вариантов 141–146, где донор–специфическая нацеливающая молекула связывается с продуктом, например, полипептидом аллеля, присутствующего в локусе донора, но отсутствующего в локусе реципиента.

148. Терапевтическое соединение любого из вариантов 141–147, где связывание является достаточно специфическим, то есть, например, при клинически эффективной дозе терапевтического соединения наблюдается нежелательная, значительная или клинически неприемлемая системная иммунная супрессия.

149. Терапевтическое соединение любого из вариантов 141–148, где терапевтическое соединение аккумулируется в сайте–мишени, например, связывание донор–специфической нацеливающей молекулы приводит к аккумуляции терапевтического соединения в сайте–мишени.

150. Терапевтическое соединение любого из вариантов 141–149, где донор–специфическая нацеливающая молекула связывается с продуктом аллеля локуса, выбранного из локусов Таблицы 2, например, локуса HLA, например, локуса HLA–A, HLA–B, HLA–C, HLA–DP, HLA–DQ или HLA–DR, где указанный аллель присутствует у

донора, но не у реципиента. Локус HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DQ или HLA-DR.

151. Терапевтическое соединение любого из вариантов 141–150, где донор-специфическая нацеливающая молекула связывается с аллелем HLA-A, аллелем HLA-B, аллелем HLA-C, аллелем HLA-DP, аллелем HLA-, или аллелем HLA-.

152. Терапевтическое соединение любого из вариантов 141–151, где терапевтическое соединение является подходящим для лечения индивидуума, который имеет трансплантат, будет иметь трансплантат или нуждается в трансплантации.

153. Терапевтическое соединение варианта 152, где трансплантат включает весь орган или часть органа, например, печени, почек, сердца, поджелудочной железы, тимуса, кожи или легких.

154. Терапевтическое соединение любого из вариантов 141–153, где донор-специфическая нацеливающая молекула содержит молекулу антитела.

155. Терапевтическое соединение любого из вариантов 141–153, где донор-специфическая нацеливающая молекула содержит мишень-специфический связывающийся полипептид или молекулу, связывающуюся с лигандом мишени.

156. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–155, содержащее тканеспецифическую нацеливающую молекулу.

157. Терапевтическое соединение варианта 156, где тканеспецифической нацеливающей молекулой является молекула, которая специфически связывается с MAdCAM.

158. Терапевтическое соединение варианта 156, где тканеспецифической нацеливающей молекулой является антитело, которое специфически связывается с MAdCAM.

159. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–158, где терапевтическое соединение является подходящим для лечения индивидуума, страдающего аутоиммунным расстройством, например, описанным здесь аутоиммунным расстройством, или индивидуума с риском или повышенным риском развития такого расстройства.

160. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–159, где терапевтическое соединение аккумулируется в сайте-мишени, например, связывание тканеспецифической нацеливающей молекулы приводит к аккумуляции терапевтического соединения в сайте-мишени.

161. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–160, где терапевтическое соединение локализуется преимущественно в ткани-мишени, а не в другой ткани индивидуума.

162. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–161, где терапевтическое соединение сообщает ткани-мишени индивидуума, например, ткани-мишени индивидуума, страдающего нежелательной иммунной атакой, например, при аутоиммунном расстройстве, или индивидуума с риском, или повышенным риском такой

атаки, сайт–специфическую иммунологическую предпочтительность.

163. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–161, где тканеспецифическая нацеливающая молекула, как компонент терапевтического соединения, преимущественно связывается с тканью–мишенью индивидуума с нежелательной иммунной атакой, например, при аутоиммунном расстройстве.

164. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–163, где тканеспецифическая нацеливающая молекула связывается с продуктом, например, полипептидом, который не присутствует за пределами ткани–мишени или присутствует на достаточно низких уровнях, таких, что при терапевтических концентрациях терапевтической молекулы, отсутствуют или, в основном, отсутствуют неприемлимые уровни иммунной супрессии.

165. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–164, где тканеспецифическая нацеливающая молекула связывается с продуктом или сайтом на продукте, который присутствует в большем количестве в ткани–мишени, чем в ткани, не являющейся мишенью.

166. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–165, где терапевтическое соединение связывается с продуктом или сайтом на продукте, который присутствует или экспрессируется, в основном, исключительно на ткани–мишени.

167. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–166, где продукт или сайт на продукте, с которым связывается специфически нацеливающая молекула, в достаточной степени ограничен тканью–мишенью, где на терапевтически эффективном уровне терапевтического соединения, у индивидуума не наблюдается неприемлемый уровень, например, клинически значимый уровень системной иммунной супрессии.

168. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–167, где терапевтическое соединение преимущественно связывается с тканью–мишенью или с антигеном ткани–мишени, например, имеет аффинность связывания с тканью–мишенью или с антигеном–мишенью, где аффинность к антигену или к ткани–мишени, например, по меньшей мере в 2, 4, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 или 10000 раз превышает аффинность к ткани или антигену, не являющимися мишенями или присутствующими за пределами ткани–мишени.

169. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–168, где тканеспецифическая нацеливающая молекула связывается с продуктом, например, с полипептидным продуктом или сайтом на продукте, присутствующем на предварительно выбранном сайте, например, на участке нежелательного иммунного ответа при аутоиммунном расстройстве.

170. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–169, где терапевтическое соединение является подходящим для лечения индивидуума, страдающего диабетом типа 1, или индивидуума с риском или повышенным риском развития диабета типа 1.

171. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–170, где ткань–мишень

включает ткань поджелудочной железы, например, панкреатические островковые клетки или панкреатические бета-клетки, ткань кишечника (например, эндотелиальные клетки кишечника), ткань почек (например, эпителиальные клетки почек) или ткань печени (например, эпителиальные клетки печени).

172. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–171, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, или нацеливающая молекула связываются с полипептидом, выбранным из описанных здесь полипептидов, таких как полипептиды, перечисленные в Таблице 3, например, SEZ6L2, LRP1 1, DISP2, SLC30A8, FXVD2, TSPAN7 или TMEM27.

173. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–168, где терапевтическое соединение является подходящим для лечения индивидуума, страдающего рассеянным склерозом, или индивидуума с риском или повышенным риском развития рассеянного склероза.

174. Терапевтическое соединение варианта 173, где ткань–мишень включает ткань ЦНС, миелиновую оболочку или миелиновую оболочку олигодендроцитов.

175. Терапевтическое соединение любого из вариантов 173–174, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор или нацеливающая молекула связываются с полипептидом, выбранным из описанных здесь полипептидов, включая, но не ограничиваясь ими, полипептиды, представленные в Таблице 3, например, MOG, PLP или MBP.

176. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–168, где терапевтическое соединение является подходящим для лечения индивидуума, страдающего кардиомиозитом, или индивидуума с риском или повышенным риском развития кардиомиозита.

177. Терапевтическое соединение варианта 176, где ткань–мишень включает кардиомиоциты, моноциты, макрофаги или миелоидные клетки.

178. Терапевтическое соединение вариантов 176–177, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, или нацеливающая молекула связываются с описанным здесь полипептидом, включая, но не ограничиваясь ими, полипептиды, выбранные из Таблицы 3, например, SIRPA (CD172a).

179. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–168, где терапевтическое соединение является подходящим для лечения индивидуума, страдающего воспалительным заболеванием кишечника, аутоиммунным гепатитом (АИГ), первичным склерозирующим холангитом (ПСХ), первичным билиарным склерозом (ПБС) или индивидуума с трансплантатом, или индивидуума с риском или повышенным риском развития таких заболеваний.

180. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–168, индивидуум страдает болезнью Крона или язвенным колитом, или указанный индивидуум имеет риск или повышенный риск развития таких заболеваний.

181. Терапевтическое соединение вариантов 179 или 180, где ткань–мишень

включает ткань кишечника, такие как эпителиальные клетки кишечника или клетки печени, такие как эпителиальные клетки печени.

182. Терапевтическое соединение вариантов 179–181, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор связывается с описанным здесь полипептидом, включая, но не ограничиваясь ими, полипептиды, выбранные из Таблицы 3, например, PD–1.

182. Терапевтическое соединение вариантов 179–181, где нацеливающая молекула связывается с описанным здесь полипептидом, включая, но не ограничиваясь им, MAdCAM.

183. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–168, где терапевтическое соединение является подходящим для лечения индивидуума, страдающего ревматоидным артритом, или индивидуума с риском или повышенным риском развития ревматоидного артрита.

184. Терапевтическое соединение варианта 183, где ткань–мишень включает кардиомиоциты, моноциты, макрофаги или миелоидные клетки.

185. Терапевтическое соединение вариантов 183 или 184, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, или нацеливающая молекула связываются с полипептидом, выбранным из Таблицы 3, например, SIRPA (CD172a).

186. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–185, где тканеспецифическая нацеливающая молекула содержит молекулу антитела.

187. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–185, где тканеспецифическая нацеливающая молекула содержит мишень–специфический связывающийся полипептид или молекулу, связывающуюся с лигандом мишени.

188. Терапевтическое соединение любого из вариантов 156–185, где тканеспецифическая нацеливающая молекула содержит мишень–специфический связывающийся полипептид, который связывается с MAdCAM.

189. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–188, где терапевтическое соединение связывается с молекулой клеточной поверхности иммунной эффекторной клетки, например, Т–клетки, В–клетки, НК–клетки или другой иммунной клетки, которые стимулируют проиммунный ответ.

190. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–189, где терапевтическое соединение снижает способность иммунной эффекторной клетки, например, Т–клетки, В–клетки, НК–клетки или другой иммунной клетки, стимулировать проиммунный ответ.

191. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–190, где специфически нацеливающая молекула нацелена на мишень млекопитающего, например, полипептид млекопитающего, и где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, связывается с иммунным компонентом млекопитающего/модулирует этот компонент, например, человеческую иммунную клетку, например, В–клетку, Т–клетку или макрофаг млекопитающего.

192. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–192, где специфически

нацеливающая молекула нацелена на человеческую мишень, например, человеческий полипептид, и где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, связывается с человеческим иммунным компонентом/модулирует этот компонент, например, человеческую иммунную клетку, например, В-клетку, Т-клетку или макрофаг человека.

193. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–193, где терапевтическое соединение имеет конфигурацию, подходящую для введения человеку.

194. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–191, где терапевтическое соединение имеет конфигурацию, подходящую для введения млекопитающему, не являющемуся человеком.

195. Терапевтическое соединение любого из вариантов 1–194, где терапевтическое соединение, например, молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, содержит агонист PD–1.

195.1. Терапевтическое соединение любого из предшествующих вариантов, где терапевтическое соединение содержит мутеин IL–2 SEQ ID NO: 15, где мутеин содержит мутацию в положении 73, 76, 100 или 138.

195.2. Терапевтическое соединение варианта 195.1, где мутацией является замена L на I в положении 73, 76, 100 или 138.

195.3. Терапевтическое соединение вариантов 195.1 или 195.2, где мутеин IL–2 также содержит мутацию в одном или более положениях 49, 51, 55, 57, 68, 89, 91, 94, 108 и 145.

195.4. Терапевтическое соединение любого из вариантов 195.1–195.3, где мутеин также содержит мутацию в одном или более положениях E35, H36, Q42, D104, E115 или Q146 или 1, 2, 3, 4, 5, или каждую из E35, H36, Q42, D104, E115 или Q146, которые представляют собой мутации дикого типа.

195.5. Терапевтическое соединение варианта 195.4, где мутацией является одна или более из E35Q, H36N, Q42E, D104N, E115Q или Q146E.

195.6. Терапевтическое соединение любого из вариантов 195.1–195.5, где мутеин IL–2 содержит мутацию N49S.

195.7. Терапевтическое соединение любого из вариантов 195.1–195.6, где мутеин IL–2 содержит мутацию Y51S или Y51H.

195.8. Терапевтическое соединение любого из вариантов 195.1–195.7, где мутеин IL–2 содержит мутацию K55R.

195.9. Терапевтическое соединение любого из вариантов 195.1–195.8, где мутеин IL–2 содержит мутацию T57A.

195.10. Терапевтическое соединение любого из вариантов 195.1–195.8, где мутеин IL–2 содержит мутацию K68E, мутацию V89A (V69A), мутацию N91R (N71R), мутацию Q94P или Q74P, мутацию (N88D) или N108R (N88R), мутацию C145A(C125A) или C145S (C125S).

195.11. Терапевтическое соединение любого из вариантов 195.1–195.10, где

терапевтическое соединение содержит мутеин IL-2 SEQ ID NO: 6, где мутеин содержит мутацию в положении 53, 56, 80 или 118 и одну или более мутаций, перечисленных в вариантах 195.1–195.10.

195.12. Терапевтическое соединение любого из вариантов 195.1–195.11, где мутеин IL-2 присоединен к Fc-пептиду или связан с ним.

195.13. Терапевтическое соединение варианта 195.12, где Fc-пептид содержит мутацию в одном или более положениях L234, L247, L235, L248, G237 и G250 (EU-нумерация).

196. Способ лечения индивидуума с воспалительным заболеванием кишечника, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтического соединения любого из вариантов 1–195.13 для лечения воспалительного заболевания кишечника.

197. Способ варианта 196, где индивидуум с воспалительным заболеванием кишечника страдает болезнью Крона.

198. Способ варианта 196, где индивидуум с воспалительным заболеванием кишечника страдает язвенным колитом.

199. Способ лечения индивидуума с аутоиммунным гепатитом, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтического соединения любого из вариантов 1–195.13 для лечения аутоиммунного гепатита.

200. Способ лечения первичного склерозирующего холангита, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтического соединения любого из вариантов 1–195.13 для лечения первичного склерозирующего холангита.

201. Способ лечения диабета типа 1, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтического соединения любого из вариантов 1–195.13 для лечения диабета типа 1 у индивидуума.

202. Способ лечения индивидуума с трансплантатом, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества терапевтического соединения любого из вариантов 1–195.13 для лечения индивидуума с трансплантатом (реципиента).

203. Способ лечения БТПХ у индивидуума, которому была трансплантирована донорская ткань, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества терапевтического соединения любого из вариантов 1–195.13.

204. Способ варианта 203, где терапевтическое соединение вводят индивидууму до трансплантации; до развития симптома БТПХ; после трансплантации или одновременно с трансплантацией, или после развития симптома или одновременно с развитием симптома БТПХ.

205. Способ лечения индивидуума, страдающего аутоиммунным расстройством, или индивидуума с риском или с повышенным риском развития аутоиммунного расстройства, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества терапевтического соединения любого из вариантов 1–195.13 для лечения указанного индивидуума.

206. Способ варианта 205, где индивидуум имеет донорскую ткань

аллотрансплантата, будет иметь такую ткань или нуждается в ней.

207. Способ любого из вариантов 205–206, где донорская ткань включает твердый орган, например, печень, почки, сердце, поджелудочную железу, тимус или легкие.

208. Способ любого из вариантов 205–206, где донорская ткань включает весь орган или часть органа, например, печени, почек, сердца, поджелудочной железы, тимуса или легкого.

209. Способ любого из вариантов 205–206, где донорская ткань включает кожу.

210. Способ любого из вариантов 205–206, где донорская ткань не включает кожу.

211. Способ любого из вариантов 205–210, где донорская ткань презентрует или экспрессирует продукт аллеля локуса, где указанный аллель отсутствует или не экспрессируется у индивидуума.

212. Способ любого из вариантов 205–210, где донорская ткань презентрует или экспрессирует продукт аллеля локуса, выбранного из локусов Таблицы 2, например, локуса HLA, например, локуса HLA–A, HLA–B, HLA–C, HLA–DP, HLA–DQ или HLA–DR, где указанный аллель отсутствует или не экспрессируется у индивидуума.

213. Способ любого из вариантов 205–212, включающий введение индивидууму трансплантированной ткани.

214. Способ любого из вариантов 196–213, включающий наблюдение индивидуума на инактивацию иммунных клеток (например, для мониторинга нежелательной активации ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки) на участке, удаленном от сайта–мишени, например, в периферической крови или в лимфатической системе.

215. Способ любого из вариантов 196–214, включающий наблюдение индивидуума на активацию иммунных клеток (например, для мониторинга нежелательного ингибирования ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки) на участке, удаленном от сайта–мишени, например, в периферической крови или в лимфатической системе.

216. Способ любого из вариантов 196–215, где в зависимости от результатов мониторинга осуществляют выбор курса лечения индивидуума, например, увеличение дозы терапевтического соединения, уменьшение дозы терапевтического соединения, продолжение лечения терапевтическим соединением без изменения дозы.

217. Способ любого из вариантов 196–216, включающий введение реципиенту соединения вариантов 1–195.13.

218. Способ любого из вариантов 196–216, где введение включает системное введение, например, в систему периферической крови.

219. Способ любого из вариантов 196–216, где введение включает местное введение, например, в ткань–мишень, в донорскую ткань или в участок, в котором локализуется или будет локализоваться ткань–мишень или донорская ткань.

220. Способ любого из вариантов 219, включающий введение реципиенту терапевтического соединения перед введением ему донорской ткани.

221. Способ любого из вариантов 219, включающий введение реципиенту

терапевтического соединения после введения ему донорской ткани.

222. Способ любого из вариантов 219, включающий введение реципиенту терапевтического соединения одновременно с введением ему донорской ткани.

223. Способ варианта 213, включающий контактирование терапевтического соединения с донорской тканью до введения донорской ткани реципиенту.

224. Способ любого из вариантов 213, включающий введение индивидууму терапевтического соединения, где трансплантированная ткань была подвергнута контактированию с терапевтическим соединением до введения индивидууму.

225. Способ любого из вариантов 213, включающий контактирование терапевтического соединения с донорской тканью после введения донорской ткани реципиенту, например, путем местного введения в донорскую ткань.

226. Способ любого из вариантов 196–226, включающий введение индивидууму описанного здесь терапевтического соединения так, чтобы его терапевтические уровни сохранялись по меньшей мере в течение, например, 1, 5, 10, 14 или 28 дней подряд, или с перерывами.

227. Способ любого из вариантов 196–226, где индивидууму не вводят ненацеленный иммуносупрессорный агент.

228. Способ любого из вариантов 196–226, где индивидууму не вводят ненацеленный иммуносупрессорный агент по меньшей мере за 1, 15, 30, 60 или 90 дней до первого введения терапевтического соединения.

229. Способ любого из вариантов 213, где индивидууму не вводят ненацеленный иммуносупрессорный агент по меньшей мере за 1, 15, 30, 60 или 90 дней до введения трансплантированной ткани.

230. Способ любого из вариантов 196–229, где индивидууму не вводят ненацеленный иммуносупрессорный агент по меньшей мере через 1, 15, 30, 60, 90 или 180 дней после первого введения терапевтического соединения.

231. Способ любого из вариантов 196–229, где индивидууму не вводят ненацеленный иммуносупрессорный агент по меньшей мере через 1, 15, 30, 60, 90 или 180 дней после введения трансплантированной ткани.

232. Способ любого из вариантов 196–231, включающий введение индивидууму ненацеленного иммуносупрессорного агента.

233. Способ любого из вариантов 196–232, где индивидууму вводят ненацеленный иммуносупрессорный агент по меньшей мере за 1, 15, 30, 60 или 90 дней до первого введения терапевтического соединения.

234. Способ варианта 213, где индивидууму вводят ненацеленный иммуносупрессорный агент по меньшей мере за 1, 15, 30, 60 или 90 дней до введения трансплантированной ткани.

235. Способ варианта 234, где индивидууму вводят ненацеленный иммуносупрессорный агент по меньшей мере через 1, 15, 30, 60, 90 или 180 дней после первого введения терапевтического соединения.

236. Способ любого из вариантов 196–235, где индивидууму вводят ненацеленный иммуносупрессорный агент по меньшей мере через 1, 15, 30, 60, 90 или 180 дней после введения трансплантированной ткани.

237. Способ любого из вариантов 196–235, где индивидууму вводят ненацеленный иммуносупрессорный агент перед первым введением терапевтического соединения, но не более, чем за 1, 15, 30, 60, 90 или 180 дней.

238. Способ варианта 213, где индивидууму вводят ненацеленный иммуносупрессорный агент перед введением трансплантированной ткани, но не более, чем за 1, 15, 30, 60, 90 или 180 дней.

239. Способ любого из вариантов 196–238, где индивидууму вводят ненацеленный иммуносупрессорный агент после первого введения терапевтического соединения, но не более, чем через 1, 15, 30, 60, 90 или 180 дней.

240. Способ варианта 213, где индивидууму вводят ненацеленный иммуносупрессорный агент после введения трансплантированной ткани, но не более, чем через 1, 15, 30, 60, 90 или 180 дней.

241. Способ варианта 213, где индивидуума наблюдают на отторжение трансплантированной ткани.

242. Способ любого из вариантов 196–238, где выбирают дозу ненацеленного иммуносупрессорного агента или дозу ненацеленного иммуносупрессорного агента, выбирают в зависимости от результатов наблюдения.

243. Способ варианта 242, где вводят дозу.

244. Способ варианта 243, где выбранная доза является нулевой, то есть, не вводят ненацеленный иммуносупрессорный агент.

245. Способ варианта 243, где выбранная доза не является нулевой, то есть, вводят ненацеленный иммуносупрессорный агент.

246. Способ варианта 243, где доза меньше, чем доза, которая должна быть введена в отсутствие введения терапевтического соединения.

247. Способ любого из вариантов 196–246, где индивидуумом является млекопитающее, например, млекопитающее, не являющееся человеком.

248. Способ любого из вариантов 196–246, где индивидуумом является человек.

249. Способ варианта 213, где донор и индивидуум являются несовместимыми по локусу HLA, например, по главному или второстепенному локусу.

250. Способ варианта 249, где индивидуумом является млекопитающее, например, млекопитающее, не являющееся человеком.

251. Способ варианта 249, где индивидуумом является человек.

252. Способ лечения индивидуума, страдающего аутоиммунным расстройством, или индивидуума с риском или с повышенным риском развития аутоиммунного расстройства, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества терапевтического соединения любого из вариантов 1–195.13 для лечения указанного индивидуума.

253. Способ варианта 252, где терапевтическое соединение вводят до начала появления или до идентификации появления симптомов аутоиммунного расстройства.

254. Способ любого из вариантов 252–253, где терапевтическое соединение вводят после начала появления или после идентификации появления симптомов аутоиммунного расстройства.

255. Способ вариантов 252–254, где аутоиммунное расстройство включает диабет типа 1.

256. Терапевтическое соединение любого из вариантов 252–255, где ткань–мишень включает панкреатические островковые клетки или панкреатические бета–клетки, ткань кишечника (например, эндотелиальные клетки кишечника), ткань почек (например, эпителиальные клетки почек) или ткань печени (например, эпителиальные клетки печени).

257. Терапевтическое соединение любого из вариантов 252–256, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, или нацеливающая молекула связываются с полипептидом, выбранным из полипептидов Таблицы 3, например, полипептида MAdCAM, OAT1, OCT, DPP6, SEZ6L2, LRP11, DISP2, SLC30A8, FXYP2, TSPAN7 или TMEM27.

258. Способ любого из вариантов 252–257, где терапевтическое соединение вводят до начала появления или до идентификации появления симптомов диабета типа 1.

259. Способ любого из вариантов 252–258, где терапевтическое соединение вводят до начала появления или до идентификации у индивидуума предварительно выбранных признаков или симптомов.

260. Способ любого из вариантов 252–259, где терапевтическое соединение вводят после начала появления или после идентификации появления симптомов диабета типа 1.

261. Способ любого из вариантов 252–260, где терапевтическое соединение вводят после начала появления или после идентификации у индивидуума предварительно выбранных признаков или симптомов.

262. Способ любого из вариантов 252–261, где терапевтическим соединением является терапевтическое соединение любого из вариантов 1–195.13.

263. Способ любого из вариантов 252–257, где терапевтическое соединение является подходящим для лечения индивидуума, страдающего рассеянным склерозом, или индивидуума с риском или повышенным риском развития рассеянного склероза.

264. Способ варианта 263, где ткань–мишень включает ткань ЦНС, миелиновую оболочку или миелиновую оболочку олигодендроцитов.

265. Способ любого из вариантов 263 или 264, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор или нацеливающая молекула связываются с полипептидом, выбранным из Таблицы 3, например, полипептида MOG, PLP или MBP.

266. Способ любого из вариантов 263–265, где терапевтическое соединение вводят до начала появления или до идентификации появления симптомов рассеянного склероза.

267. Способ любого из вариантов 263–265, где терапевтическое соединение вводят до начала появления или до идентификации у индивидуума предварительно выбранных

признаков или симптомов.

268. Способ любого из вариантов 263–265, где терапевтическое соединение вводят после начала появления или после идентификации появления симптомов рассеянного склероза.

269. Способ любого из вариантов 263–265, где терапевтическое соединение вводят после начала появления или после идентификации у индивидуума предварительно выбранных признаков или симптомов.

270. Способ любого из вариантов 263–269, где терапевтическим соединением является терапевтическое соединение любого из вариантов 1–195.13.

271. Способ любого из вариантов 252–257, где терапевтическое соединение является подходящим для лечения индивидуума, страдающего кардиомиозитом, или индивидуума с риском или повышенным риском развития кардиомиозита.

272. Способ варианта 271, где ткань–мишень включает кардиомициты, моноциты, макрофаги или миелоидные клетки.

273. Способ вариантов 271 или 272, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, или нацеливающая молекула связываются с полипептидом, выбранным из Таблицы 3, например, полипептидом SIRPA (CD172a).

274. Способ любого из вариантов 271–273, где терапевтическое соединение вводят до начала появления или до идентификации появления симптомов кардиомиозита.

275. Способ любого из вариантов 271–273, где терапевтическое соединение вводят до начала появления или до идентификации у индивидуума предварительно выбранных признаков или симптомов.

276. Способ любого из вариантов 271–273, где терапевтическое соединение вводят после начала появления или после идентификации появления симптомов кардиомиозита.

277. Способ любого из вариантов 263–265, где терапевтическое соединение вводят после начала появления или после идентификации у индивидуума предварительно выбранных признаков или симптомов.

278. Способ любого из вариантов 271–277, где терапевтическим соединением является терапевтическое соединение любого из вариантов 1–195.13.

279. Способ любого из вариантов 252–257, где терапевтическое соединение является подходящим для лечения индивидуума, страдающего ревматоидным артритом, или индивидуума с риском или повышенным риском развития ревматоидного артрита.

280. Способ варианта 279, где ткань–мишень включает кардиомициты, моноциты, макрофаги или миелоидные клетки.

281. Способ вариантов 279 или 280, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, или нацеливающая молекула связываются с полипептидом, выбранным из Таблицы 3, например, полипептидом SIRPA (CD172a).

282. Способ любого из вариантов 279–281, где терапевтическое соединение вводят до начала появления или до идентификации появления симптомов ревматоидного артрита.

283. Способ любого из вариантов 279–281, где терапевтическое соединение вводят

до начала появления или до идентификации у индивидуума предварительно выбранных признаков или симптомов.

284. Способ любого из вариантов 279–281, где терапевтическое соединение вводят после начала появления или после идентификации появления симптомов ревматоидного артрита.

285. Способ любого из вариантов 279–281, где терапевтическое соединение вводят после начала появления или после идентификации у индивидуума предварительно выбранных признаков или симптомов.

286. Способ любого из вариантов 279–285, где терапевтическим соединением является терапевтическое соединение любого из вариантов 1–195.13.

287. Способ любого из вариантов 196–286, включающий наблюдение индивидуума на инактивацию иммунных клеток (например, для мониторинга нежелательной активации ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки) на участке, удаленном от сайта-мишени, например, в периферической крови или в лимфатической системе.

288. Способ любого из вариантов 196–287, включающий наблюдение индивидуума на активацию иммунных клеток (например, для мониторинга нежелательного ингибирования ингибирующей молекулы иммунной контрольной точки) на участке, удаленном от сайта-мишени, например, в периферической крови или в лимфатической системе.

289. Способ любого из вариантов 196–288, где в зависимости от результатов наблюдения осуществляют выбор курса лечения индивидуума, например, увеличение дозы терапевтического соединения, уменьшение дозы терапевтического соединения, продолжение лечения терапевтическим соединением без изменения дозы.

290. Способ любого из вариантов 196–289, где индивидуума наблюдают на аутоиммунную атаку ткани-мишени.

291. Способ варианта 290, где дозу терапевтического соединения выбирают по результатам наблюдения.

292. Способ варианта 291, где вводят дозу.

293. Способ варианта 290, где выбранная доза является нулевой, то есть, введение терапевтического соединения прекращают.

294. Способ варианта 290, где выбранная доза не является нулевой.

295. Способ варианта 290, где выбранной дозой является повышенная доза.

296. Способ варианта 290, где выбранной дозой является пониженная доза.

297. Способ любого из вариантов 196–296, где введение включает системное введение, например, в систему периферической крови.

298. Способ любого из вариантов 196–297, где введение включает местное введение, например, в ткань-мишень.

299. Способ любого из вариантов 196–298, включающий введение описанного здесь терапевтического соединения так, чтобы его терапевтические уровни сохранялись по меньшей мере в течение, например, 1, 5, 10, 14 или 28 дней подряд или с перерывами.

300. Способ любого из вариантов 196–299, где индивидуумом является млекопитающее, например, млекопитающее, не являющееся человеком.

301. Способ любого из вариантов 196–299, где индивидуумом является человек.

302. Молекула нуклеиновой кислоты или множество молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих терапевтическое соединение любого из вариантов 1–195.13.

303. Вектор или множество векторов, содержащих молекулы нуклеиновой кислоты варианта 302.

304. Клетка, содержащая молекулы нуклеиновой кислоты варианта 302, или вектор варианта 303.

305. Способ получения терапевтического соединения, включающий культивирование клетки варианта 304 с получением терапевтического соединения.

306. Способ получения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтическое соединение любого из вариантов 1–195.13, где указанный способ включает:

а) получение вектора, содержащего последовательность, кодирующую нацеливающую молекулу, и встраивание в вектор последовательности, кодирующей молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, с получением последовательности, кодирующей терапевтическое соединение; или

б) получение вектора, содержащего последовательность, кодирующую молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, и встраивание в вектор последовательности, кодирующей нацеливающую молекулу, с получением последовательности, кодирующей терапевтическое соединение;

и тем самым, получение последовательности, кодирующей терапевтическое соединение.

307. Способ варианта 306, где нацеливающую молекулу выбирают в зависимости от потребности индивидуума.

308. Способ варианта 306 или 307, где молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, выбирают в зависимости от потребности индивидуума.

309. Способ любого из вариантов 306 или 307, также включающий экспрессию последовательности, кодирующей терапевтическое соединение, с получением терапевтического соединения.

310. Способ любого из вариантов 306–309, также включающий передачу последовательности или полипептида, происходящего от этой последовательности, в другую организацию, например, медицинскому сотруднику, который будет вводить терапевтическое соединение индивидууму.

311. Способ лечения индивидуума, включающий:

приобретение, например, от другой организации, терапевтического соединения или нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтическое соединение и полученной любым описанным здесь способом, который не ограничивается вариантами 306–310;

введение терапевтического соединения или нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтическое соединение, индивидууму,

и тем самым, лечение индивидуума.

312. Способ варианта 311, также включающий идентификацию терапевтического соединения или нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтическое соединение, другой организацией, например, организацией, которая будет приготавливать терапевтическое соединение или нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтическое соединение.

313. Способ вариантов 311 или 312, также включающий запрос терапевтического соединения или нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтическое соединение, из другой организации, например, организации, которая приготовила терапевтическое соединение или нуклеиновую кислоту, кодирующую терапевтическое соединение.

314. Способ любого из вариантов 311–313, где индивидуум страдает аутоиммунным расстройством, и где терапевтическое соединение не содержит аутоантигенного пептида или полипептида, характерного для аутоиммунного расстройства, например, не содержит пептида или полипептида, против которого вырабатываются аутоантитела у индивидуума.

Нижеследующие примеры приводятся лишь в иллюстративных целях и не ограничиваются описанными здесь соединениями, композициями и способами. Специалист в данной области может внести и другие подходящие известные модификации и изменения, входящие в объем нижеследующих вариантов осуществления изобретения.

Примеры

Пример 1: Терапевтические соединения, активирующие PD-1 и нацеленные на HLA.

Конструирование терапевтического соединения, активирующего PD-1 и нацеленного на HLA.

Связывающие домены, специфичные к HLA-A2, получали путем клонирования переменных областей тяжелой и легкой цепей Ig от гибридомы BB7.2 (ATCC) и превращения в одноцепочечное Ab (scFv). Активность и специфичность scFv может быть подтверждена путем оценки связывания BB7.2 с HLA-A2-экспрессирующими клетками по сравнению с клетками, экспрессирующими другие аллели HLA-A. Минимальные остатки PD-L1, необходимые для сообщения активности связывания с PD-1, идентифицировали путем систематической оценки необходимости аминокислот 3'- и 5'-домена IgV PD-L1, соответствующих аминокислотам 68–114. Были сконструированы экспрессионные конструкции, а затем были синтезированы и очищены белки с PD-1-связывающей активностью, протестированной с помощью Biacore. Минимальные незаменимые аминокислоты, необходимые для связывания PD-1 с доменом IgV PD-L1, обозначаются PD-L1-IgV. Для получения биспецифической молекулы scFv BB7.2 и PD-L1-IgV синтезировали фрагмент ДНК, кодирующий биспецифическое одноцепочечное антитело BB7.2×PD-L1-IgV с доменами, расположенными в следующем порядке:

VL_{BB7.2}–VH_{BB7.2}–PD–L1–IgV–IgG4 Fc, и клонировали в экспрессионный вектор, содержащий кластер для отбора DHFR.

Плазмидную ДНК экспрессионного вектора временно переносили в клетки 293T, и биспецифические антитела BB7.2×PD–L1–IgV очищали от супернатантов на колонке с белком A/G. Целостность биспецифического антитела BB7.2×PD–L1–IgV оценивали на полиакриламидном геле. Связывание домена scFv BB7.2 с HLA–A2 и домена PD–L1–IgV с PD–1 оценивали с помощью ELISA и клеточного FACS–анализа.

Функцию *in vitro* биспецифических антител BB7.2 × PD–L1–IgV оценивали с помощью анализа по смешанной лимфоцитарной реакции (MLR). В 96–луночном планшете, 100000 облученных человеческих МКПК, взятых у HLA–A2⁺–донора, разделяли на аликвоты/лунку и использовали в качестве активаторов. Затем добавляли HLA–A1⁺–Т–клетки–респонденты вместе с увеличением количества биспецифического антитела BB7.2×PD–L1–IgV. Способность Т–клеток–респондентов пролиферироваться в течение 72 часов оценивали по включению BrdU и дополнительно оценивали уровни продуцирования цитокинов IFN γ и IL–2 в супернатанте совместной культуры с помощью ELISA. Было обнаружено, что биспецифическое антитело BB7.2×PD–L1–IgV подавляет реакцию MLR, на что указывали ингибирование пролиферации HLA–A2⁺–Т–клеток–респондентов и продуцирования цитокинов.

Функцию *in vivo* биспецифического антитела BB7.2×PD–L1–IgV оценивали на мышинной модели толерантности к кожному аллотрансплантату. Мышиную линию C57BL/6–Tg(HLA–A2.1)lEnge/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor Maine) скрещивали с Balb/cJ, где потомство F1 экспрессировало трансген HLA–A2.1 и служило в качестве доноров аллотрансплантата. Мышей C57BL/6J выбривали, и этим мышам хирургически трансплантировали кожу, взятую у умерщвленных мышей C57BL/6–Tg(HLA–A2.1)lEnge/J × Balb/cJ F1. В это же самое время, мышам–хозяевам начинали вводить внутрибрюшинные инъекции биспецифического антитела BB7.2×PD–L1–IgV, сконструированного так, чтобы оно содержало мышинный Fc IgG1 или только BB7.2 или только PD–L1–IgV в качестве контроля. Затем проводили мониторинг отторжения или приживляемости кожного аллотрансплантата в течение 30 дней, где хозяев подвергали эвтаназии, брали лимфоузлы и количественно оценивали число популяций лимфоцитов, которые являются резидентами в аллотрансплантате.

Пример 2: CD39 и/или CD73 как эффекторные домены, образующие пуриnergическое гало вокруг представляющих интерес клеток или тканей определенного типа

Каталитически активный фрагмент CD39 и/или CD73 был присоединен к нацеливающему домену. После связывания и аккумуляции в сайте–мишени, CD39 фосфогидролизует АТФ в АМР. После связывания и аккумуляции в сайте–мишени, CD73 дефосфорилирует внеклеточный АМР в аденозин. Было обнаружено, что растворяя каталитически активная форма CD39, подходящая для ее использования в настоящем изобретении, присутствует в кровотоке человека и мыши, см. например, Yegutkin et al.

FASEB J. 2012 Sep; 26(9):3875–83. Растворимый рекомбинантный фрагмент также описан в «Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39», Gayle, et al., J Clin Invest. 1998 May 1; 101(9): 1851–1859. Подходящая молекула CD73 содержит растворимую форму CD73, которая может слущиваться с мембраны эндотелиальных клеток посредством протеолитического расщепления или гидролиза GPI-якоря посредством напряжения сдвига, см., например, публикацию Yegutkin G, Bodin P, Burnstock G. Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. Br J Pharmacol 2000; 129: 921–6.

Локальный катализ АТР в АМР или АМР в аденозин будет истощать местные запасы энергии, необходимые для мгновенного осуществления функции эффекторных Т-клеток. Функция Treg не должна нарушаться под действием истощения АТР, обусловленного окислительным фосфорилированием для энергетических потребностей (которые требуют меньшего количества АТР), тогда как Т-клетки памяти и другие эффекторные клетки должны разрушаться под действием гликолиза (требующего высоких уровней АТР) для достижения мгновенной функции.

Пример 3: Измерение сигнала PD-1, индуцируемого антителом

Клетки Jurkat стабильно экспрессируют 2 конструкции: 1) человеческий полипептид PD-1, присоединенный к β-галактозидазе, который может называться здесь «донором ферментов» и 2) полипептид SHP-2, присоединенный к β-галактозидазе, который может называться здесь «акцептором ферментов». Анти-PD-1 антитело контактирует с клеткой и, в случае связывания с PD-1, SHP-2 проникает в PD-1. Акцептор ферментов и донор ферментов образуют полностью активный фермент β-галактозидазу, которая может быть проанализирована. Этот анализ может быть проведен для выявления активации передачи сигнала PD-1.

Пример 4: Оценка агонистического действия PD-1. Агонисты PD-1 ингибируют активацию Т-клеток. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что агонистическое действие PD-1 ингибирует активацию Т-клеток, индуцированную анти-CD3 антителом. Человеческие или мышиные клетки предварительно активировали РНА (для человеческих Т-клеток) или Con A (для мышиных Т-клеток) так, чтобы они экспрессировали PD-1. Затем Т-клетки «реактивировали» анти-CD3 антителом в присутствии анти-PD-1 антитела (или анти-PD-L1 антитела) для проведения анализа на агонистическое действие PD-1. Т-клетки, которые получали сигнал от агониста PD-1 в присутствии анти-CD3 антитела, будут снижать уровень активации в отличие от стимуляции только анти-CD3 антителом. Активация может быть измерена посредством оценки уровня пролиферации или продуцирования цитокинов (IL-2, IFN γ , IL-17) и, возможно других маркеров, таких как маркер активации CD69.

Пример 5. Экспрессия и функция гибридного белка «анти-MAdCAM антитело/мышиный PD-L1» не зависят от конфигурации молекул

Биспецифическая гибридная молекула, включающая молекулу Ab против мышиногo MAdCAM/молекулу мышиногo PD-L1, экспрессировалась в двух ориентациях. Первая ориентация состояла из IgG против мышиногo MAdCAM вместе с мышиным PD-L1, присоединенным у С-конца тяжелой цепи. Вторая ориентация состояла из мышиногo PD-L1, присоединенного у N-конца Fc-домена Ig, к С-концу которого был присоединен scFv против мышиногo MAdCAM. Было обнаружено, что обе молекулы хорошо экспрессировались в экспрессионной системе млекопитающих. Было также обнаружено, что эти молекулы могут связываться со своими соответствующими партнерами по связыванию, MAdCAM или PD-1 в обеих ориентациях одновременно. Эти результаты показали, что молекула, состоящая из анти-MAdCAM антитела, присоединенного к PD-L1, может экспрессироваться в этих конфигурациях, где PD-L1 у N- или С-конца присоединен к Fc и сохраняет соответствующую функциональную активность связывания.

Вкратце, вектор pTT5, содержащий один ген, кодирующий один полипептид с мышиным PD-L1, который у своего N-конца присоединен к Fc-домену человеческого IgG1, а у С-конца к анти-MAdCAM scFv MECA-89, переносили в клетки HEK293 Expi. Альтернативно, две плазмиды были котрансфицированы в эквимольных отношениях. Первая плазида кодирует легкую цепь MECA-89, а вторая кодирует полноразмерную тяжелую цепь IgG1 MECA-89 вместе с мышиным PD-L1, присоединенным у С-конца. Через 5–7 дней, супернатанты клеточной культуры, экспрессирующие эти молекулы, собирали, осветляли путем центрифугирования и фильтровали через фильтрующее устройство размером 0,22 мкм. Биспецифические молекулы захватывали на смоле proA. Смолу промывали PBS pH 7,4, и захваченную молекулу элюировали с использованием 100 мМ глицина pH 2,5 с последующей нейтрализацией десятью объемами 1М Триса, pH 8,5. Белок подвергали буферному обмену на PBS pH 7,4, и анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии на Superdex 200 3.2/300. Был проведен анализ 1 мкг очищенного вещества с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях на 4–12% бис-Трис-геле.

Оба белка, независимо от их ориентации экспрессировались в количестве более, чем 10 мг/мл и были монодиспергированы более, чем на 95% после очистки, на что указывала эксклюзионная хроматография и ДСН-ПААГ в восстанавливающих/невосстанавливающих условиях. В соответствии с этим, были продемонстрированы продуцирование и активность биспецифических молекул с двумя функциями вместе с различными иммуномодуляторами и молекулами, нацеленными на ткань, у N- и С-конца Fc-домена. Это также конкретно указывает на то, что агонист PD-1 и его партнер по связыванию могут экспрессироваться у N- или С-конца Fc-домена Ig.

Пример 6. Биспецифическая молекула, содержащая прототип агониста PD-1, присоединенный к MAdCAM, может одновременно связываться с MAdCAM и PD-1.

Вкратце, планшет с иммуносорбентом покрывали мышиным PD-1 в концентрации 1 мкг/мл в PBS pH 7,4, 75 мкл/лунку, и инкубировали в течение ночи при 4°C. Лунки три

раза промывали PBS pH 7,4, содержащим 0,05% Твина-20 (промывочным буфером), а затем блокировали 200 мкл/лунку 1% BSA в PBS pH 7,4 (блокирующим буфером) в течение двух часов при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером, две биспецифических молекулы, которые содержали прототип агониста PD-1, у N-конца или C-конца, разводили до 1 нМ, 10 нМ и 100 нМ в PBS, содержащим 1% BSA и 0,05% Твина-20 (аналитическом буфере). Разведенное вещество добавляли в планшет, покрытый мышинным PD-1, в концентрации 75 мкл/лунку, в течение 1 часа при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером, в планшет добавляли мышиный MAdCAM в количестве 75 мкл/лунку в концентрации 10 нМ в аналитическом буфере в течение 1 часа при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером, в планшет добавляли козье биотинилированное поликлональное антитело против мышинного MAdCAM, разведенное до 0,5 мкг/мл в аналитическом буфере в количестве 75 мкл/лунку, в течение 1 часа при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером, в планшет добавляли высокочувствительный стрептавидин-ПХ, разведенный в аналитическом буфере 1:5000 в количестве 75 мкл/лунку, в течение 15 минут при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером и 1 промывки промывочным буфером (без Твина-20), аналитический планшет проявляли TMB, и реакцию завершали добавлением 1н HCl. Затем измеряли OD на 450 нм. В эксперимент был включен соответствующий контроль для неспецифического связывания с планшетом/блокирования в отсутствии мышинного PD-1, а также контроль без MAdCAM и моноспецифический контроль, которые не обладали способностью образовывать мостик между мышинным PD-1 и мышинным MAdCAM.

Результаты продемонстрировали, что в концентрациях 1 нМ, 10 нМ и 100 нМ, обе биспецифических молекулы могут одновременно взаимодействовать с мышинным MAdCAM и с мышинным PD-L1, тогда как моноспецифический контроль не дает мостикового сигнала. Кроме того, в любых тестируемых концентрациях, какого-либо связывания любого соединения с MAdCAM не наблюдалось, если мышинный PD-1 отсутствовал на поверхности планшета, что указывает на то, что ни одно из тестируемых соединений специфически не взаимодействует с поверхностью планшета. Таким образом, эти результаты продемонстрировали, что биспецифическая молекула, которая нацеленно связывается с MAdCAM и PD-1, может с успехом связываться с обеими молекулами. Хотя эксперименты были проведены с использованием PD-L1 как заменителя анти-PD-1 антитела, однако, ожидается, что анти-PD-1 антитело будет функционировать аналогичным образом.

Пример 7. Биспецифическая молекула прототипа PD-L1 ингибирует Т-клетки в анализе на агонист PD-1

Биспецифическая молекула, которая имитирует антитело-агонист PD-1, была протестирована для того, чтобы определить, может ли агонист PD-1 ингибировать Т-клетки. Вкратце, 7-недельных самок мышей C57LB/6 умерщвляли и выделяли

спленоциты. Спленоциты обрабатывали ConA в течение 3 дней, а затем обрабатывали анти-CD3 антителом в присутствии или в отсутствии молекулы типа PD-1, которая, в данном примере, представляет собой биспецифическую молекулу PD-L1, которая была связана с планшетом с использованием антитела против человеческого IgG. Затем, Т-клетки презентировали биспецифической молекуле PD-L1. Было обнаружено, что PD-L1, который имитирует анти-PD-1 антитело, представляет собой агонист Т-клеток и ингибирует активацию Т-клеток. Те же самые эксперименты повторяли с использованием биспецифической молекулы PD-L1, которая была присоединена к анти-MAdCAM антителу, которое было связано с планшетом посредством взаимодействия с поверхностью планшета, покрытого MAdCAM. Было обнаружено, что агонист PD-1, который имитирует PD-L1/анти-MAdCAM антитело, является эффективным агонистом активности Т-клеток. Эти результаты показали, что биспецифическая молекула, которая имитирует гибридный белок «анти-PD-1 антитело/MAdCAM», может передавать функциональные ингибирующие сигналы в первичные мышечные бластные Т-клетки, если молекула была захвачена компонентом анти-MAdCAM антитела в конце молекулы.

Пример 8. Биспецифическая молекула прототипа PD-L, связанная с различными тканями, может ингибировать Т-клетки в анализе на агонист PD-1.

Гибридная молекула PD-L1 была использована в качестве заменителя анти-PD-1 антитела и связана с антителом H-2Kk класса I. Молекула PD-L1, связанная с H-2Kk MHC класса I, обладает способностью к функциональному связыванию в соответствии с данными, описанными в Примерах 6 и 7. Вкратце, спленоциты мышей C57B1/6 стимулировали конканавалином А (ConA) и IL-2 в течение 3 дней. Планшеты покрывали анти-CD3 антителом (2C11) в течение ночи при 4°C и промывали. Планшеты покрывали антителом против человеческого IgG в течение 3 часов при 37°C и промывали. После этого добавляли моноспецифическое анти-H-2Kk антитело (16-3-22) или биспецифическое анти-H-2Kk:mPD-L1 антитело и инкубировали в течение 3 часов при 37°C и промывали. Все тестируемые продукты содержали Fc-часть человеческого IgG1. PBS (без Tx) добавляли для определения аналитического фона. ConA-бластные клетки промывали 2 раза, добавляли в планшет и инкубировали при 37°C. Через 24 часа супернатанты удаляли. Уровни IFN γ определяли с помощью MSD. Через 48 часов, жизнеспособность/метаболизм клеток анализировали с использованием Cell Titer-glo. В случае захвата посредством Fc-домена IgG, биспецифический PD-L1, связанный с MHC класса I, может снижать активацию Т-клеток в анализе на агонистическое действие мышечного PD-1. Следовательно, в этом примере продемонстрировано, что биспецифическая молекула другого прототипа может передавать функциональный ингибирующий сигнал первичным мышечным бластным Т-клеткам, если эта молекула была захвачена посредством связывания с другой тканью, а в данном случае, посредством связывания мышечного антитела против H-2Kk MHC класса I. В соответствии с этим, полученные данные продемонстрировали, что такое связывание не является специфичным к MAdCAM, и возможно связывание с другими молекулами, которые могут действовать

как нацеливающие молекулы, описанные в настоящей заявке.

Пример 9. Агонисты PD-1 могут индуцировать передачу сигнала в клетках Jurkat

Клетки Jurkat, экспрессирующие человеческий PD-1, связанный с донором фермента бета-галактозидазы, и SHP-2, связанный с акцептором фермента бета-галактозидазы, добавляли в планшет при соответствующих условиях тестирования и инкубировали в течение 2 часов. Антитела-агонисты PD-1 индуцируют передачу сигнала и рекрутинг SHP-2, комплементацию фермента и образование активного фермента бета-галактозидазы. Затем добавляли субстрат бета-галактозидазы и измеряли хемилюминесценцию на стандартном планшет-ридере для оценки люминесценции. Агонистическое действие оценивали по уровню люминесценции, где повышения уровня люминесценции указывает на усиление агонистического действия.

Агонистическое действие биспецифической молекулы PD-1/MAdCAM измеряли в этом анализе. В качестве антител-агонистов PD-1 использовали C110 (UCB) и CC-90006 (Celgene/Anaptys). Обе эти молекулы являются активными и обладают агонистическим действием на PD-1 в функциональном анализе, осуществляемом посредством захвата Ig. Вкратце, планшеты покрывали антителом против человеческого IgG в течение ночи при 4°C и промывали. После этого добавляли моноклональные антитела против столбнячного токсина (TT) или эталонные антитела-агонисты против PD-1, C110 или CC-90006 и инкубировали в течение 1 часа при 37°C и промывали. Все тестируемые продукты содержали человеческий Fc-IgG1. Для определения аналитического фона добавляли среду (без Tx). Планшеты промывали 3 раза. Затем добавляли клетки Jurkat, экспрессирующие человеческий PD-1, связанный с донором фермента бета-галактозидазы, и SHP-2, связанный с акцептором фермента бета-галактозидазы, и инкубировали в течение 2 часов. Антитела-агонисты PD-1 индуцируют передачу сигнала и рекрутинг SHP-2, комплементацию фермента и образование активного фермента бета-галактозидазы. Затем добавляли субстрат бета-галактозидазы и измеряли хемилюминесценцию на стандартном планшет-ридере для оценки люминесценции. Два человеческих антитела-агониста PD-1 (C110 и CC-90006) связываются и индуцируют передачу сигнала (как суррогат агониста) в модифицированном анализе на репортеры Jurkat. Таким образом, этот анализ представляет собой функциональный анализ на агонистическое действие PD-1. C110:MECA89 (MECA89 является известным анти-MAdCAM антителом) представляет собой новую биспецифическую молекулу, полученную путем присоединения анти-MAdCAM антитела MECA89[scFv], к C-концу тяжелой цепи C110. Было обнаружено, что этот гибридный белок является активным и сообщает агонистическое действие PD-1 в функциональном анализе в случае захвата посредством Fc-домена IgG, как это наблюдается только для белка C110. Однако, только C110:MECA89 является активным в функциональном анализе с использованием белка MAdCAM в качестве белка для захвата (моноспецифические компоненты не передают сигнал).

Вкратце, планшеты покрывали антителом против человеческого IgG или рекомбинантным mMAdCAM-1 в течение ночи при 4°C и промывали. После этого добавляли моноспецифическое антитело против столбнячного токсина (ТТ), антитело против MAdCAM-1 (MECA89) или антитело-агонист против PD-1 (C110) или биспецифическое C110:MECA89 и инкубировали в течение 1 часа при 37°C и промывали. Все тестируемые продукты содержали Fc-часть человеческого IgG1. Для определения аналитического фона добавляли PBS (без Tx). Планшеты промывали 2 раза. Затем добавляли клетки Jurkat, экспрессирующие человеческий PD-1, связанный с донором фермента бета-галактозидазы, и SHP-2, связанный с акцептором фермента бета-галактозидазы, и инкубировали в течение 2 часов. Антитела-агонисты PD-1 индуцируют передачу сигнала и рекрутинг SHP-2, комплементацию фермента и образование активного фермента бета-галактозидазы. Затем добавляли субстрат бета-галактозидазы и измеряли хемилюминесценцию на стандартном планшет-ридере для оценки люминесценции. Результаты: биспецифические молекулы C110 и C110, связанные с MAdCAM, могут индуцировать передачу сигнала PD-1 в репортерном анализе клеток Jurkat, если этот планшет был покрыт анти-IgG Fc для захвата, и только MAdCAM-связанная биспецифическая молекула может индуцировать передачу сигнала PD-1 в репортерном анализе, если планшет был покрыт рекомбинантным белком MAdCAM. Эти результаты показали, что молекула, связанная с MAdCAM и содержащая антитело-агонист PD-1, является функциональной, на что указывали результаты, полученные с использованием PD-L1 в качестве суррогата агониста PD-1.

Пример 10: Получение антител-агонистов PD-1

PD-1-дефицитных мышей иммунизировали мышинным PD-1 в условиях, способствующих выработке иммунного ответа против PD-1. Было получено 54 гибридомы и было выявлено, что они связываются с мышинным PD-1. Антитела, продуцируемые различными гибридомами, анализировали на агонисты Т-клеток в соответствии с методами, описанными в Примерах 4 и 6. Из этих 54 гибридом, по меньшей мере 6 были идентифицированы как агонисты PD-1. Антитела были также протестированы на связывание с PD-1 и было обнаружено, что они связываются в том же сайте, в котором происходит связывание с PD-L1.

Вкратце, связывание с PD-L1-связывающим сайтом определяли с использованием нижеследующего анализа. Планшеты с иммуносорбентом покрывали в течение ночи 75 мкл рекомбинантного мышинного PD-L1-Fc (2 мкг/мл) в 1×PBS, pH 7,4. Затем планшеты 3 раза промывали 1×PBS и блокировали 1×PBS, в который был добавлен 1% BSA, в течение 2 часов при комнатной температуре. Рекомбинантный мышинный PD-1-Fc (1 нМ) инкубировали со 100 нМ указанного антитела против мышинного PD-1 в 1×PBS, в который был добавлен 1% BSA и 0,05% Твин 20 (аналитический буфер), в течение 1 часа при комнатной температуре со встряхиванием. После блокирования, планшеты 3 раза промывали 1×PBS, в который был добавлен 0,05% Твин 20 в PBST, и конъюгаты «антитело-PD-1» инкубировали с мышинным PD-L1, связанным с планшетом. После

отмывки несвязанного PD-1 с использованием PBST, планшеты инкубировали с 75 мкл биотинилированного поликлонального анти-PD-1 антитела (0,5 мкг/мл) в аналитическом буфере с последующей амплификацией посредством стрептавидина-ПХ 1:5000, также разведенного в аналитическом буфере. Планшеты три раза промывали PBST, а затем три раза промывали 1×PBS, после чего добавляли 100 мкл TMB и добавляли 100 мкл 1M HCl для прекращения реакции проявления. Затем считывали оптическую плотность на 450 нм, и результаты нормализовали на связывание PD-1 с PD-L1 в отсутствии антитела. Результаты показали, что активные антитела связываются с сайтом связывания с PD-L1. Неактивные антитела не связываются с сайтом связывания с PD-L1. Следовательно, в этом примере продемонстрирована способность продуцировать анти-PD-1 антитела, которые являются агонистами, а также ранее идентифицированные антитела-агонисты PD-1, описанные в настоящей заявке.

Пример 11: Связанные анти-PD-1 антитела действуют как агонисты PD-1.

Фаговая библиотека человеческих антител scFv была подвергнута пэннингу на рекомбинантные белки PD-1 человека, мышей и собакоподобных обезьян путем проведения итеративных раундов отбора для обогащения клонов антител, которые распознают все три ортолога PD-1 вышеупомянутых видов. Клоны scFv имели конфигурацию nt-VH-линкер-VL-ct и были присоединены к поверхности фага M13 посредством оболочечного белка рIII. После отбора, клональные scFv скринировали на связывание с PD-1 человека, мышей и собакоподобных обезьян, экспрессируемым на поверхности клеток СНО. Клоны, которые, как было обнаружено, перекрестно реагируют со всеми тремя ортологами PD-1, экспрессируемыми на клеточной поверхности, превращали, стандартными методами молекулярной биологии, в человеческий IgG1, где каждая молекула состоит всего из четырех полипептидных цепей (2 тяжелых и 2 легких цепей). Две легких цепи и две тяжелых цепи были идентичны друг другу, как описано в настоящей заявке.

Две идентичные тяжелые цепи подвергаются гомодимеризации, а две идентичные легкие цепи спариваются с каждой тяжелой цепью с образованием интактного человеческого IgG1. Fc-домен содержит мутации L234A, L235A и G237A, блокирующие взаимодействия FcγR. Анти-PD-1 антитела, преобразованные в человеческий IgG1, переносили в клетки НЕК293 Expi и экспрессировали в этих клетках, а затем очищали с помощью хроматографии на белке А. Концентрацию белка определяли на нанокпельном спектрофотометре и вычисляли удельные коэффициенты экстинкции антител. Антитела приготавливали в 1×PBS, pH 7,4.

Затем анти-PD-1 антитела тестировали в описанном здесь анализе клеток Jurkat на агонистическую активность. Вкратце, планшеты для культивирования тканей покрывали антителом против IgG или оставляли без покрытия. Для проведения анализа в формате захвата, тестируемые продукты или контроль добавляли в лунки, покрытые антителом против IgG в концентрации 100 нМ, 25 нМ или 12,5 нМ, и инкубировали в течение 3 часов при 37°C. Планшеты промывали и добавляли PD-1-содержащие клетки Jurkat. Для

анализа, проводимого в формате растворимых веществ, растворимые тестируемые продукты или контроль добавляли в лунки в концентрации 100 нМ, 25 нМ или 12,5 нМ, уже содержащие PD-1-клетки Jurkat. Люминесценцию измеряли на планшет-ридере. Результаты показали, что 9 из 12 человеческих/мышинных перекрестно реагирующих анти-PD-1 антител обладали дозозависимой активностью в анализе клеток Jurkat, если анти-PD-1 антитела были захвачены посредством антитела против IgG, но не растворимого антитела. Эти данные продемонстрировали, что анти-PD-1 антитело может действовать как агонист, если оно связано с мишенью посредством нацеливающей молекулы.

В заключение, не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы отмечают, что представленные здесь данные продемонстрировали, что биспецифическая молекула-агонист PD-1/MAdCAM может связываться с MAdCAM и PD-1, а также повышать Т-клеточную активность. Таким образом, эти молекулы могут быть использованы для лечения различных рассматриваемых здесь состояний и обеспечивают локализованную и/или тканеспецифическую иммуномодуляцию и ингибирование Т-клеточного ответа.

Пример 12: Получение мутеинов IL-2

Вектор рТТ5, содержащий один ген, кодирующий человеческий полипептид IL-2M, присоединенный у N-конца (SEQ ID NO: 57) или у C-конца (SEQ ID NO: 58) к Fc-домену человеческого IgG1, переносили в клетки HEK293 Expi. Через 5-7 дней, супернатанты клеточной культуры, экспрессирующие IL-2M, собирали, осветляли путем центрифугирования и фильтровали через фильтрующее устройство размером 0,22 мкм. IL-2M захватывали на смоле proA. Смолу промывали PBS pH 7,4, и захваченный белок элюировали с использованием 0,25% уксусной кислоты pH 3,5 с последующей нейтрализацией десятью объемами 1M Триса, pH 8,0. Белок подвергали буферному обмену на 30 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7 и анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке с Superdex 200 3.2/300. Был проведен анализ 5 мкг очищенного вещества с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях на 4-12% бис-Трис-геле. IL-2M экспрессировались в количестве более, чем 10 мг/л и были монодиспергированы более, чем на 95% после очистки, на что указывала эксклюзионная хроматография и ДСН-ПААГ в восстанавливающих/невосстанавливающих условиях.

Пример 13. Молекулы IL-2M могут связываться с CD25

Планшет с иммуносорбентом покрывали CD25 в концентрации 0,5 мкг/мл в PBS pH 7,4, 75 мкл/лунку, и инкубировали в течение ночи при 4°C. Лунки три раза промывали PBS pH 7,4, содержащим 0,05% Твина-20 (промывочным буфером), а затем блокировали 200 мкл/лунку 1% BSA в PBS pH 7,4 (блокирующим буфером) в течение двух часов при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером, молекулы IL-2M Примера 12, подвергали серийному 11-2-кратному разведению в PBS, содержащем 1% BSA и 0,05% Твина-20 (в аналитическом буфере), где наивысшей концентрацией является

концентрация 2 нМ. Разведенное вещество добавляли в планшет, покрытый CD25, в концентрации 75 мкл/лунку в течение 1 часа при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером, в планшет добавляли козье биотинилированное поликлональное анти-IL-2 антитело, разведенное до 0,5 мкг/мл в аналитическом буфере в количестве 75 мкл/лунку в течение 1 часа при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером, в планшет добавляли высокочувствительный стрептавидин-ПХ, разведенный в аналитическом буфере 1:5000 в количестве 75 мкл/лунку в течение 15 минут при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером и одной промывки промывочным буфером (без Твина-20), аналитический планшет проявляли ТМВ, и реакцию завершали добавлением 1н HCl. Затем измеряли OD на 450 нм. В эксперимент были включены соответствующий контроль для неспецифического связывания молекул IL-2М с планшетом/блокирования в отсутствии CD25, а также молекула в качестве негативного контроля, которая не обладала способностью связываться с CD25.

Результаты показали, что в концентрациях 2 нМ – 1,9 пМ, молекулы IL-2М могут связываться с CD25 в субнанолярных EC50. Кроме того, в любых тестируемых концентрациях, какого-либо детектирования любого соединения не наблюдалось, если CD25 отсутствовал на поверхности планшета, что указывает на то, что ни одно из тестируемых соединений специфически не взаимодействует с поверхностью планшета (данные не приводятся).

Пример 14. Анализ *in vitro* P-STAT5 для определения активности и селективности молекул IL-2М

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) получали с использованием Фиколла-Пака Premium и пробирок Sepmate из свежевыделенной гепаринизированной человеческой цельной крови. МКПК культивировали в среде RPMI, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку, в присутствии IL-2 дикого типа или IL-2М Примера 12 в течение 20 минут, а затем фиксировали в течение 10 минут на BD Cytotfix. Фиксированные клетки последовательно делали проницаемыми с использованием BD Perm III, а затем с использованием буфера для сообщения проницаемости BioLegend FOXP3. После блокирования человеческой сывороткой в течение 10 минут, клетки в течение 30 минут окрашивали антителами на фосфо- STAT5 FITC, CD25 PE, FOXP3 AF647 и CD4 PerCP Cy5.5, после чего помещали на Attune NXT с планшет-ридером. IL-2М Примера 12 сильно и селективно индуцировал фосфорилирование STAT5 в Treg, но не в Teff.

Пример 15. Способы получения биспецифических молекул IL-2М, связанных с MAdCAM

Вектор pTT5, содержащий один ген, кодирующий один полипептид B0001, содержащий мутеин IL-2 с мутациями N88D, V69A и Q74P, присоединенный к Fc-белку с описанными здесь мутациями LALA, вместе с линкером GGGS(×3) и антителом scFv, которое связывается с MAdCAM или аналогичной молекулой, но содержащей линкер

GGGS(×4) B0002 и человеческий IL-2, присоединенный у N-конца к Fc-домену человеческого IgG1 и у C-конца к анти-mAdCAM scFv MECA-89, переносили в клетки HEK293 Expi. Для B0003, две плазмиды были котрансфицированы в эквимольных отношениях. Первая плазида кодирует легкую цепь MECA-89, а вторая кодирует полноразмерную тяжелую цепь IgG1 MECA-89 вместе с человеческим IL-2M, присоединенным у C-конца. Через 5–7 дней, супернатанты клеточной культуры, экспрессирующие B0001, B0002 и B0003, собирали, осветляли путем центрифугирования и фильтровали через фильтрующее устройство размером 0,22 мкм. B0001, B0002 и B0003 захватывали на смоле proA. Смолу промывали PBS pH 7,4, и захваченный белок элюировали с использованием 0,25% уксусной кислоты pH 3,5 с последующей нейтрализацией десятью объемами 1М Триса, pH 8,0. Белок подвергали буферному обмену на 30 мМ HEPES, 150 мМ NaCl pH 7, и анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии на Superdex 200 3.2/300. Был проведен анализ 1 мкг очищенного вещества с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях на 4–12% бис-Трис-геле.

B0001, B0002 и B0003 экспрессировались в количестве более, чем 8 мг/л и были монодиспергированы более, чем на 95% после очистки, на что указывала эксклюзионная хроматография и ДСН-ПААГ в восстанавливающих/невосстанавливающих условиях. Этот эксперимент показал, что могут быть продуцированы биспецифические молекулы с двойной функцией, содержащие иммуномодуляторы у N- или C-конца, и что положение белка IL-2M (у N- или C-конца) значительно не изменяет уровень экспрессии, а следовательно, такой белок может быть использован в любой форме.

Пример 16. Биспецифические молекулы IL-2M, связанные с MAdCAM, могут одновременно связываться с MAdCAM и CD25.

Планшет с иммуносорбентом покрывали рекомбинантным мышинным MAdCAM в концентрации 1 мкг/мл в PBS pH 7,4, 75 мкл/лунку, и инкубировали в течение ночи при 4°C. Лунки три раза промывали PBS pH 7,4, содержащим 0,05% Твина-20 (промывочным буфером), а затем блокировали 200 мкл/лунку 1% BSA в PBS pH 7,4 (блокирующим буфером) в течение двух часов при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером, B0001, B0002 и B0003 разводили до 1 нМ, 10 нМ и 100 нМ в PBS, содержащим 1% BSA и 0,05% Твина-20 (в аналитическом буфере). Разведенное вещество добавляли в планшет, покрытый мышинным MAdCAM, в концентрации 75 мкл/лунку в течение 1 часа при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером, в планшет добавляли человеческий CD25 в количестве 75 мкл/лунку и в концентрации 10 нМ в аналитическом буфере в течение 1 часа при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером, в планшет добавляли козье биотинилированное поликлональное антитело против человеческого CD25, разведенное до 0,4 мкг/мл в аналитическом буфере в количестве 75 мкл/лунку, в течение 1 часа при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером, в планшет добавляли высокочувствительный стрептавидин-ПХ, разведенный в аналитическом буфере 1:5000 в

количестве 75 мкл/лунку, в течение 15 минут при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером и одной промывки промывочным буфером (без Твина-20), аналитический планшет проявляли TMB, и реакцию завершали добавлением 1н HCl. Затем измеряли OD на 450 нм. В эксперимент был включен соответствующий контроль для неспецифического связывания белков Примера 15/блокирования в отсутствии мышиного MAdCAM, а также контроль без CD25 и моноспецифический контроль, которые не обладали способностью образовывать мостик между мышиным CD25 и мышиным MAdCAM.

Было обнаружено, что в концентрациях 1 нМ, 10 нМ и 100 нМ, биспецифические молекулы Примера 15 могут одновременно взаимодействовать с мышиным MAdCAM и с человеческим CD25, тогда как моноспецифический контроль не дает мостикового сигнала. Кроме того, в любых тестируемых концентрациях, какого-либо связывания любого соединения с CD25 не наблюдалось, если мышиный MAdCAM отсутствовал на поверхности планшета, что указывает на то, что ни одно из тестируемых соединений специфически не взаимодействует с поверхностью планшета. Эти результаты продемонстрировали, что биспецифические молекулы могут одновременно связываться с MAdCAM и с CD25 в функциональном анализе на связывание, таком как ELISA.

Пример 17. Анализ P-STAT5 *in vitro* продемонстрировал активность и селективность биспецифического MAdCAM-связанного IL-2M, если он присутствует в растворе или в связанной форме

Рекомбинантный мышиный MAdCAM наносили на лунки 96-луночного планшета с высоким уровнем связывания (Corning) в течение ночи. После 2 промывок PBS, планшет блокировали средой RPMI с 10% FBS в течение 1 часа. MAdCAM-связанный биспецифический IL-2M Примера 15 или несвязанный контрольный IL-2M (такой как IL-2M, полученный в Примере 12) захватывали в течение 1 часа. После 2 промывок PBS, свежeweделенные человеческие МКПК стимулировали в течение 60 минут захваченным IL-2M или, для сравнения, IL-2M в растворе. Затем клетки фиксировали в течение 10 минут на BD Cytofix, и последовательно делали проницаемыми с использованием BD Perm III, а затем с использованием буфера для сообщения проницаемости BioLegend FOXP3, после чего блокировали человеческой сывороткой и окрашивали в течение 30 минут антителами против фосфо-STAT5 FITC (CST), CD25 PE, FOXP3 AF647 и CD4 PerCP Cy5.5 (BD), а затем помещали на Attune NXT с планшет-ридером. В растворе, обе молекулы имеют сравнимую активность и селективность на Treg и Teff. Планшеты, покрытые мышиным MAdCAM, обладали способностью захватывать биспецифическую молекулу Примера 15, и захваченная/иммобилизованная биспецифическая молекула еще обладала способностью селективно активировать T_{regs}, но не T_{effs}. Этот пример продемонстрировал, что молекулы IL-2M, связанные с MAdCAM, могут сохранять биологическую активность и селективность, если они присутствуют в растворе, или если они являются захваченными/иммобилизованными.

Пример 18: Иммуногенность мутеинов IL-2

Последовательности мутеинов IL-2 анализировали с использованием компьютерной программы NetMHCIIpan 3.2, которую можно найти на сайте «dot» cbs «dot» dtu «dot» dk/services/NetMHCIIpan/. Искусственные сети нейронов были использованы для определения аффинности пептидов к аллелям МНС класса II. В этом анализе, пептиды из 9 остатков, которые могут непосредственно взаимодействовать с молекулами МНС класса II, распознавались как связывающиеся сердцевины. Остатки, которые находятся рядом со связывающимися сердцевинами, и которые могут опосредованно влиять на связывание, были также оценены как маскирующие остатки. Пептиды, содержащие связывающиеся сердцевины и маскирующие остатки, были обозначены как остатки с высоким уровнем связывания, если их предсказанная K_D для молекулы МНС класса II была ниже, чем 50 нМ. Остатки с высоким уровнем связывания имели больше шансов сообщать Т-клеточную иммуногенность.

Всего 9 аллелей МНСII, которые являются в высокой степени репрезентативными в Северной Америке и в Европе, были включены в анализ *in silico*. Панель тестируемых молекул IL-2M (мутеина IL-2) включала мутеины IL-2 с мутациями L53I, L56I, L80I или L118I. Только аллели МНСII DRB1_1101, DRB1_1501, DRB1_0701 и DRB1_0101 давали наилучшие результаты вместе с любой из оцениваемых молекул. Наилучшие пептиды для DRB1_1501 имели идентичные тестируемые конструкции, включая IL-2 дикого типа с мутацией C125S. Добавление L80I приводит к удалению одного Т-клеточного эпитопа для DRB1_0101 [ALNLAPSKNFHLRPR] и к умеренному снижению аффинности двух других Т-клеточных эпитопов [EEALNLAPSKNFHLR и EALNLAPSKNFHLRP]. В случае аллеля МНСII DRB1_0701, L80I приводит к удалению одного Т-клеточного эпитопа [EEALNLAPSKNFHLR]. Следовательно, полученные данные продемонстрировали, что мутеин IL-2, содержащий мутацию L80I, должен быть менее иммуногенным, что делает результат анализа *in silico* удивительным и неожиданным.

Пример 19: Получение дополнительных мутеинов IL-2

Вектор pTT5, содержащий один ген, кодирующий один полипептид IL-2M (мутеин IL-2) полипептида SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 (и IL-2M-контроля; SEQ ID NO: 50) с человеческим IL-2M, присоединенным у N-конца к Fc-домену человеческого IgG1, переносили в клетки HEK293 Expi. Через 5–7 дней, супернатанты клеточной культуры, экспрессирующие SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 (и IL-2M-контроля; SEQ ID NO: 50), собирали, осветляли путем центрифугирования и фильтровали через фильтрующее устройство размером 0,22 мкм. SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 (и IL-2M-контроля; SEQ ID NO: 50) захватывали на смоле proA. Смолу промывали PBS pH 7,4, и захваченный белок элюировали с использованием 0,25% уксусной кислоты pH 3,5 с последующей нейтрализацией десятью объемами 1М Триса, pH 8,0. Белок подвергали буферному обмену на 30 мМ HEPES, 150 мМ NaCl pH 7, и анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке с Superdex 200 3.2/300. Был проведен анализ 5 мкг очищенного вещества с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в восстанавливающих и

невосстанавливающих условиях на 4–12% бис–Трис–геле.

SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 IL–2M (и IL–2M–контроль; SEQ ID NO: 50) экспрессировались в количестве более, чем 45 мкг/л и были монодиспергированы более, чем на 95% после очистки, на что указывала эксклюзионная хроматография и ДСН–ПААГ в восстанавливающих/невосстанавливающих условиях.

Пример 20: IL–2M Примера 19 может связываться с CD25

Планшет с иммуносорбентом покрывали CD25 в концентрации 0,5 мкг/мл в PBS pH 7,4, 75 мкл/лунку, и инкубировали в течение ночи при 4°C. Лунки три раза промывали PBS pH 7,4, содержащим 0,05% Твина–20 (промывочным буфером), а затем блокировали 200 мкл/лунку 1% BSA в PBS pH 7,4 (блокирующим буфером) в течение двух часов при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером, IL–2M SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56 подвергали серийному 11–2–кратному разведению в PBS, содержащем 1% BSA и 0,05% Твина–20 (в аналитическом буфере), где наивысшей концентрацией является концентрация 2 нМ. Разведенное вещество добавляли в планшет, покрытый CD25, в концентрации 75 мкл/лунку, в течение 1 часа при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером, в планшет добавляли козье биотинилированное поликлональное анти–IL–2 антитело, разведенное до 0,5 мкг/мл в аналитическом буфере в количестве 75 мкл/лунку, в течение 1 часа при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером, в планшет добавляли высокочувствительный стрептавидин–ПХ, разведенный в аналитическом буфере 1:5000 в количестве 75 мкл/лунку, в течение 15 минут при комнатной температуре. После трех промывок промывочным буфером и 1 промывки промывочным буфером (без Твина–20), аналитический планшет проявляли TMB, и реакцию завершали добавлением 1н HCl. Затем измеряли OD на 450 нм. В эксперимент были включены соответствующий контроль для неспецифического связывания молекул с планшетом/блокирования в отсутствии CD25. Результаты показали, что при концентрациях 2 нМ – 1,9 пМ, мутеины Примера 19 могут связываться с CD25 в субнаномолярных EC50. Кроме того, в любых тестируемых концентрациях, какого–либо детектирования любого соединения не наблюдалось, если CD25 отсутствовал на поверхности планшета, что указывает на то, что ни одно из тестируемых соединений специфически не взаимодействует с поверхностью планшета. Таким образом, мутеины Примера 19 могут связываться с CD25.

Пример 21: Мутеины IL–2 Примера 19 являются эффективными и селективными

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) получали с использованием Фиколла–Пака Premium и пробирок Sepmate из свежевыделенной гепаринизированной человеческой цельной крови. МКПК культивировали в среде RPMI, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку, в присутствии IL–2 дикого типа или мутеинов Примера 19 в течение 20 минут, а затем фиксировали в течение 10 минут на BD Cytotfix. Фиксированные клетки последовательно делали проницаемыми с использованием

BD Perm III, а затем с использованием буфера для сообщения проницаемости BioLegend FOXP3. После блокирования человеческой сывороткой в течение 10 минут, клетки в течение 30 минут окрашивали антителами против фосфо-STAT5 FITC (CST), CD25 PE, FOXP3 AF647 и CD4 PerCP Cy5.5 (все от BD), после чего помещали на Attune NXT с планшет-ридером. Было обнаружено, что мутеины IL-2 Примера 19 являются сильными и селективными против Treg, но не Teff. Было обнаружено, что мутеин, содержащий мутацию L118I, обладает повышенной активностью и селективностью по сравнению с другими мутеинами.

Пример 22: Мутеины IL-2 способствуют размножению Treg у гуманизованных мышей

Мышей NSG, гуманизованных человеческими гемопоэтическими стволовыми CD34⁺-клетками, закупают у Jackson Labs. На дни 0 и 7, мышам подкожно вводят дозу 1 мкг мутеина IL-2 (SEQ ID NO: 50) или других мутеинов IL-2 SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 или SEQ ID NO: 56. На день 7, мышей подвергали эвтаназии и брали цельную кровь и селезенку. Аликвоты цельной крови помещали в 96-луночный планшет с глубокими лунками и фиксировали в течение 10 минут с использованием BD Fix Lyse. Спленциты выделяли с использованием 70 мкм-фильтров (BD), и эритроциты подвергали лизису с использованием буфера для лизиса эритроцитов от BioLegend. После промывки PBS с 2% фетальной бычьей сывороткой, спленциты метили красителем, излучающим в ближнем инфракрасном диапазоне, для живых-погибших клеток (Invitrogen) в течение 20 минут, а затем фиксировали в течение 20 минут с использованием буфера для фиксации BioLegend. После этого, клетки цельной крови и спленциты делали проницаемыми с использованием буфера для сообщения проницаемости BioLegend FOXP3, блокировали человеческой сывороткой и окрашивали в течение 30 минут антителами против человеческого CD8a FITC (BL), человеческого CD25 PE (BD), человеческого FOXP3 AF647 (BD) CD4 PerCP Cy5.5 (BD), человеческого Siglec-8 PE Cy7 (BL), человеческого CD3 BV421 (BL), человеческого CD45 BV605 (BL), человеческого CD56 BV785 (BL) и мышинового CD45 (BV711), а затем помещали на Attune NXT с планшет-ридером.

По сравнению с контролем-носителем, IL-2M SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 56 селективно индуцировали Treg в мышинной селезенке и в цельной крови ($p < 0,0005$, оцененная в анализе ANOVA с помощью критерия множественного сравнения Данна). Другие IL-2M также способствовали повышению частоты Treg, хотя эти изменения не являются статистически значимыми по сравнению с группой, которой вводили носитель. У мышей, которым вводили дозу SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 56, не наблюдалось каких-либо значимых изменений частоты CD56-позитивных NK-клеток, CD3-позитивных T-клеток, CD8-позитивных цитотоксических T-лимфоцитов, CD8-позитивных хелперных T-клеток или CD25^{lo}/FOXP3-негативных эффекторных T-клеток. Эти результаты продемонстрировали, что мутеины IL-2 повышают частоту регуляторных T-клеток.

Пример 23: Получение биспецифической молекулы IL-2M, связанной с

mMAdCAM

Был получен биспецифический мутеин mMAdCAM–IL–2 с использованием антитела, представляющего собой тяжелые и легкие цепи MECA89. Этот мутеин получали с использованием двух плазмид, кодирующих тяжелые и легкие цепи, и котрансфецировали в эквимоллярных отношениях. Первая плазида кодирует легкую цепь MECA–89, а вторая кодирует полноразмерную тяжелую цепь IgG1 MECA–89 вместе с человеческим IL–2M, присоединенным у С–конца и содержащим мутацию L118I. Через 3–5 дней, супернатанты клеточной культуры, экспрессирующие биспецифическую молекулу, собирали, осветляли путем центрифугирования и фильтровали через фильтрующее устройство размером 0,22 мкм. Биспецифическую молекулу захватывали на смоле proA. Смолу промывали PBS pH 7,4, и захваченный белок элюировали с использованием 0,25% уксусной кислоты pH 3,5 с последующей нейтрализацией десятью объемами 1M Триса, pH 8,0. Белок подвергали буферному обмену на 30 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7, и анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии на ЭХ–колонке AdvanceBio. Был проведен анализ 1 мкг очищенного вещества с помощью электрофореза в ДСН–ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях на 4–12% бис–Трис–геле.

Биспецифическая молекула экспрессировалась в количестве 17 мг/л и была монодиспергирована более, чем на 95% после очистки, на что указывала эксклюзионная хроматография и ДСН–ПААГ в восстанавливающих/невосстанавливающих условиях. Эти результаты показали, что можно получить биспецифические молекулы с двумя функциями, содержащие иммуномодуляторы у С–конца.

Пример 24: Получение анти–MAdCAM антител

Фаговая библиотека человеческих антител scFv была подвергнута пэннингу на рекомбинантные белки mMAdCAM человека, мышей и собакоподобных обезьян путем проведения итеративных раундов отбора для обогащения клонов антител, которые распознают все три ортолога mMAdCAM вышеупомянутых видов. Клоны scFv имели конфигурацию nt–VH–линкер–VL–ct и были присоединены к поверхности фага M13 посредством оболочечного белка pIII. После отбора, клональные scFv скринировали с помощью ELISA на связывание с mMAdCAM человека, мышей и собакоподобных обезьян, экспрессируемым на поверхности клеток CHO. Клоны, которые, как было обнаружено, перекрестно реагируют со всеми тремя ортологами mMAdCAM, экспрессируемыми на клеточной поверхности, превращали, стандартными методами молекулярной биологии или генного синтеза, в человеческий IgG1, где каждая молекула состоит всего из четырех полипептидных цепей (2 тяжелых и 2 легких цепей). Две легкие цепи и две тяжелые цепи были идентичны друг другу. Две идентичные тяжелые цепи (1 и 2) подвергаются гомодимеризации, а две идентичные легкие цепи (3 и 4) спариваются с каждой тяжелой цепью с образованием интактного человеческого IgG1. Fc–домен содержит мутации L234A, L235A и G237A, блокирующие взаимодействия FcγR. Эти формы проиллюстрированы ниже:

Цепь 1: nt–VH1–CH1–CH2–CH3–ct

Цепь 2: nt–VH1–CH1–CH2–CH3–ct

Цепь 3: nt–VK1–CK–ct

Цепь 4: nt–VK1–CK–ct

Кроме того, scFv против MAdCAM также превращали, стандартными методами молекулярной биологии (такими как метод клонирования Гибсона) или с помощью генного синтеза, в биспецифическую форму, где IL–2M присутствует у C–конца тяжелой цепи IgG анти–MAdCAM антитела, как показано ниже:

Цепь 1: nt–VH1–CH1–CH2–CH3–ct–линкер–IL–2M

Цепь 2: nt–VH1–CH1–CH2–CH3–ct–линкер–IL–2M

Цепь 3: nt–VK1–CK–ct

Цепь 4: nt–VK1–CK–ct

ELISA был проведен для анализа связывания внти–MAdCAM scFv с захваченными MAdCAM человека, собакоподобных обезьян и мышей или с указанным MAdCAM, связанным с планшетом. Биотинилированный MAdCAM человека и собакоподобных обезьян захватывали на планшете, покрытом стрептавидином, и мышиный MAdCAM–Fc непосредственно наносили на планшет с иммуносорбентом. После стадии блокирования, планшеты промывали, и на поверхность планшета наносили scFv в неочищенном периплазматическом лизате. Связывание с scFv детектировали с использованием конъюгата «анти–V5 антитело – ПХ». В этом анализе, проявление осуществляли с использованием субстрата TMB, и реакцию прекращали добавлением кислоты. Затем измеряли оптическую плотность на 450 нм. Между каждой стадией ELISA проводили соответствующие стадии промывки. После этого оценивали данные анализа для человека и собакоподобных обезьян и для человека и мышей. scFv также анализировали методом поверхностного плазмонного резонанса. После захвата на биосенсорной поверхности посредством метки V5, растворимый мономерный человеческий MAdCAM титровали, а затем оценивали уровни связывания и диссоциации и строили кривую для модели связывания 1:1, что позволяло определить коэффициенты ассоциации и диссоциации.

Результаты измерения показали, что большинство тестируемых клонов обладают перекрестной реактивностью при связывании MAdCAM человека и собакоподобных обезьян и лишь небольшая панель обладает дополнительной перекрестной реактивностью с мышиным MAdCAM. Биосенсорные эксперименты продемонстрировали, что эти клоны имели уровень ассоциации и диссоциации при связывании с человеческим MAdCAM с величинами k_d в пределах от 10^3 до 10^7 1/мс и с величинами k_d в пределах от 10^{-1} до 10^{-4} 1/с. Некоторые клоны имеют скорость диссоциации менее, чем 2×10^2 1/с. Таким образом, анти–MAdCAM антитела были получены и могут быть использованы в биспецифической форме.

Пример 25: Получение биспецифических IL–2M Примера 19, связанных с человеческим MAdCAM

Каждую из двух плазмид котрансфецировали в эквимольных отношениях. В

каждом случае, первая плазмида кодирует легкую цепь чел.MAdCAM, а вторая кодирует полноразмерную тяжелую цепь IgG1 чел.MAdCAM вместе с человеческим IL-2M, присоединенным у С-конца и содержащим мутацию L118I, как показано в Таблице, в которой представлены биспецифические соединения мутеина MAdCAM-IL-2. Через 3–5 дней, супернатанты клеточной культуры, экспрессирующие биспецифические соединения чел.MAdCAM-IL-2M, собирали, осветляли путем центрифугирования и фильтровали через фильтрующее устройство размером 0,22 мкм. Биспецифические соединения чел.MAdCAM-IL-2M захватывали на смоле proA. Смолу промывали PBS pH 7,4, и захваченные белки элюировали с использованием 0,25% уксусной кислоты pH 3,5 с последующей нейтрализацией десятью объемами 1М Триса, pH 8,0. Белки подвергали буферному обмену на 30 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7, и анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии на ЭХ-колонке AdvanceBio. Был проведен анализ 1 мкг очищенного вещества с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях на 4–12% бис-Трис-геле. Биспецифические соединения чел.MAdCAM-IL-2M экспрессировались в количестве, превышающем 10 мг/л, и были монодиспергированы более, чем на 95% после очистки, на что указывала эксклюзионная хроматография и ДСН-ПААГ в восстанавливающих/невосстанавливающих условиях. Таким образом, эти результаты показали, что можно получить полностью человеческие биспецифические молекулы с двумя функциями, содержащие иммуномодуляторы у С-конца.

Пример 26: Длительность передачи сигнала, индуцированного мутеинами IL-2

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) получали с использованием Фиколла-Пака Premium и пробирок Sepmate из свежевыделенной гепаринизированной человеческой цельной крови. МКПК культивировали в среде RPMI, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку, в присутствии IL-2M в течение 60 минут. Затем клетки 3 раза промывали и инкубировали еще 3 часа. После этого, клетки фиксировали в течение 10 минут на BD Cytotfix. Фиксированные клетки последовательно делали проницаемыми с использованием BD Perm III, а затем с использованием буфера для сообщения проницаемости BioLegend FOXP3. После блокирования человеческой сывороткой в течение 10 минут, клетки окрашивали в течение 30 минут антителами против фосфо-STAT5 FITC, CD25 PE, FOXP3 AF647 и CD4 PerCP Cy5.5, после чего помещали на Attune NXT с планшет-ридером. Все четыре мутеина IL-2 Примера 19 индуцировали длительную передачу сигнала в Treg, но не в Teff, по сравнению с контролем. Мутеин IL-2 SEQ ID NO: 56 был лучше, чем мутеин IL-2 SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 54 или SEQ ID NO: 53. Эти результаты продемонстрировали, что IL-2 может индуцировать длительную и селективную передачу сигнала в Treg, что будет приводить к более усиленному размножению Treg *in vivo*, и для такого размножения Treg потребуется менее частое введение доз.

Пример 27. Анализ P-STAT5 *in vitro* продемонстрировал активность и

селективность биспецифических мутеинов IL-2, связанных с чел.MAdCAM, если он присутствует в растворе или в связанной форме

Рекомбинантный мышинный MAdCAM наносили на лунки 96-луночного планшета с высоким уровнем связывания (Corning) в течение ночи. После 2 промывок PBS, планшет блокировали средой RPMI с 10% FBS в течение 1 часа. Биспецифические мутеины IL-2M, связанные с MAdCAM, или несвязанный IL-2M-контроль захватывали в течение 1 часа. После 2 промывок PBS, свежевыделенные человеческие МКПК стимулировали в течение 60 минут захваченным IL-2MM или, для сравнения, IL-2MM в растворе. Затем клетки фиксировали в течение 10 минут на BD Cytotfix, и последовательно делали проницаемыми с использованием BD Perm III, а затем с использованием буфера для сообщения проницаемости BioLegend FOXP3, после чего блокировали человеческой сывороткой и окрашивали в течение 30 минут антителами против фосфо-STAT5 FITC (CST), CD25 PE, FOXP3 AF647 и CD4 PerCP Cy5.5 (BD), а затем помещали на Attune NXT с планшет-ридером. Результаты: в растворе, биспецифические молекулы IL-2M, связанные с человеческим MAdCAM, и контроль имели сравнимую активность и селективность в отношении Treg и Teff. Планшеты, покрытые MAdCAM, обладали способностью селективно захватывать биспецифические молекулы, а захваченные/иммобилизованные биспецифические молекулы еще обладали способностью селективно активировать Treg, но не Teff. Этот пример продемонстрировал, что биспецифические молекулы IL-2MM, нацеленные на человеческий MAdCAM, могут сохранять биологическую активность и селективность, если они присутствуют в растворе или если они являются захваченными/иммобилизованными.

Представленные здесь примеры продемонстрировали удивительный и неожиданный результат, указывающий на то, что биспецифическая молекула, содержащая анти-MAdCAM антитело и мутеин IL-2, может селективно и эффективно активировать Treg, но не Teff, и на то, что эти молекулы могут быть использованы для лечения или ослабления описанных здесь состояний. В примерах также продемонстрировано, что мутеин IL-2 может селективно и эффективно активировать Treg, но не Teff, если он используется отдельно (или в форме, связанной с Fc-белком), как проиллюстрировано в настоящей заявке.

Раскрытие всех и каждого цитируемых здесь патентов, патентных заявок и публикаций включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Хотя различные варианты осуществления изобретения раскрываются со ссылкой на конкретные его аспекты, однако, специалистам в данной области очевидно, что в них могут быть включены и другие аспекты и варианты, не выходящие за рамки истинного существа и объема изобретения. Прилагаемая формула изобретения должна включать все указанные аспекты и эквивалентные варианты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий нацеливающую молекулу, которая связывается с клеткой–мишенью, и молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, где молекула, связывающаяся с эффектором/модулирующая эффектор, представляет собой полипептид мутеина IL–2 (мутеина IL–2).

2. Полипептид по п. 1, где нацеливающая молекула содержит антитело, которое связывается с белком–мишенью на поверхности клетки–мишени.

3. Полипептид по п. 1, где антителом является антитело, которое связывается с MAdCAM, OAT1, OCT2, FXYD2, TSPAN7, DPP6, HEPACAM2, TMEM27 или GPR119.

4. Полипептид по п. 1, где мутеин IL–2 связывается с рецептором, экспрессируемым иммунной клеткой.

5. Полипептид по п. 1, где иммунная клетка участвует в выработке нежелательного иммунного ответа.

6. Полипептид по п. 1, где иммунная клетка вызывает патологическое состояние.

7. Полипептид по п. 1, где нацеливающая молекула содержит анти–MAdCAM антитело.

8. Полипептид по п. 1, где соединение имеет формулу от N–конца до C–конца:

R1–линкерная область A–R2 или R3–линкерная область B–R4,

где каждый из R1, R2, R3 и R4 независимо содержит молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, специфически нацеливающую молекулу или отсутствует.

9. Полипептид по п. 8, где каждая из линкерной области A и линкерной области B содержит Fc–область.

10. Полипептид по п. 9, где один из R1 и R2 представляет собой антитело IL–мутеин, и один из R1 и R2 представляет собой анти–MAdCAM антитело.

11. Полипептид по п. 8, где R1 представляет собой IL–мутеин, а R2 представляет собой анти–MAdCAM антитело.

12. Полипептид по п. 8, где один R1 представляет собой анти–MAdCAM антитело, и один R2 представляет собой анти–PD–1 антитело.

13. Полипептид по п. 8, где один из R3 и R4 представляет собой мутеин IL–2, и один из R3 и R4 представляет собой анти–MAdCAM антитело.

14. Полипептид по п. 8, где R3 представляет собой мутеин IL–2, а R4 представляет собой анти–MAdCAM антитело.

15. Полипептид по п. 8, где R3 представляет собой анти–MAdCAM антитело, а R4 представляет собой мутеин IL–2.

16. Полипептид по любому из п.п. 8–15, где линкер отсутствует.

17. Полипептид по любому из п.п. 8–15, где линкер представляет собой Fc–область.

18. Полипептид по любому из п.п. 8–15, где линкер представляет собой глициновый/сериновый линкер.

19. Полипептид по п. 8, где линкер представляет собой последовательность

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, GGGGSGGGGSGGGGS, GGGGSGGGGS или GGGGS.

20. Полипептид по п. 1, где мутеин IL-2 содержит последовательность IL-2 SEQ ID NO: 6, где пептид содержит мутацию в положении, которое соответствует положению 53, 56, 80 или 118 SEQ ID NO: 6.

21. Полипептид по любому из п.п. 1–20, где мутеин IL-2 содержит последовательность IL-2 SEQ ID NO: 6, где пептид содержит мутацию в положении, которое соответствует положению 53, 56, 80 или 118 SEQ ID NO: 6.

22. Полипептид по п. 20, где мутацией является замена L на I в положении 53, 56, 80 или 118.

23. Полипептид по п. 21, где мутацией является замена L на I в положении 53, 56, 80 или 118.

24. Полипептид по п.п. 1, 20 или 23, также включающий мутацию в одном или более положениях 29, 31, 35, 37, 48, 69, 71, 74, 88 и 125 в SEQ ID NO: 6.

25. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, где мутеин также содержит мутацию в одном или более положениях E15, H16, Q22, D84, E95 или Q126 или в 1, 2, 3, 4, 5 или в каждом из положений E15, H16, Q22, D84, E95 или Q126 дикого типа.

26. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, где мутацией в мутеине является одна или более из E15Q, H16N, Q22E, D84N, E95Q или Q126E.

27. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, где мутеин содержит мутацию N29S в SEQ ID NO: 6.

28. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, где мутеин содержит мутацию Y31S или Y51H.

29. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, где мутеин содержит мутацию K35R.

30. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, где мутеин содержит мутацию T37A.

31. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, где мутеин содержит мутацию K48E.

32. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, где мутеин содержит мутацию V69A.

33. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, где мутеин содержит мутацию N71R.

34. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, где мутеин содержит мутацию Q74P.

35. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, где мутеин содержит мутацию N88D или N88R.

36. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, где мутеин содержит мутацию C125A или C125S.

37. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, где мутеин IL-2 присоединен к Fc-пептиду или связан с Fc-пептидом.

38. Полипептид по п. 37, где Fc-пептид содержит мутацию в одном или более положениях L234, L247, L235, L248, G237 и G250.

39. Полипептид по п. 37, где мутацией является замена L на A или G на A.

40. Полипептид по п. 37, где Fc-пептид содержит мутации L247A, L248A и/или G250A.

41. Полипептид по п. 37, где Fc-пептид содержит мутацию L234A, мутацию L235A и/или мутацию G237A.

42. Полипептид по п. 1, где полипептид включает первую цепь и вторую цепь, образующие полипептид, где

первая цепь содержит:

V_H - H_c -линкер- C_1 , где V_H представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи, который связывается с клеткой-мишенью с V_L -доменом второй цепи; H_c представляет собой тяжелую цепь антитела, содержащую домен $CH1$ - $CH2$ - $CH3$; линкер представляет собой глициновый/сериновый линкер, а C_1 представляет собой мутеин IL-2, присоединенный к Fc-белку в N-концевой или C-концевой ориентации; и

вторая цепь содержит:

V_L - L_c , где V_L представляет собой вариабельный домен легкой цепи, который связывается с клеткой-мишенью с V_H -доменом первой цепи, а домен L_c представляет собой домен СК легкой цепи.

43. Полипептид по п. 42, где V_H - и V_L -домены представляют собой вариабельные домены анти-MAdCAM антитела, которые связываются с MAdCAM, экспрессируемым на клетке.

44. Полипептид по п. 42, где мутеин IL-2 содержит мутацию в положении, которое соответствует положению 53, 56, 80 или 118 SEQ ID NO: 6.

45. Полипептид по п. 44, где мутацией является замена L на I в положении 53, 56, 80 или 118.

46. Полипептид по п. 44, где мутеин также содержит мутацию в положении, которое соответствует положению 69, 75, 88 или 125 или в любых их комбинациях.

47. Полипептид по п. 44, содержащий мутацию, выбранную из группы, состоящей из L53I, L56I, L80I и L118I и мутаций V69A, Q74P, N88D или N88R, и необязательно C125A или C125S.

48. Полипептид по п. 47, где мутеин IL-2 содержит мутацию L53I.

49. Полипептид по п. 47, где мутеин IL-2 содержит мутацию L56I.

50. Полипептид по п. 47, где мутеин IL-2 содержит мутацию L80I.

51. Полипептид по п. 47, где мутеин IL-2 содержит мутацию L118I.

52. Полипептид по п. 47, где мутеин IL-2 не содержит каких-либо других мутаций.

53. Полипептид по п. 47, где Fc-пептид содержит мутации L247A, L248A, и G250A или мутацию L234A, мутацию L235A и/или мутацию G237A в соответствии с нумерацией по Кэбату.

54. Полипептид по п. 47, где линкер содержит последовательность

GGGGSGGGGSGGGGS или GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS.

55. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, где полипептид содержит Fc-пептид, включающий описанную здесь последовательность.

56. Способ лечения индивидуума с воспалительным заболеванием кишечника, где указанный способ включает введение индивидууму полипептида по любому из п.п. 1–55 для лечения воспалительного заболевания кишечника.

57. Способ по п. 56, где индивидуум с воспалительным заболеванием кишечника страдает болезнью Крона.

58. Способ по п. 56, где индивидуум с воспалительным заболеванием кишечника страдает язвенным колитом.

59. Способ лечения индивидуума с аутоиммунным гепатитом, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтического соединения по любому из п.п. 1–55 для лечения аутоиммунного гепатита.

60. Способ лечения первичного склерозирующего холангита, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтического соединения по любому из п.п. 1–55 для лечения первичного склерозирующего холангита.

61. Способ лечения диабета типа 1, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтического соединения по любому из п.п. 1–55 для лечения диабета типа 1.

62. Способ лечения индивидуума с трансплантатом, включающий введение индивидууму терапевтически эффективного количества терапевтического соединения по любому из п.п. 1–55 для лечения индивидуума с трансплантатом (реципиента).

63. Способ лечения БТПХ у индивидуума, которому была трансплантирована донорская ткань, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества терапевтического соединения по любому из п.п. 1–55.

64. Способ лечения индивидуума, страдающего аутоиммунным расстройством, или индивидуума с риском или с повышенным риском развития аутоиммунного расстройства, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества терапевтического соединения по любому из п.п. 1–55 для лечения указанного индивидуума.

65. Способ по любому из п.п. 56–64, где индивидуум страдает аутоиммунным расстройством, и где терапевтическое соединение не содержит аутоантигенного пептида или полипептида, характерного для аутоиммунного расстройства, например, не содержит пептида или полипептида, против которого вырабатываются аутоантитела у индивидуума.

66. Нуклеиновая кислота, кодирующая терапевтическое соединение по любому из п.п. 1–55.

67. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 65.

68. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 66 или вектор по п. 67.

68. Способ получения терапевтического соединения, включающий культивирование клетки по п. 67, с получением терапевтического соединения.

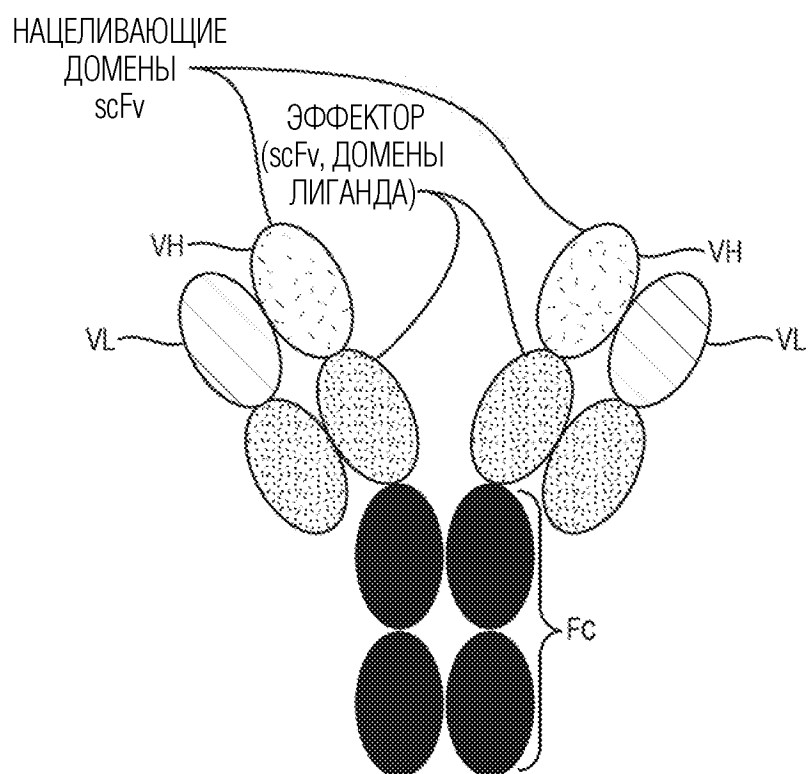
69. Способ получения последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей терапевтическое соединение по п.п. 1–55, где указанный способ включает:

а) получение вектора, содержащего последовательность, кодирующую нацеливающую молекулу, и встраивание в вектор последовательности, кодирующей молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, с получением последовательности, кодирующей терапевтическое соединение; или

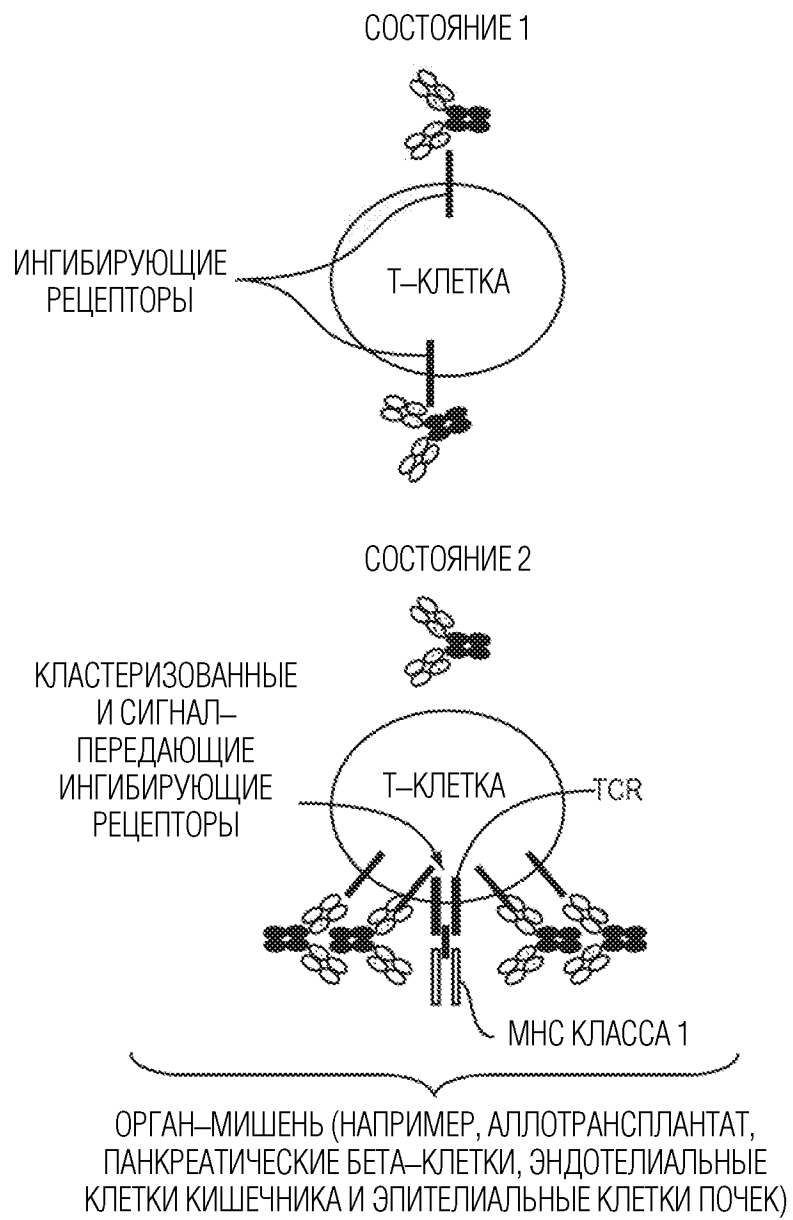
б) получение вектора, содержащего последовательность, кодирующую молекулу, связывающуюся с эффектором/модулирующую эффектор, и встраивание в вектор последовательности, кодирующей нацеливающую молекулу, с получением последовательности, кодирующей терапевтическое соединение;

и тем самым, получение последовательности, кодирующей терапевтическое соединение.

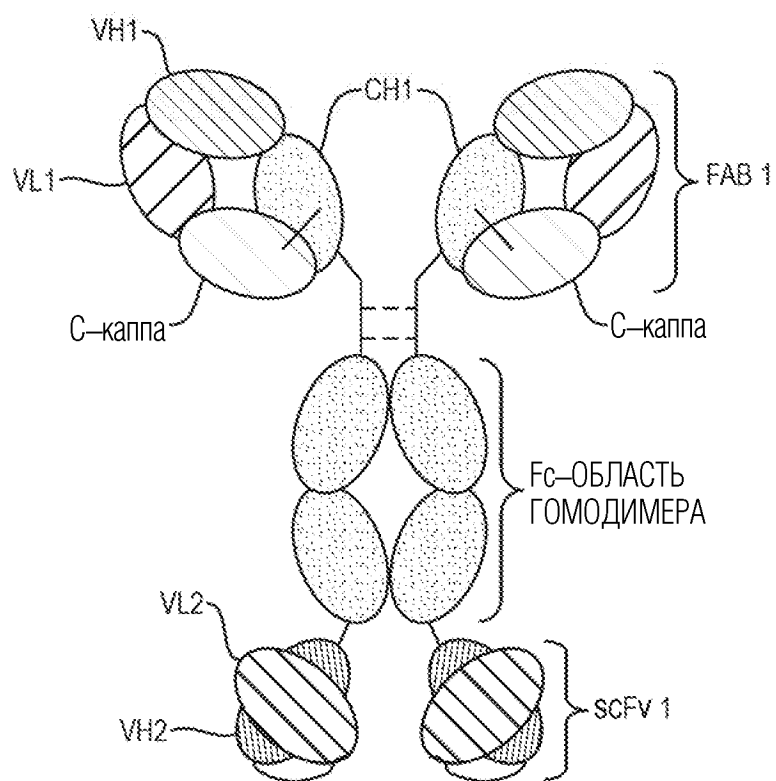
По доверенности



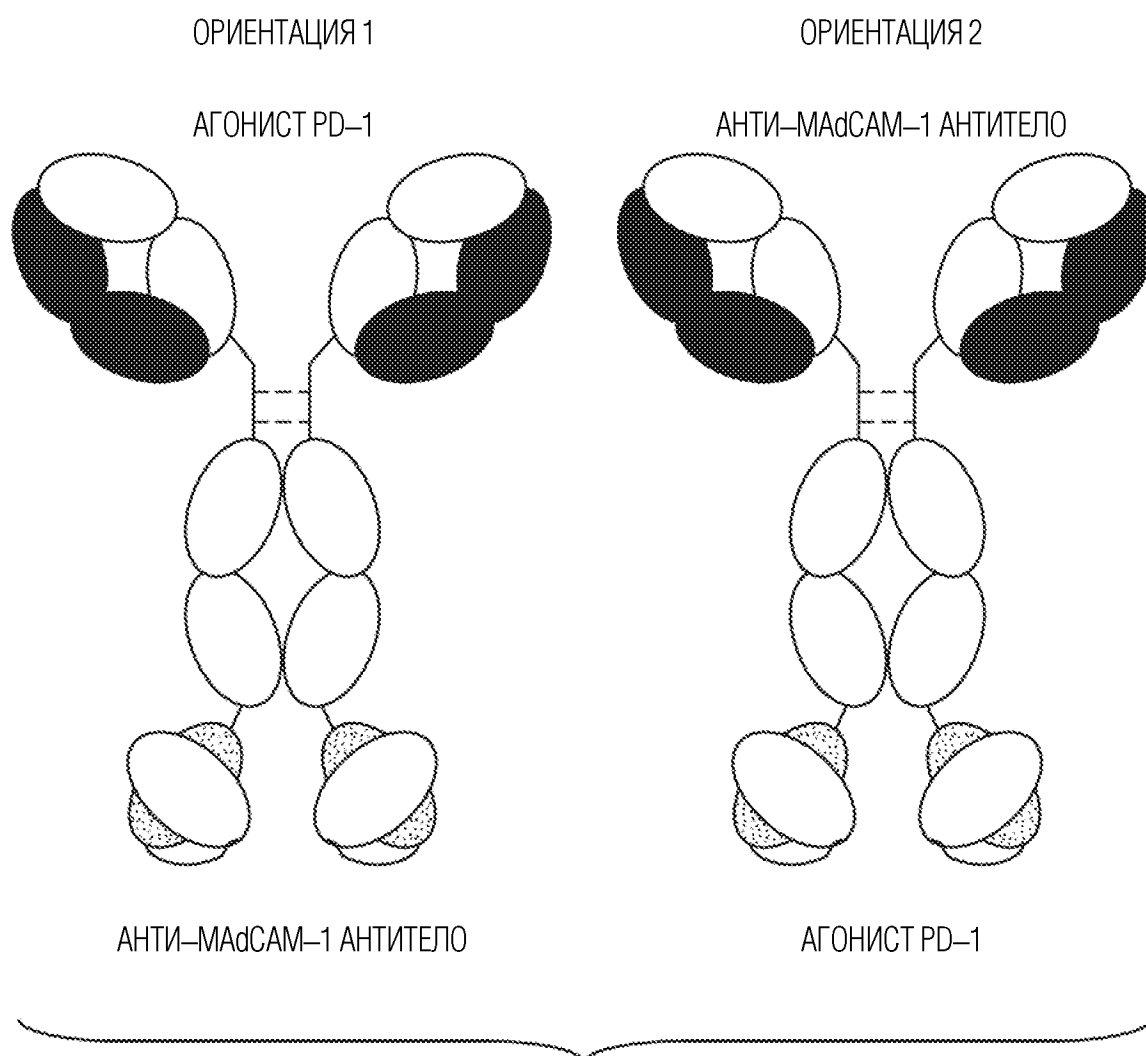
ФИГ. 1



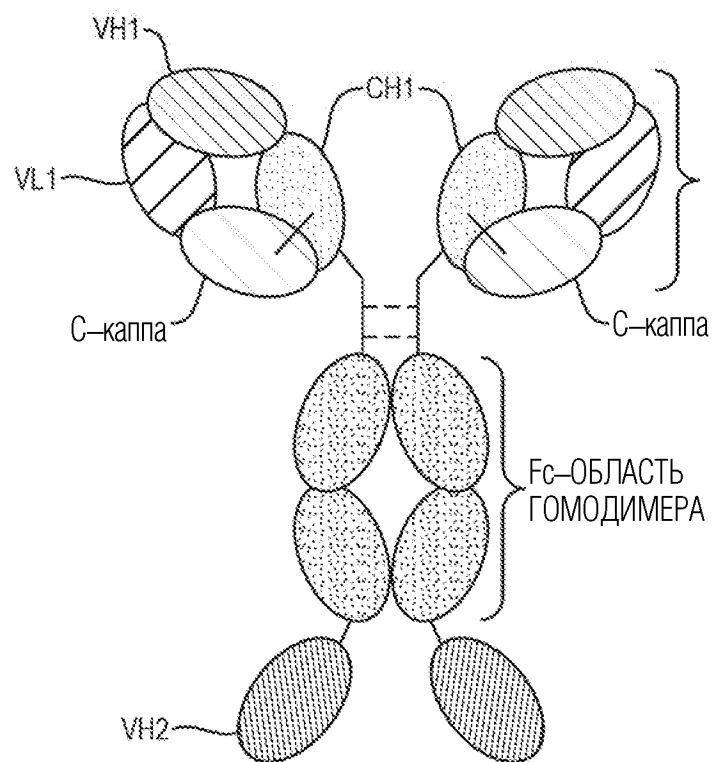
ФИГ. 2



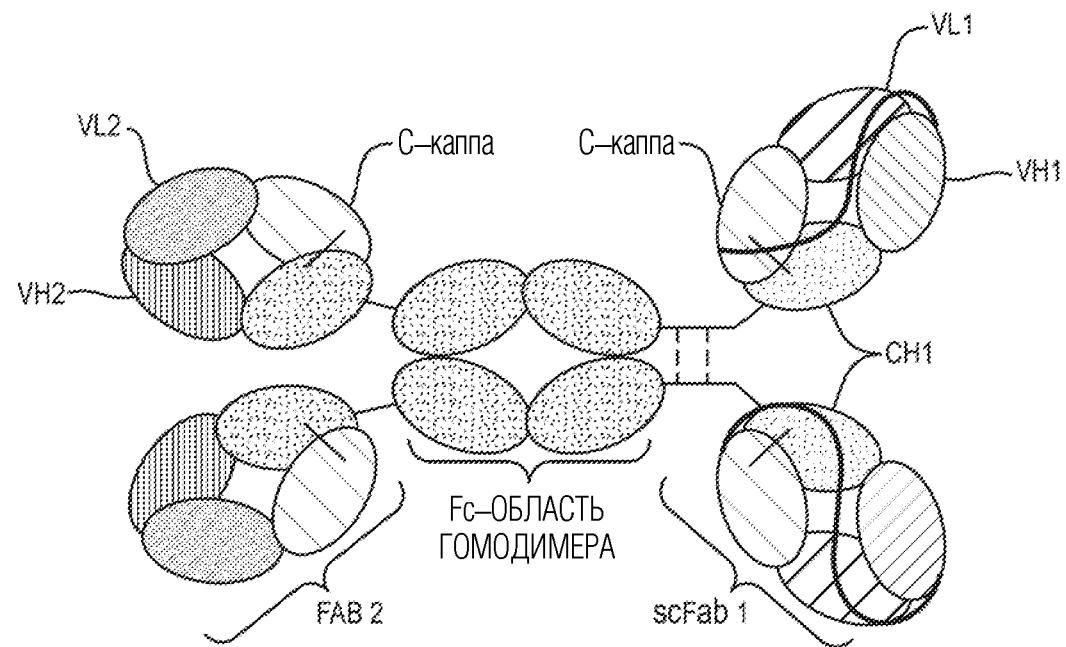
ФИГ. 3



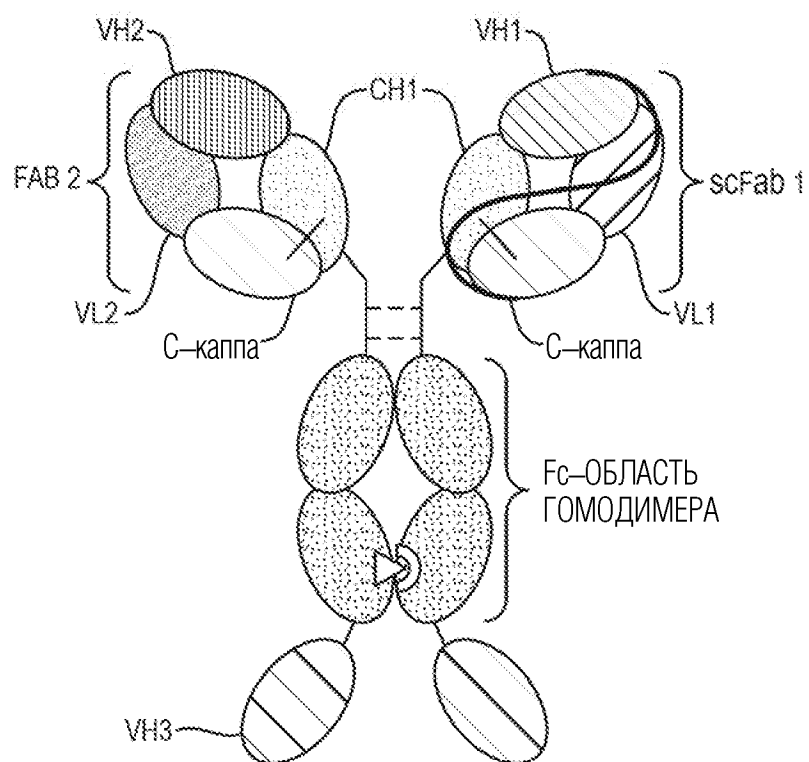
ФИГ. 3А



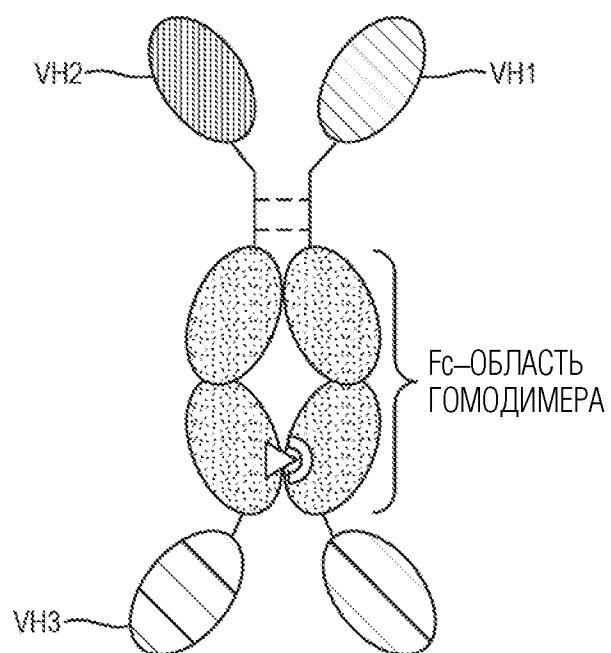
ФИГ. 4



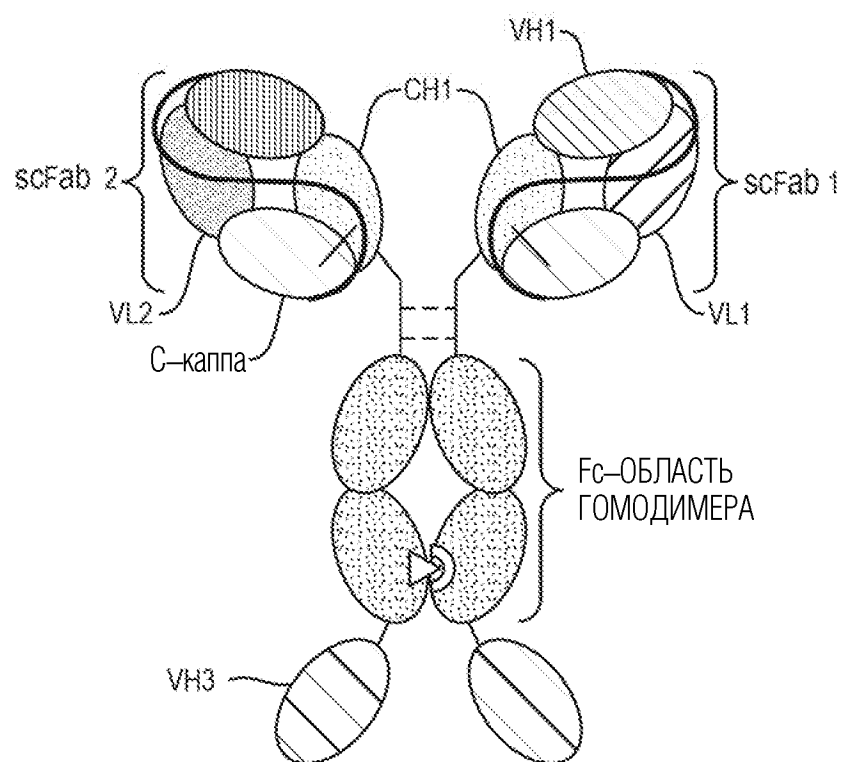
ФИГ. 5



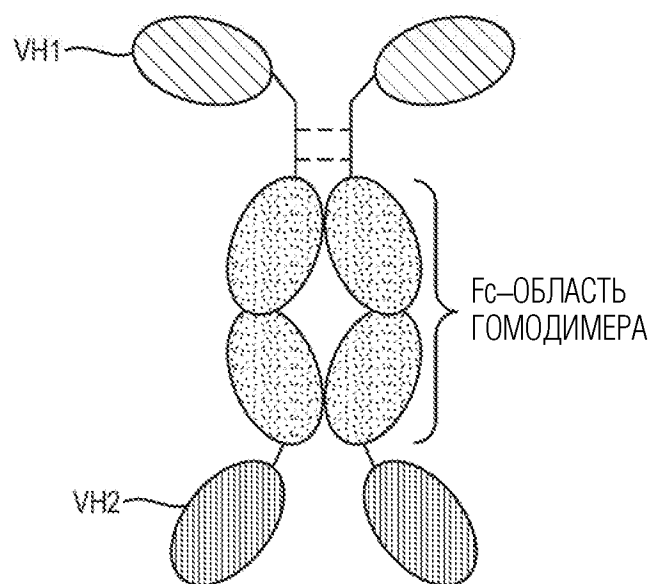
ФИГ. 6



ФИГ. 7



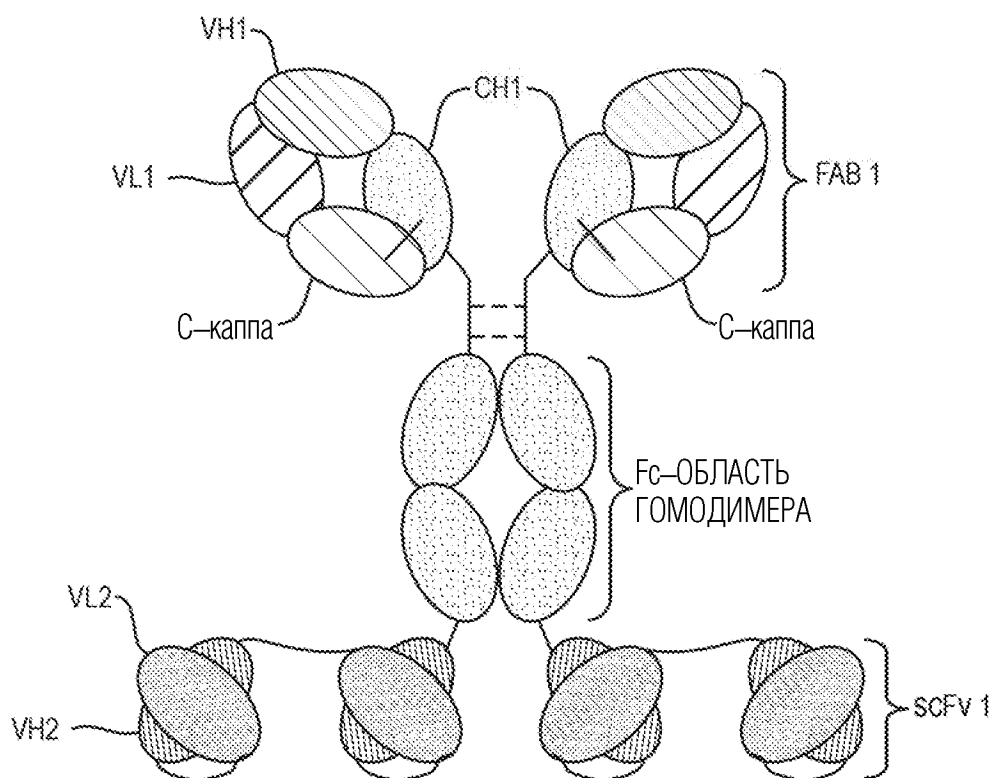
ФИГ. 8



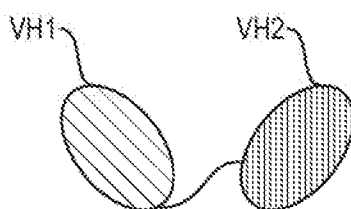
ФИГ. 9



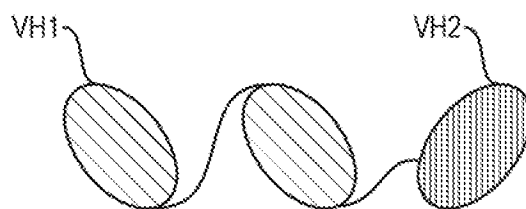
ФИГ. 10



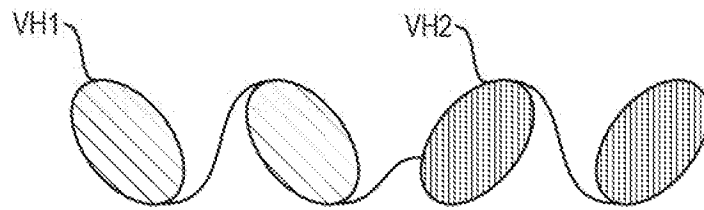
ФИГ. 11



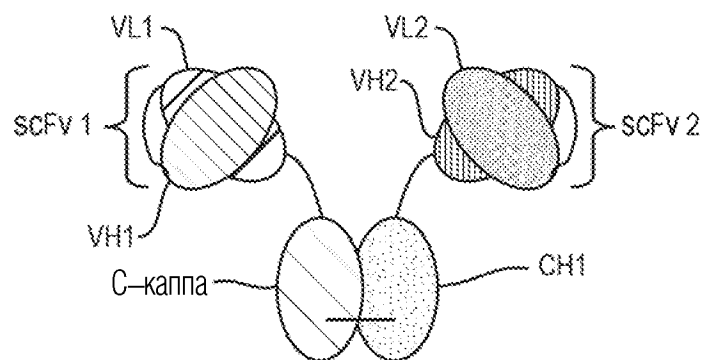
ФИГ. 12



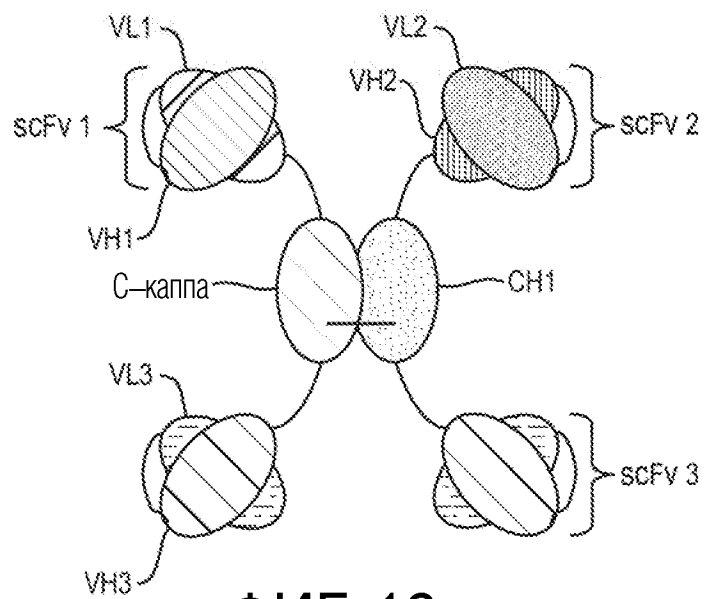
ФИГ. 13



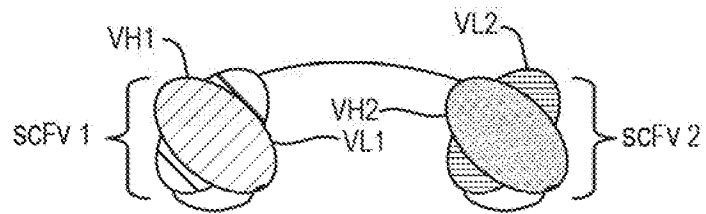
ФИГ. 14



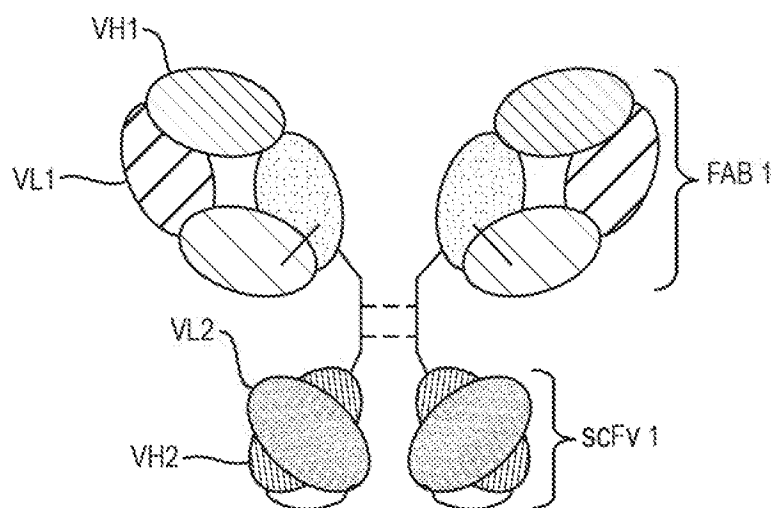
ФИГ. 15



ФИГ. 16

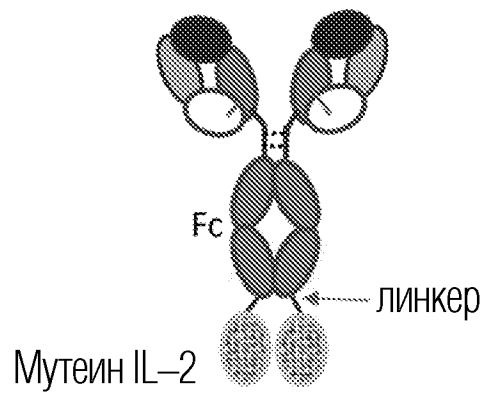


ФИГ. 17

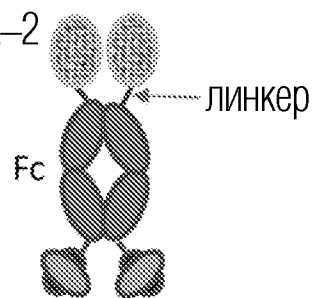


ФИГ. 18

Нацеливающий домен
например, анти-MAdCAM IgG



Мутеин IL-2



Нацеливающий домен scFv
(например, анти-MAdCAM scFv)

Мутеин IL-2



ФИГ. 19