

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043373**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.22

(21) Номер заявки
201891178

(22) Дата подачи заявки
2016.12.12

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) БИСПЕЦИФИЧНЫЕ МОЛЕКУЛЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ ИММУНОРЕАКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ PD-1 И CTLA-4, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/266,944**

(32) **2015.12.14**

(33) **US**

(43) **2019.01.31**

(86) **PCT/US2016/066060**

(87) **WO 2017/106061 2017.06.22**

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

(72) Изобретатель:
**Джонсон Лесли С., Чичили Гурунад
Редди, Шах Калпана, Ла Мотте-Мос
Росс, Мур Пол А., Бонвини Эцио,
Кёниг Скотт (US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **WO-A1-2014209804**

WO-A1-2014164427

WO-A1-2013173223

**OTT et al. "CTLA-4 and PD-1/PD-L1
blockade: new immunotherapeutic modalities with
durable clinical benefit in melanoma patients,"
Clinical Cancer Research, 01 October 2013
(01.10.2013), Vol. 19, No. 19, Pgs. 5300-5309, entire
document**

CN-A-104974253

(57) Изобретение относится к биспецифичным молекулам (например, диателам, биспецифичным антителам, тривалентным связывающим молекулам и т.д.), которые содержат по меньшей мере один сайт связывания, обладающий иммуноспецифичностью в отношении эпитопа PD-1, и по меньшей мере один сайт связывания, обладающий иммуноспецифичностью в отношении эпитопа CTLA-4 (т.е. "биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы"). Биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно изобретению способны одновременно связываться с PD-1 и CTLA-4, в частности, когда указанные молекулы расположены на поверхности клеток человека. Изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат такие биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы, и способам, включающим применение таких биспецифичных молекул для лечения рака и других заболеваний и состояний. Изобретение также относится к способам, включающим применение таких биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул для стимуляции иммунного ответа.

B1**043373****043373****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка является частичным продолжением и испрашивает приоритет согласно заявке на патент США с серийным номером № 62/266 944 (подана 14 декабря 2015, на рассмотрении), которая полностью включена в настоящую заявку.

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка включает один или более перечней последовательностей в соответствии со Сводом федеральных нормативных актов США (C.F.R., 37, 1.821 и далее), которые представлены на машиночитаемых носителях (название файла: 1301_0134PCT_ST25.txt, создан 4 декабря 2016, размер - 186,040 байтов); указанный файл полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к биспецифичным молекулам (например, диателам, биспецифичным антителам, тривалентным связывающим молекулам и т.д.), которые содержат по меньшей мере один сайт связывания эпитопа, обладающий иммунноспецифичностью в отношении эпитопа PD-1, и по меньшей мере один сайт связывания эпитопа, обладающий иммунноспецифичностью в отношении эпитопа CTLA-4 (т.е. "молекулам, биспецифичным в отношении PD-1 x CTLA-4"). Настоящее изобретение относится к таким молекулам, биспецифичным в отношении PD-1 x CTLA-4, содержащим два сайта связывания эпитопа, обладающих иммунноспецифичностью в отношении одного (или двух) эпитопа (эпитопов) PD-1, и два сайта связывания эпитопа, обладающих иммунноспецифичностью в отношении одного (или двух) эпитопа (эпитопов) CTLA-4. Настоящее изобретение также относится к таким молекулам, биспецифичным в отношении PD-1 x CTLA-4, которые дополнительно содержат Fc-фрагмент иммуноглобулина. Биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению способны одновременно связываться с PD-1 и CTLA-4, в частности, когда указанные молекулы расположены на поверхности клеток человека. Изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат указанные биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы, и способам, включающим применение указанных биспецифичных молекул в лечении рака и других заболеваний и состояний. Настоящее изобретение также относится к способам, включающим применение таких биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул для стимуляции иммунного ответа.

Уровень техники

I. Ответ иммунной системы на рак.

Иммунная система млекопитающих обладает природной способностью распознавать и уничтожать раковые клетки (Topalian, S.L. et al. (2015) "Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy" Cancer Cell 27:450-461). Иммунная система здоровых субъектов находится в состоянии покоя, и ее активность подавляется совокупностью различных ингибирующих рецепторов и лигандов. Такие пути "контрольных точек" регуляции иммунного ответа важны в поддержании аутоотолерантности (т.е. предотвращении атаки иммунной системы субъекта против его/ее собственных клеток - "аутоиммунной" реакции) и ограничении сопутствующего повреждения ткани во время противомикробных или противоаллергических иммунных ответов. После распознавания ракового антигена, выявления микробного патогена или присутствия аллергена ряд активирующих рецепторов и лигандов вызывает активацию иммунной системы. Такая активация приводит к активации макрофагов, клеток-естественных киллеров (NK-клеток) и антиген-специфичных цитотоксических Т-клеток и стимулирует высвобождение различных цитокинов, действие которых направлено на борьбу с обнаруженной угрозой здоровью субъекта (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules", Immunolog. Res. 28(1):39-48; Viglietta, V. et al. (2007) "Modulating Co-Stimulation" Neurotherapeutics 4:666-675; Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy" Adv. Immunol. 90:297-339). Иммунная система способна возвращаться в свое нормальное состояние покоя, когда компенсаторные ингибирующие иммунные сигналы преобладают над активирующими иммунными сигналами.

Таким образом, можно считать, что патологическое состояние при раковом заболевании (и, фактически, патологическое состояние при инфекционных заболеваниях) отражает неспособность к адекватной активации иммунной системы субъекта. Такая неспособность может отражать неадекватную презентацию активирующих иммунных сигналов или неадекватную способность ослаблять ингибирующие иммунные сигналы у субъекта. На основе некоторых примеров исследователи определили, что раковые клетки могут иммунную систему, чтобы ускользнуть от обнаружения иммунной системой (Topalian, S.L. et al. (2015) "Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy" Cancer Cell 27:450-461).

Особое значение имеет связывание между лигандами B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86), которые экспрессируются на поверхности антиген-презентирующей клетки, и рецепторами CD28 и CTLA-4 CD4⁺ Т-лимфоцита (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily" Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules" Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation" Immunol. Rev. 229:307-321). Связывание B7-1 или B7-2 с CD28 стимулирует активацию Т-клеток; связывание B7-1 или B7-2 с CTLA-4 ингибирует активацию Т-клеток (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules" Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibit-

ing CD28-Mediated Costimulation" *Immunol. Rev.* 229:307-321; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited", *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548). CD28 конститутивно экспрессируется на поверхности Т-клеток (Gross, J., et al. (1992) "Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse" *J. Immunol.* 149:380-388), а экспрессия CTLA-4 быстро повышается после активации Т-клеток (Linsley, P. et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement" *Immunity* 4:535-543). Поскольку рецептор CTLA-4 обладает более высокой аффинностью (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily" *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Topalian, S.L. et al. (2015) "Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy" *Cancer Cell* 27:450-461), связывание лигандов сначала приводит к пролиферации Т-клеток (через CD28), а затем ее ингибированию (в результате начала экспрессии CTLA-4), вызывая, таким образом, подавление эффекта, когда пролиферация больше не требуется.

II. CTLA-4.

Цитотоксический связанный с Т-лимфоцитами белок-4 (CTLA-4; CD152) представляет собой мембранный белок I типа с одним трансмембранным доменом, образующий дисульфидной связью гомодимер (Schwartz J.C., et al. (2001) "Structural Basis For Co-Stimulation By The Human CTLA-4/B7-2 Complex" *Nature* 410:604-608). Были охарактеризованы варианты альтернативного сплайсинга, кодирующие различные изоформы, включая растворимую изоформу, которая функционирует как мономер (Magistrelli G., et al. (1999) "A Soluble Form Of CTLA-4 Generated By Alternative Splicing Is Expressed By Nonstimulated Human T Cells" *Eur. J. Immunol.* 29:3596-3602; Oaks M.K. et al. (2000) "A Native Soluble Form Of CTLA-4", *Cell Immunol* 201:144-153).

CTLA-4 в первую очередь является внутриклеточным антигеном, экспрессия которого на поверхности клетки строго регулируется ограниченной миграцией к клеточной поверхности и быстрой интернализацией (Alegre M-L, et al., (1996) "Regulation Of Surface And Intracellular Expression Of CTLA4 On Mouse T Cells" *J. Immunol.* 157:4762-4770; Linsley, P.S. et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA-4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement" *Immunity* 4:535-543). CTLA-4 экспрессируется на низких уровнях на поверхности наивных эффекторных Т-клеток (Alegre, M.L., et al. (1996) "Regulation Of Surface And Intracellular Expression Of CTLA4 On Mouse T Cells" *J Immunol* 157:4762-70) и конститутивно экспрессируется на регуляторных Т-клетках (Wang, X.B., et al. (2002) "Expression Of CTLA-4 By Human Monocytes" *Scand. J. Immunol.* 55:53-60).

Внеклеточная область CTLA-4 содержит единственный внеклеточный домен Ig(V), за которым следует трансмембранный участок (ТМ) и небольшой внутриклеточный цитоплазматический хвост (37 аминокислот). Внутриклеточный хвост содержит два тирозиновых мотива, которые взаимодействуют с несколькими внутриклеточными белками, включая липидкиназу фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K), фосфатазы SHP-2 и PP2A и клатриновые адапторные белки AP-1 и AP-2 (Rudd, C.E. et al. (2003) "Unifying Concepts In CD28, ICOS And CTLA4 Co-Receptor Signalling", *Nat Rev Immunol.* 3:544-56). CTLA-4 близок к CD28, при этом идентичность двух указанных белков на аминокислотном уровне составляет примерно 29% (Harper, K. (1991) "CTLA-4 And CD28 Activated Lymphocyte Molecules Are Closely Related In Mouse And Human As To Sequence, Message Expression, Gene Structure, And Chromosomal Location" *J. Immunol.* 147:1037-1044).

При активации наивной эффекторной Т-клетки через ее Т-клеточные рецепторы (TCR) CTLA-4 привлекается к клеточной поверхности (Linsley, P.S., et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA-4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement" *Immunity* 4:535-43). С момента начала экспрессии CTLA-4 на поверхности Т-клеток он конкурирует с CD28 (конститутивно экспрессируемым на Т-клетках) за связывание с CD80/CD86, выключая, таким образом, дальнейший сигнальный путь, опосредуемый TCR и, таким образом, подавляя любое дальнейшее развитие Т-клеточного ответа по TCR-сигнальному пути (Carreno, B.M., et al. (2000) "CTLA-4 (CD152) Can Inhibit T Cell Activation By Two Different Mechanisms Depending On Its Level Of Cell Surface Expression", *J Immunol* 165:1352-6; Chuang, E., et al. (1999) "Regulation Of Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Molecule-4 By Src Kinases", *J Immunol* 162:1270-7). Таким образом, CTLA-4 действует в качестве отрицательного регулятора активации эффекторных Т-клеток, который снижает эффекторную функцию и определяет эффективность и продолжительность Т-клеточного ответа (Linsley, P.S., et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA-4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement" *Immunity* 4:535-43).

Кроме того, CTLA-4 может играть роль в усилении негативного влияния регуляторных Т-клеток в иммунном ответе на рак (Tai, Y.T., et al., (2012) "Potent in vitro And in vivo Activity Of An Fc-Engineered Humanized Anti-HM1.24 Antibody Against Multiple Myeloma via Augmented Effector Function", *Blood* 119:2074-82). CTLA-4 обладает намного более высокой аффинностью в отношении белков семейства B7 по сравнению с CD28 и, таким образом, его экспрессия на Т-клетке определяет преобладание отрицательной регуляции указанной Т-клетки (Allison, J.P., et al. (1995) "Manipulation Of Costimulatory Signals To Enhance Antitumor T-Cell Responses", *Curr Opin Immunol* 7:682-6). Механизм участия CTLA-4 в супрессорной функции регуляторных Т-клеток не до конца выяснен, но экспрессия CTLA не регуляторных Т-клетках усиливает супрессорную функцию этих клеток (Tai, Y.T., et al., (2012) "Potent in vitro And in vivo Activity Of An Fc-Engineered Humanized Anti-HM1.24 Antibody Against Multiple Myeloma via Aug-

mented Effector Function"; Blood 119:2074-82).

Сообщается, что блокирование CTLA-4 усиливает Т-клеточные ответы *in vitro* (Walunas, T.L., et al. (1994) "CTLA-4 Can Function As A Negative Regulator Of T Cell Activation", Immunity 1:405-413) и *in vivo* (Kearney, E.R., et al. (1995) "Antigen-Dependent Clonal Expansion Of A Trace Population Of Antigen-Specific CD4+ T Cells *in vivo* Is Dependent On CD28 Costimulation And Inhibited By CTLA-4", J. Immunol. 155:1032-1036).

В связи с этим было сделано предположение, что блокирование CTLA-4 с помощью антител против CTLA-4 сможет обеспечить новые способы лечения заболеваний, в частности, заболеваний человека, при которых стимуляция иммунной системы должна оказывать благоприятный эффект, например, для лечения раковых и инфекционных заболеваний (см. Leach, D.R. et al. (1996) "Enhancement Of Antitumor Immunity By CTLA-4 Blockade" Science 271:1734-1736 и международные публикации согласно PCT № WO 01/14424; WO 00/37504). Разработка блокаторов функции CTLA-4 была сосредоточена на применении моноклональных антител, таких как ипилимумаб (см. например, Hodi, F.S., et al., (2003) "Biologic Activity Of Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Antibody Blockade In Previously Vaccinated Metastatic Melanoma And Ovarian Carcinoma Patients" Proc. Natl. Acad. Sci. (США) 100:4717-4717) и тремелиумаб (Ribas, A. et al. (2005) "Antitumor Activity In Melanoma And Anti-Self Responses In A Phase I Trial With The Anti-Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Monoclonal Antibody CP-675,206" Oncologist 12: 873-883).

III. Рецептор программированной гибели 1 ("PD-1").

Рецептор программированной гибели 1 ("PD-1", также известный как "CD279"), является мембранным белком I типа из обширного семейства CD28/CTLA-4 Т-клеточных регуляторов, которые осуществляют отрицательную регуляцию широкого спектра иммунных ответов (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death", EMBO J. 11:3887-3895; публикации заявки на патент США № 2007/0202100; 2008/0311117; 2009/00110667; патенты США № 6 808 710; 7 101 550; 7 488 802; 7 635 757; 7 722 868; международная публикация согласно PCT № WO 01/14557).

Взаимодействия рецептор-лиганд системы PD-1, по-видимому, являются еще более сложными, чем взаимодействия системы CD28/CTLA-4. PD-1 экспрессируется на клеточной поверхности активированных Т-клеток, В-клеток и моноцитов (Agata, Y. et al. (1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes" Int. Immunol. 8(5):765-772; Yamazaki, T. et al. (2002) "Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells And APC" J. Immunol. 169:5538-5545), а также экспрессируется на низком уровне в Т-клетках-естественных киллерах (NK-клетках) (Nishimura, H. et al. (2000) "Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice", J. Exp. Med. 191:891-898; Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity" Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298).

Внеклеточный участок PD-1 состоит из единственного иммуноглобулинового домена (IgV), идентичного на 23% эквивалентному домену CTLA-4 (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity" Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298). За внеклеточным доменом IgV следует трансмембранный домен и внутриклеточный хвост. Внутриклеточный хвост содержит два сайта фосфорилирования, расположенных в иммунорецепторном ингибирующем мотиве на основе тирозина и иммунорецепторном переключающем мотиве на основе тирозина, что дает основания полагать, что PD-1 отрицательно регулирует TCR-сигналы (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death" EMBO J. 11:3887-3895; Blank, C. et al. (2006) "Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer", Immunol. Immunother. 56(5):739-745).

PD-1 осуществляет ингибирование иммунной системы путем связывания с B7-H1 и B7-DC (также известными как PD-L1 и PD-L2, Flies, D.B. et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity", J. Immunother. 30(3):251-260; патенты США № 6 803 192; 7 794 710; публикации заявок на патенты США № 2005/0059051; 2009/0055944; 2009/0274666; 2009/0313687; международные публикации PCT № WO 01/39722; WO 02/086083).

B7-H1 и B7-DC широко экспрессируются на поверхности многих типов тканей человека и мыши, таких как сердце, плацента, мышцы, эмбриональная печень, селезенка, лимфатические узлы и тимус, а также печень, легкие и почки, в островковых клетках поджелудочной железы и тонком кишечнике мыши (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity", Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298). У людей экспрессия белка B7-H1 была обнаружена в эндотелиальных клетках (Chen, Y. et al. (2005) "Expression of B7-H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells" Nephron. Exp. Nephrol. 102:e81-e92; de Haij, S. et al. (2005) "Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell Responses Via ICOS-L And B7-H1" Kidney Int. 68:2091-2102; Mazanet, M.M. et al. (2002) "B7-H1 Is Expressed By Human Endothelial Cells And Suppresses T-Cell Cytokine Synthesis" J. Immunol. 169:3581-3588), миокарде (Brown, J.A. et al. (2003) "Blockade Of Programmed Death-1 Ligands On Dendritic Cells Enhances T-Cell Activation And Cytokine Production" J. Immunol. 170:1257-1266), синцитиальном слое трофобласта (Petroff, M.G. et al. (2002) "B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface" Placenta 23:S95-S101).

Эти молекулы также экспрессируются резидентными макрофагами некоторых тканей, макрофагами, активированными интерфероном (IFN)- γ или фактором некроза опухоли (ФНО)- α (Latchman, Y. et al. (2001) "PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation", *Nat. Immunol.* 2:261-268), и в опухолях (Dong, H. (2003) "B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity" *J. Mol. Med.* 81:281-287).

Было обнаружено, что взаимодействие между B7-H1 и PD-1 приводит к передаче критичного ко-стимулирующего отрицательного сигнала на Т- и В-клетки (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity" *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298) и действует как индуктор клеточной гибели (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death", *EMBO J.* 11:3887-3895; Subudhi, S.K. et al. (2005) "The Balance Of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition", *J. Molec. Med.* 83:193-202). Более конкретно, было обнаружено, что взаимодействие между рецептором PD-1 и лигандом B7-H1 в низких концентрациях приводит к передаче ингибирующего сигнала, который сильно подавляет пролиферацию антиген-специфичных CD8⁺ Т-клеток; при более высокой концентрации взаимодействие с PD-1 не ингибирует пролиферацию Т-клеток, но значительно снижает продукцию множества цитокинов (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily" *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126). Было обнаружено, что пролиферация и продукция цитокинов как в покоящихся, так и ранее активированных CD4 и CD8 Т-клетках, и даже в нативных Т-клетках из пуповинной крови подавляется растворимыми гибридными белками B7-H1-Fc (Freeman, G. J. et al. (2000) "Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation" *J. Exp. Med.* 192:1-9; Latchman, Y. et al. (2001) "PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation", *Nature Immunol.* 2:261-268; Carter, L. et al. (2002) "PD-LPD-L Inhibitory Pathway Affects Both CD4(+) and CD8(+) T-cells And Is Overcome By IL-2", *Eur. J. Immunol.* 32(3):634-643; Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126).

Участие B7-H1 и PD-1 в подавлении активации и пролиферации Т-клеток указывает на то, что указанные биомолекулы могут служить в качестве терапевтических мишеней для лечения воспаления и рака. В связи с этим было предложено применение антитела против PD-1 для лечения инфекций и опухолей и для положительной регуляции приобретенного иммунного ответа (см. публикации заявок на патенты США № 2010/0040614; 2010/0028330; 2004/0241745; 2008/0311117; 2009/0217401; патенты США № 7 521 051; 7 563 869; 7 595 048; международные публикации PCT № WO 2004/056875; WO 2008/083174). Были описаны антитела, способные специфично связываться с PD-1 (Agata, T. et al. (1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes" *Int. Immunol.* 8(5):765-772; and Berger, R. et al. (2008) "Phase I Safety And Pharmacokinetic Study Of CT-011, A Humanized Antibody Interacting With PD-1, In Patients With Advanced Hematologic Malignancies" *Clin. Cancer Res.* 14(10):3044-3051; см. также патенты США № 8 008 449 и 8 552 154; публикации патентов США № 2007/0166281; 2012/0114648; 2012/0114649; 2013/0017199; 2013/0230514 и 2014/0044738 и международные патентные публикации согласно PCT № WO 2003/099196; WO 2004/004771; WO 2004/056875; WO 2004/072286; WO 2006/121168; WO 2007/005874; WO 2008/083174; WO 2009/014708; WO 2009/073533; WO 2012/135408, WO 2012/145549 и WO 2013/014668).

Однако несмотря на все такие достижения уровня техники, остается необходимость в улучшенных композициях, способных более активно направлять иммунную систему организма против раковых клеток или инфицированных патогеном клеток, в частности, при более низкой терапевтической концентрации и/или со сниженными побочными эффектами. Несмотря на то, что приобретенный иммунитет может являться мощным механизмом защиты против рака и заболевания, его действию часто препятствуют механизмы иммуносупрессии/ускользания от иммунного ответа в микроокружении опухоли, такие как экспрессия PD-1 и CTLA-4. Более того, ко-ингибирующие молекулы, экспрессируемые опухолевыми клетками, иммунными клетками и стромальными клетками в опухолевом окружении могут существенно ослаблять Т-клеточные ответы против раковых клеток. Кроме того, применение антител против CTLA-4 вызывает хорошо известные побочные эффекты, называемые "иммунноопосредованными нежелательными явлениями" (иНЯ). Иммуноопосредованные нежелательные явления (иНЯ) включают колит/диарею, дерматит, гепатит, эндокринопатии и воспалительную миопатию. Было описано, что эти отдельные побочные эффекты возникают из-за нарушения иммунологической толерантности при блокировании CTLA-4 (Di Giacomo, A.M., et al. (2010) "The Emerging Toxicity Profiles Of Anti-CTLA-4 Antibodies Across Clinical Indications" *Semin Oncol.* 37:499-507). Таким образом, способы терапевтического лечения, позволяющие избежать указанных ограничений, имели бы огромное преимущество.

Как подробно описано ниже, настоящее изобретение решает описанную задачу путем обеспечения биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул. Такие биспецифичные молекулы способны связываться с молекулами PD-1 и CTLA-4, которые присутствуют на поверхности истощенных и толерантных инфильтрирующих опухоли лимфоцитов и других типов клеток, и, таким образом, нарушать способность таких молекул клеточной поверхности отвечать на соответствующие лиганды. Таким образом, биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению действуют, блокируя опосредуемое PD-1- и CTLA-4 подавление иммунной системы для обеспечения активации или

продолжения активации иммунной системы. Указанные свойства дают возможность применения таких биспецифичных молекул в стимуляции иммунной системы и, в частности, в лечении рака и связанных с патогеном заболеваний и состояний. Настоящее изобретение направлено на достижение указанных и других целей.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение направлено на биспецифичные молекулы (например, диатела, биспецифичные антитела, тривалентные связывающие молекулы и т.д.), содержащие по меньшей мере один сайт связывания, обладающий иммуноспецифичностью в отношении эпитопа PD-1, и по меньшей мере один сайт связывания, обладающий иммуноспецифичностью в отношении эпитопа CTLA-4 (т.е. "биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы"). Настоящее изобретение относится к таким молекулам, биспецифичным в отношении PD-1 x CTLA-4, которые содержат два сайта связывания эпитопа, обладающих иммуноспецифичностью в отношении одного (или двух) эпитопа (эпитопов) PD-1, и два сайта связывания эпитопа, обладающих иммуноспецифичностью в отношении одного (или двух) эпитопа (эпитопов) CTLA-4. Настоящее изобретение также направлено на такие биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы, которые дополнительно содержат Fc-фрагмент иммуноглобулина. Биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению способны одновременно связываться с PD-1 и CTLA-4, в частности, в том виде, в котором указанные молекулы распределены на поверхности клеток человека. Изобретение направлено на фармацевтические композиции, которые содержат такие биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы, и способы, включающие применение таких биспецифичных молекул для лечения рака и других заболеваний и состояний. Настоящее изобретение также относится к способам, включающим применение таких биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул для стимуляции иммунного ответа.

Более подробно, изобретение обеспечивает биспецифичную молекулу, содержащую один или более сайтов связывания эпитопа, способных иммуноспецифично связываться с эпитопом (эпитопами) PD-1, и один или более сайтов связывания эпитопа, способных иммуноспецифично связываться с эпитопом (эпитопами) CTLA-4, где указанная молекула содержит:

(А) переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи антитела, которое связывается с PD-1; и

(В) переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи антитела, которое связывается с CTLA-4;

где указанная биспецифичная связывающая молекула представляет собой:

(i) диатело, где указанное диатело представляет собой ковалентно связанный комплекс, который содержит две, три, четыре или пять полипептидных цепей; или

(ii) тривалентную связывающую молекулу, где указанная тривалентная связывающая молекула представляет собой ковалентно связанный комплекс, который содержит три, четыре, пять или более полипептидных цепей.

Изобретение относится к варианту реализации таких биспецифичных молекул, где указанная биспецифичная связывающая молекула проявляет активность, превышающую активность двух моноспецифичных молекул, одна из которых содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи антитела, которое связывается с PD-1, и другая из которых содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи антитела, которое связывается с CTLA-4.

Изобретение относится к варианту реализации всех таких биспецифичных молекул, где указанная молекула вызывает меньше иммуноопосредованных нежелательных явлений (иНЯ) при введении субъекту, нуждающемуся в указанном введении, по сравнению с иНЯ, вызываемыми введением моноспецифичного антитела, которое связывается с CTLA-4, такого как ипилимумаб.

Изобретение дополнительно относится к варианту реализации таких биспецифичных молекул, где указанная молекула содержит Fc-фрагмент. Изобретение дополнительно относится к варианту реализации таких биспецифичных молекул, где указанный Fc-фрагмент представляет собой вариант Fc-фрагмента, который содержит:

(А) одну или более модификаций аминокислот, которые снижают аффинность указанного варианта Fc-фрагмента в отношении FcγR, и/или

(В) одну или более модификаций аминокислот, которые увеличивают время полужизни в сыворотке крови указанного варианта Fc-фрагмента.

Изобретение дополнительно относится к варианту реализации таких биспецифичных молекул, где модификации, приводящие к снижению аффинности указанного варианта Fc-фрагмента в отношении FcγR, включают замену L234A; L235A или L234A и L235A, где нумерация соответствует индексу ЕС по Кэбату.

Изобретение дополнительно относится к варианту реализации таких биспецифичных молекул, где модификации, приводящие к увеличению времени полужизни варианта Fc-фрагмента в сыворотке крови, включают замену M252Y; M252Y и S254T; M252Y и T256E; M252Y, S254T и T256E или K288D и N435K, где нумерация соответствует индексу ЕС по Кэбату (Kabat).

Изобретение дополнительно относится к варианту реализации всех таких биспецифичных молекул, где указанная молекула представляет собой диатело и содержит два сайта связывания эпитопа, способные иммунноспецифично связываться с эпитопом PD-1, и два сайта связывания эпитопа, способные иммунноспецифично связываться с эпитопом CTLA-4.

Изобретение дополнительно относится к варианту реализации всех таких биспецифичных молекул, где указанная молекула представляет собой тривалентную связывающую молекулу и содержит два сайта связывания эпитопа, способных иммунноспецифично связываться с эпитопом PD-1, и один сайт связывания эпитопа, способный иммунноспецифично связываться с эпитопом CTLA-4.

Изобретение дополнительно относится к варианту реализации всех таких биспецифичных молекул, где указанная молекула способна связываться с молекулами PD-1 и CTLA-4, присутствующими на клеточной поверхности.

Изобретение дополнительно относится к варианту реализации всех таких биспецифичных молекул, где указанная молекула способна одновременно связываться с PD-1 и CTLA-4.

Изобретение дополнительно относится к варианту реализации всех таких биспецифичных молекул, где указанная молекула способна стимулировать клетки иммунной системы, в частности, где указанная стимуляция приводит к:

- (A) пролиферации иммунных клеток, и/или
- (B) продукции и/или высвобождению иммунными клетками по меньшей мере одного цитокина, и/или
- (C) продукции и/или высвобождению иммунными клетками по меньшей мере одной литической молекулы, и/или
- (D) экспрессии иммунными клетками по меньшей мере одного маркера активации.

Изобретение дополнительно относится к варианту реализации всех таких биспецифичных молекул, где клетка иммунной системы представляет собой Т-лимфоцит или естественную клетку-киллер (NK-клетку).

Изобретение дополнительно относится к варианту реализации всех таких биспецифичных молекул, где сайты связывания эпитопа, способные иммунноспецифично связываться с эпитопом PD-1, содержат:

- (A) VH-домен PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO: 47) и VL-домен PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO: 48); или
 - (B) VH-домен PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 49) и VL-домен PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 50); или
 - (C) VH-домен PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 51) и VL-домен PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 52); или
 - (D) VH-домен PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO: 53) и VL-домен PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO: 54); или
 - (E) VH-домен PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO: 55) и VL-домен PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO: 56); или
 - (F) VH-домен PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 57) и VL-домен PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 58); или
 - (G) VH-домен PD-1 mAb 6-I VH (SEQ ID NO: 86) и VL-домен PD-1 mAb 6-SQ VL (SEQ ID NO: 87);
- или
- (H) VH-домен PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO: 59) и VL-домен PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO: 60); или
 - (I) VH-домен mAb против PD-1 8 (SEQ ID NO: 61) и VL-домен mAb против PD-1 8 (SEQ ID NO: 62)

Изобретение дополнительно относится к варианту реализации всех таких биспецифичных молекул, где сайт (сайты) связывания эпитопа, способный иммунноспецифично связываться с эпитопом CTLA-4, содержит:

- (A) VH-домен CTLA-4 mAb 1 (SEQ ID NO: 76) и VL-домен mAb против CTLA-4 (SEQ ID NO: 77);
- или
- (B) VH-домен CTLA-4 mAb 2 (SEQ ID NO: 78) и VL-домена CTLA-4 mAb 2 (SEQ ID NO: 79); или
 - (C) VH-домен CTLA-4 mAb 3 (SEQ ID NO: 90) и VL-домена CTLA-4 mAb 3 (SEQ ID NO: 91).

Изобретение дополнительно относится к таким биспецифичным молекулам, где:

- (A) сайты связывания эпитопа, способные иммунноспецифично связываться с эпитопом PD-1, содержат VH-домен PD-1 mAb 6-I VH (SEQ ID NO: 86) и VL-домен PD-1 mAb 6-SQ (SEQ ID NO: 87) и
- (B) сайт (сайты) связывания эпитопа, способные иммунноспецифично связываться с эпитопом CTLA-4, содержит (содержат) VH-домен CTLA-4 mAb 3 (SEQ ID NO: 90) и VL-домен CTLA-4 mAb 3 (SEQ ID NO: 91).

Изобретение дополнительно относится к варианту реализации всех указанных биспецифичных молекул, где указанная молекула содержит:

- (A) две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 95, и две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 96; или
- (B) две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 97, и две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 98; или
- (C) две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 99, и две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 100; или
- (D) две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 102, и две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 103; или
- (E) две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 101, и две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 100; или

(F) одну полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 104, одну полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 105, одну полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 106, и одну полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 107; или

(G) одну полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 108, одну полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 105, одну полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 109, и одну полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 107.

Изобретение дополнительно относится к таким биспецифичным молекулам, где указанная молекула содержит альбумин-связывающий домен, в частности, деиммунизированный альбумин-связывающий домен.

Изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции, которая содержит эффективное количество любой из таких биспецифичных молекул и фармацевтически приемлемый носитель.

Изобретение дополнительно относится к применению такой фармацевтической композиции или любой из описанных выше биспецифичных молекул для стимуляции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, в частности, где указанная молекула способна стимулировать клетки иммунной системы и, в частности, стимуляцию естественных клеток-киллеров (NK-клеток) и/или Т-лимфоцитов. Изобретение, в частности, относится к вариантам реализации, где указанная стимуляция приводит к пролиферации иммунных клеток, продукции и/или высвобождению иммунными клетками цитокинов (например, $IFN\gamma$, IL-2, $TNF\alpha$ и т.д.), продукции и/или высвобождению иммунными клетками литических молекул (например, гранзима, перфорина и т.д.) и/или экспрессии иммунными клетками маркеров активации (например, CD69, CD25, CD107a и т.д.). Изобретение дополнительно относится к способам лечения рака или других заболеваний, включающим применение или введение любой из описанных выше биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул для стимуляции опосредованного иммунной системой ответа. Изобретение, в частности, относится к вариантам реализации, в которых стимулирующая иммунную систему активность любой из описанных выше биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул превышает активность, обеспечиваемую совместным или комбинированным введением отдельного антитела против PD-1 и отдельного антитела против CTLA-4 (в частности, где такие антитела являются моноспецифичными в отношении указанных молекул). Изобретение также относится к вариантам реализации при которых в клетках иммунной системы, в частности, естественных клетках-киллерах (NK-клетках) и/или Т-лимфоцитах, стимулированных описанными выше биспецифичными в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулами, наблюдается усиленная пролиферация, измененная продукция и/или высвобождение цитокинов (например, $IFN\gamma$, IL-2, $TNF\alpha$ и т.д.), измененная продукция и/или высвобождение литических молекул и/или измененная экспрессия маркеров активации по сравнению с такими клетками, стимулированными совместным или комбинированным введением отдельного антитела против PD-1 и отдельного антитела против CTLA-4. Изобретение также относится к вариантам реализации, в которых описанные выше биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы реже вызывают иммуноопосредованные нежелательные явления (иНЯ). Изобретение дополнительно относится к вариантам реализации, в которых любая из описанных выше биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул применяется для лечения заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы, в частности рака или инфекции.

Изобретение дополнительно относится к такому применению для лечения заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы, или применению в лечении указанного заболевания или состояния. Изобретение, в частности, относится к такому применению в лечении заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы, или к такому применению, где указанное заболевание или состояние представляет собой рак или инфекцию (в частности, инфекцию, характеризующуюся присутствием бактериального, грибкового, вирусного или протозойного патогена).

Изобретение, в частности, относится к такому применению, где:

(А) указанное применение представляет собой лечение рака, и указанный рак характеризуется присутствием раковой клетки, выбранной из группы, состоящей из клетки: опухоли надпочечника, ассоциированного со СПИДом рака, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитарной опухоли, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, метастатической опухоли головного мозга, рака молочной железы, опухоли каротидного тельца, рака шейки матки, хондросаркомы, хордомы, хромобной почечно-клеточной карциномы, светлоклеточной карциномы, рака толстой кишки, рака прямой кишки, кожной доброкачественной фиброзной гистиоцитомы, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эпендимомы, саркомы Юинга, внескелетной мукоидной хондросаркомы, несовершенного костного фиброгенеза, фиброзной дисплазии кости, рака желчного пузыря или рака желчного протока, рак желудка, гестационной трофобластической болезни, эмбрионально-клеточной опухоли, рака головы и шеи, гепатоклеточной карциномы, опухоли островковых клеток поджелудочной железы, саркомы Капоши, рака почки, лейкоза, липомы/доброкачественной липоматозной опухоли, липосаркомы/злокачественной липоматозной опухоли, рака печени, лимфомы, рака легких, медуллобластомы, ме-

ланомы, менингиомы, множественной эндокринной неоплазии, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринных опухолей, рака яичников, рака поджелудочной железы, папиллярной тиреокарциномы, опухоли паращитовидной железы, педиатрического рака, опухоли оболочек периферических нервов, феохромоцитомы, опухоли гипофиза рака предстательной железы, задней увеальной меланомы, редкого гематологического расстройства, метастатического рака почки, рабдоидной опухоли, рабдомиосаркомы, саркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, плоскоклеточного рака, рака желудка, синовиальной саркомы, рака яичка, рака вилочковой железы, тимомы, метастатического рака щитовидной железы и рака матки; или

(В) указанное применение представляет собой применение в лечении инфекции и указанная инфекция представляет собой хроническую вирусную, бактериальную, грибковую и паразитарную инфекцию, характеризующуюся присутствием вируса Эпштейна-Барр, вируса гепатита А (HAV); вируса гепатита В (HBV); вируса гепатита С (HCV); вирусов герпеса (например HSV-1, HSV-2, HHV-6, CMV), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса герпетического стоматита (VSV), бактерий класса Bacilli, бактерий рода Citrobacter, холерного вибриона, дифтерийной палочки, энтеробактерий, гонококков, бактерий вида Helicobacter pylori, бактерий рода Klebsiella и Legionella, менингококков, микобактерий, псевдомонад, пневмококков, риккетсий, сальмонелл, бактерий рода Serratia, стафилококков, стрептококков, столбнячной палочки, грибов рода Aspergillus (*A. fumigatus*, *A. niger* и т.д.), грибов вида Blastomyces dermatitidis, грибов рода Candida (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* и т.д.), грибов вида Cryptococcus neoformans, грибов рода Mucorales (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), грибов видов Sporothrix schenckii, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis и Histoplasma capsulatum, бактерий, вызывающих лептоспироз, бактерий вида Borrelia burgdorferi, гельминтов (нематод, ленточных червей, трематод, плоских червей (например, шистосом), кишечных лямблий, червей рода Trichinella, амеб вида Dientamoeba fragilis, трипаносом видов Trypanosoma brucei и Trypanosoma cruzi или протистов вида Leishmania donovani.

Изобретение, в частности, относится к такому применению в лечении рака, где указанный рак представляет собой рак толстой и прямой кишки, гепатоклеточную карциному, глиому, рак почки, рак молочной железы, множественную миелому, рак мочевого пузыря, нейробластому, саркому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легких, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ), хронический лимфобластный лейкоз (ХЛЛ), волосистоклеточный лейкоз (ВКЛ), бластоидную плазмцитоидную дендритоклеточную неоплазию (БПДН), неходжкинские лимфомы (НХЛ), включая мантийноклеточный лейкоз (МКЛ) и мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МКЛЛ), ходжкинскую лимфому, системный мастоцитоз или лимфому Беркитта.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлено схематичное изображение типичного ковалентно связанного диатела, содержащего два сайта связывания эпитопа и состоящего из двух полипептидных цепей, каждая из которых содержит стимулирующий образование гетеродимера домен E-coil или K-coil (альтернативные стимулирующие образование гетеродимера домены представлены ниже). Цистеиновый остаток может присутствовать в линкере и/или в стимулирующем образовании гетеродимера домене, как показано на фиг. 3В. VL- и VH-домены, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с помощью одинакового узора или цвета.

На фиг. 2 представлено схематичное изображение типичной ковалентно связанной молекулы диатела, содержащей два сайта связывания эпитопа и состоящей из двух полипептидных цепей, каждая из которых содержит CH2- и CH3-домен таким образом, что связанные цепи образуют целый Fc-фрагмент или часть Fc-фрагмента. VL-и VH-домены, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с использованием одинакового узора или цвета.

На фиг. 3А-3С представлены схематичные изображения, показывающие типичные ковалентно связанные тетравалентные диатела, содержащие четыре сайта связывания эпитопа и состоящие из двух пар полипептидных цепей (т.е. всего из четырех полипептидных цепей). Один полипептид каждой пары содержит CH2-и CH3-домен таким образом, что связанные цепи образуют целый Fc-фрагмент или часть Fc-фрагмента. VL- и VH-домены, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с использованием одинакового узора или цвета. Две пары полипептидных цепей могут быть одинаковыми. В таких вариантах реализации, где две пары полипептидных цепей являются одинаковыми и VL- и VH-домены распознают различные эпитопы (как показано на фиг. 3А-3В), полученная в результате молекула содержит четыре сайта связывания эпитопа и является биспецифичной и бивалентной по отношению к каждому связанному эпитопу. Согласно таким вариантам реализации где VL- и VH-домены распознают один и тот же эпитоп (например, на обеих цепях используются одинаковые CDR-участки VL-домена и одинаковые CDR-участки VH-домена), полученная в результате молекула содержит четыре сайта связывания эпитопа и является моноспецифичной и тетравалентной по отношению к единственному эпитопу. В качестве альтернативы, две пары полипептидов могут различаться. Согласно таким вариантам реализации, где две пары полипептидных цепей различаются и VL- и VH-домены каждой пары указанных полипептидов распознают различные эпитопы (как показано с использованием различающегося узора и цвета на фиг. 3С), полученная в результате молекула содержит четыре сайта связывания эпитопа и является тетраспе-

цифичной и моновалентной по отношению к каждому связанному эпитопу. На фиг. 3А показано содержащее Fc-фрагмент диатело, которое содержит пептидный стимулирующий образование гетеродимера домен, содержащий цистеиновый остаток. На фиг. 3В показано содержащее Fc-фрагмент диатело, которое содержит стимулирующие образование гетеродимера домены E-coil и K-coil, содержащие цистеиновый остаток, и линкер (необязательно с цистеиновым остатком). На фиг. 3С показано содержащее Fc-фрагмент диатело, которое содержит домены антитела CH1 и CL.

На фиг. 4А и 4В представлены схематичные изображения типичной ковалентно связанной молекулы диатела, содержащей два сайта связывания эпитопа и состоящей из трех полипептидных цепей. Две из полипептидных цепей содержат CH2-и CH3-домен таким образом, что связанные цепи образуют целый Fc-фрагмент или его часть. Полипептидные цепи, содержащие VL- и VH-домен, дополнительно содержат стимулирующий образование гетеродимера домен. VL- и VH-домены, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с использованием одинакового узора или цвета.

На фиг. 5 представлено схематичное изображение типичной ковалентно связанной молекулы диатела, содержащей четыре сайта связывания эпитопа и состоящей из пяти полипептидных цепей. Две из указанных полипептидных цепей содержат CH2- и CH3-домены таким образом, что связанные цепи образуют Fc-фрагмент, который содержит целый Fc-фрагмент или его часть. Полипептидные цепи, содержащие связанные VL- и VH-домены, дополнительно содержат стимулирующий образование гетеродимера домен. VL- и VH-домены, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с использованием одинакового узора или цвета.

На фиг. 6А-6F представлены схематичные изображения типичных содержащих Fc-фрагмент тривалентных связывающих молекул, содержащих три сайта связывания эпитопа. На фиг. 6А и 6В схематично показаны домены тривалентных связывающих молекул, содержащих два домена связывания по типу диатела и домен связывания по типу Fab-фрагмента, с разным распределением доменов, где домен связывания по типу диатела расположен со стороны N-конца или со стороны C-конца по отношению к Fc-фрагменту соответственно. Молекулы на фиг. 6А и 6В содержат четыре цепи. На фиг. 6С и 6D схематично изображены домены тривалентных связывающих молекул, содержащих два домена связывания по типу диатела, расположенных со стороны N-конца по отношению к Fc-фрагменту, и присоединенный домен связывания по типу Fab или домен связывания по типу scFv соответственно. На фиг. 6Е и 6F схематично показаны домены тривалентных связывающих молекул, содержащих два домена связывания по типу диатела, расположенных со стороны C-конца по отношению к Fc-фрагменту, и домен связывания по типу Fab, где легкая цепь и тяжелая цепь соединены через полипептидный спейсер или домен связывания типа scFv соответственно. Трехвалентные связывающие молекулы на фиг. 6С-6F содержат три цепи. VL- и VH-домены, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с помощью одинакового узора и цвета.

Фиг. 7 иллюстрирует принципы настоящего изобретения, демонстрируя, что пример биспецифичной молекулы (биспецифичная в отношении PD-1 x LAG-3 молекула, обозначенная как DART А) способен стимулировать продукцию цитокинов до уровня, превышающего уровень, наблюдаемый при совместном или комбинированном введении исходных антител против PD-1 и LAG-3. Показаны профили секреции IFN γ для мононуклеарных клеток периферической крови (МПКК) типичного донора, которые стимулировали SEB (0,5 нг/мл) и обрабатывали примером биспецифичной молекулы (биспецифичная в отношении PD-1 x LAG-3 молекула DART А) или антителами против PD-1 и LAG-3 отдельно или в комбинации.

На фиг. 8А-8D показаны результаты исследования с помощью твердофазного ИФА на основе измерения связывания связывающих молекул в серийных разведениях с CTLA-4 и PD-1 человека. На фиг. 8А-8В показаны кривые связывания CTLA-4 mAb 3 G4P, DART D, TRIDENT А или DART В с растворимым hCTLA-4-Avi-His (1 мкг/мл) (фиг. 8А) или hPD-1-His (1 мкг/мл) (фиг. 8В), нанесенным на планшеты-подложки. Козьи Fc-специфичные конъюгированные с HRP антитела против иммуноглобулина человека (1:10,000) использовали в качестве вторичной детектирующей молекулы для выявления связывания. На фиг. 8С-8D показаны результаты исследования влияния изменения доменов связывания и их распределения на связывание. Биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы, содержащие домены связывания CTLA-4 антитела CTLA-4 mAb 1 (например, DART В) и CTLA-4 mAb 3 (например, DART С и DART D), инкубировали в присутствии растворимого PD-1 человека (фиг. 8С) или растворимого CTLA-4-Avi-His человека (фиг. 8D), нанесенного на планшет-подложку. Козьи-Fc γ -специфичные конъюгированные с HRP антитела против иммуноглобулина человека использовали в качестве вторичной детектирующей молекулы для выявления связывания с применением хемилюминесцентного субстрата PICO.

На фиг. 9А-9Е показаны результаты оценки способности DART D, TRIDENT А, PD-1 mAb 6 G4P и CTLA-4 mAb 3 G4P и контрольной молекулы TRIDENT (имеющей два сайта связывания RSV и один сайт связывания CTLA-4) блокировать связывание лиганда с PD-1 и CTLA-1, отдельно и в комбинации. Блокирование связывания PD-L1 с PD-1 оценивали с помощью твердофазного ИФА в присутствии равного количества нерелевантного антигена (фиг. 9А) и в присутствии равного количества CTLA-4

(фиг. 9B), а блокирование связывания B7-1 с CTLA-4 оценивали в присутствии равного количества нерелевантного антигена (фиг. 9C) и в присутствии равного количества PD-1 (фиг. 9D), а также в присутствии четырехкратной концентрации PD-1 (фиг. 9E).

На фиг. 10A-10B показаны результаты оценки способности DART B, DART D, TRIDENT A, антител против CTLA-4 CTLA-4 mAb 1, CTLA-4 mAb 3 G4P и контрольного антитела hIgG связываться с клетками CHO, экспрессирующими CTLA-4 яванского макака (фиг. 10A) или CTLA-4 человека (фиг. 10B). Связывание выявляли с помощью Fc-специфичных вторичных антител против иммуноглобулина человека.

На фиг. 11A-11B показаны результаты оценки способности DART C, DART D, DART E, TRIDENT A, антител против CTLA-4 CTLA-4 mAb 1, CTLA-4 mAb 3 G1AA и антитела против PD-1 PD-1 mAb 6 G4P связываться с клетками Jurkat (которые экспрессируют на своей поверхности huCTLA-4, но не экспрессируют PD-1). Связывание молекул DART и TRIDENT с CTLA-4 человека выявляли с помощью Fc-специфичных вторичных антител против иммуноглобулина человека (сортировка клеток с активированной флуоресценцией, FACS). На фиг. 11A показаны результаты оценки DART C, DART D, DART E, CTLA-4 mAb 1, CTLA-4 mAb 3 G1AA и PD-1 mAb 6 G4P. На фиг. 11B показаны результаты оценки CTLA-4 mAb 1, CTLA-4 mAb 3 G1AA, PD-1 mAb 6 G4P и TRIDENT A.

На фиг. 12A-12B показаны результаты оценки способности DART D, TRIDENT A и антител против CTLA-4 CTLA-4 mAb 1, CTLA-4 mAb 3 G1AA блокировать лиганды CTLA-4 B7-1 и B7-2 в клеточном анализе. Меченные гистидином (His) производные B7-1 и B7-2 инкубировали в присутствии клеток Jurkat и искусственных антиген-презентирующих клеток (Promega). Связывание His-B7-1 и His-B7-2 выявляли с применением антитела против His. Результаты оценки показаны на фиг. 12A (His-B7-1) и фиг. 12B (His-B7-2).

На фиг. 13 показаны результаты оценки способности DART C, DART D, TRIDENT A, CTLA-4 mAb 3 G1AA и PD-1 mAb 6 G4P обращать ингибирующий сигнал контрольной точки иммунного ответа CTLA-4, как показано в анализе репортерного гена на клетках IL-2/Luc-Jurkat-CTLA-4 на основе повышенной экспрессии люциферазы. Клетки IL-2/Luc-Jurkat-CTLA-4 инкубировали в присутствии указанных связывающих молекул (R:S= 1:0,3) в течение 30 мин при температуре 37°C, после чего добавляли искусственные антиген-презентирующие клетки Raji и продолжали инкубировать в течение 6 часов. Обращение ингибирующего сигнала контрольной точки иммунного ответа CTLA-4 определяли с помощью люциферазного анализа.

На фиг. 14 показаны результаты оценки способности DART D, TRIDENT A, PD-1 mAb 6 G4P и CTLA-4 mAb 3 G1AA связываться с клетками NSO, экспрессирующим PD-1, но не экспрессирующими CTLA-4. Связывающие молекулы инкубировали в присутствии клеток и измеряли средний коэффициент флуоресценции клеток.

На фиг. 15A-15B показаны результаты оценки способности DART D, TRIDENT A, PD-1 mAb 6 G4P и CTLA-4 mAb 3 G1AA блокировать связывание между PD-1 и его лигандами PD-L1 и PD-L2 в клеточном анализе. PD-L1-PE или PD-L2-PE инкубировали в присутствии указанных связывающих молекул и оценивали их способность связываться с клетками NSO-PD-1 путем сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Фиг. 15A (PD-L1); фиг. 15B (PD-L2).

На фиг. 16 показаны результаты оценки способности DART D, TRIDENT A, CTLA-4 mAb 3 G1AA и PD-1 mAb 6 G4P блокировать ингибирование иммунного ответа, происходящее в результате взаимодействия PD-1/PD-L1. Связывающие молекулы инкубировали в присутствии клеток PD-L1⁺ CHO и эффекторных клеток Jurkat и оценивали их способность блокировать ингибирование иммунного ответа (путем блокирования взаимодействия PD-1/PD-L1) на основе степени наблюдаемой активации, опосредованной CD3 (как показано с помощью повышенной экспрессии люциферазы в анализе на клетках NFAT-luc/PD-1 Jurkat; Promega).

На фиг. 17 показаны результаты оценки способности DART D, TRIDENT A и антитела отрицательного контроля связываться одновременно с PD-1 и CTLA-4 в ферментационном анализе комплекта белковых фрагментов, DiscoverX. Аликвоты суспензии клеточной линии U2OS CTLA-4(1-195)-PK PD-1(1-199)-EA, клона #9, помещали в четырех повторностях в концентрации 5,000 клеток/лунку в культуральной среде для планшетов DiscoverX CP5 на 384-луночные планшеты. Клеткам позволяли прикрепляться в течение 4 часов при 37°C/5% CO₂. Затем каждую из связывающих молекул в серийных разведениях 1:3 (11 точек) добавляли к клеткам PD-1-CTLA-4 и образцы DART D и TRIDENT A добавляли к клеткам PD-1-LAG-3. Планшеты инкубировали в течение ночи (16 часов) при 37°C/5% CO₂. Выявляющий реагент PathHunter добавляли в лунки и планшет затем инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте и данные считывали на люминометре Envision.

На фиг. 18 показаны результаты оценки способности DART D, TRIDENT A, CTLA-4 mAb 3 G1AA, PD-1 mAb 6 G4P и комбинации CTLA-4 mAb 3 G1AA/PD-1 mAb 6 G4P (Ab Combo 1) усиливать ответ в реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ). Дендритные клетки моноцитарного происхождения получали путем обработки CD14⁺ моноцитов гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF), введенным на 1 день периода инкубирования и IL-4 (введенным на 7 день периода инкубирования). На 8 день периода инкубирования запускали реакцию СКЛ путем инкубирования

ли CD4⁺ Т-клеток с дендритными клетками моноцитарного происхождения (предоставленными на 8 день периода инкубирования) и связывающих молекул против CTLA-4 и PD-1 (предоставленных на 8 день периода инкубирования). Высвобождение IFN- γ представлено в виде графика на фиг. 18. Было обнаружено, что как биспецифичные DART D, так и молекулы TRIDENT, усиливают ответ в реакции СКЛ в одинаковой степени или немного больше по сравнению с комбинацией отдельных исходных антител. Представленные данные включают семь групп столбцов (каждая из которых относится к различным связывающим молекулам: контрольный hIgG4; PD-1 mAb 6 G4P; CTLA-4 mAb 3 G1AA; комбинация CTLA-4 mAb 3 G1AA/PD-1 mAb 6 G4P (Ab Combo 1); DART D; TRIDENT A и контрольный hIgG1, слева направо соответственно); каждая группа состоит из шести столбцов (каждый относится к разной концентрации представленной молекулы: 0,016, 0,08, 0,4, 2, 10 или 50 нМ, слева направо соответственно).

На фиг. 19A-19D показан эффект введения DART D, TRIDENT A, CTLA-4 mAb 3 G1AA, PD-1 mAb 6 G4P и комбинации CTLA-4 mAb 1/PD-1 mAb 1 (Ab Combo 1) на Т-клеточные ответы с помощью анализа повторной стимуляции энтеротоксином *Staphylococcus aureus* типа В (SEB). На фиг. 19A-19B показаны точечные диаграммы данных сортировки активируемых флуоресценцией клеток (FACS), отражающих экспрессию такими МКПК PD-1 в зависимости CTLA-1 в отсутствие (фиг. 19A) или в присутствии (фиг. 19B) стимуляции SEB. На фиг. 19C показан эффект стимуляции SEB на секрецию IFN- γ . МКПК стимулировали энтеротоксином типа В *Staphylococcus aureus* (SEB) в концентрации 0,5 нг/мл в течение 48 часов. Клетки затем собирали, промывали и заново помещали на 96-луночные планшеты с антителами в различных концентрациях в присутствии свежего SEB на дополнительные 48 часов. Супернатант затем собирали и анализировали продукцию IFN- γ с помощью проточной цитометрии/твердофазного ИФА. Как биспецифичные DART, так и белок TRIDENT, показали повышенную ответную продукцию IFN- γ , которая соответствовала суммарному ответу, наблюдаемому при введении комбинации отдельных исходных mAb. Сходные результаты наблюдались в анализе стимуляции SEB, в котором МКПК культивировали с высокой концентрацией (500 нг/мл) SEB в течение 72 часов. Представлены шесть групп столбцов, каждая из которых относится к различным молекулам связывания. Каждая группа состоит из семи столбцов, которые отражают результат, полученный при использовании связывающей молекулы в концентрации 25 нМ, 6,25 нМ, 1,56 нМ, 0,39 нМ, 0,09 нМ, 0,02 нМ или 0,006 нМ (слева направо соответственно). На фиг. 19D показано высвобождение IL-2 для типичного донора. МКПК стимулировали 0,5 нг/мл SEB в течение 48 часов, собирали, промывали и заново помещали в 96-луночные планшеты со свежим SEB в присутствии либо DART D, TRIDENT A, CTLA-4 mAb 3 G1AA, PD-1 mAb 6 G4P, либо комбинации CTLA-4 mAb 3 G1AA/PD-1 mAb 6 G4P (Ab Combo 1) на дополнительные 48 часов и измеряли высвободившийся IL-2. Представлены семь групп столбцов, каждая из которых относится к различным связывающим молекулам или состояниям. Каждая группа состоит из трех столбцов, отражающих результат, полученный при использовании связывающей молекулы в концентрации 0,5 нМ, 5 нМ или 50 нМ соответственно (слева направо). При использовании антител в комбинации каждое антитело добавляли при указанной концентрации таким образом, что общая концентрация добавляемого антитела удваивалась.

На фиг. 20A-20B показана активность биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул на модели болезни "трансплантат против хозяина" (БТПХ) у мышей NOG с трансплантированными МКПК. Подсчет CD3⁺ Т-клеток осуществляли путем сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) в день исследования (фиг. 20A) у мышей, которые получали DART D в дозе 50 мг/кг или 500 мг/кг (фиг. 20A). За выживаемостью следили на протяжении всего исследования; данные представлены на графике в виде процентной выживаемости на фиг. 20B.

На фиг. 21A-21C показаны графики зависимости концентрации в сыворотке от времени для яванских макаков (обозначенных с помощью 6-тизначного буквенно-цифрового кода), которые получали DART D в концентрации 50 мг/кг на 1, 8 и 15 сутки исследования (фиг. 21A), DART D в концентрации 75 мг/кг на 1, 8 и 15 сутки исследования (фиг. 21B) или Trident A в концентрации 5 мг/кг на 1 сутки исследования (фиг. 21C).

На фиг. 22A-22B показан эффект введения DART D на абсолютное содержание лимфоцитов (АСЛ) у яванских макаков, которым проводили лечение. На фиг. 22A показано АСЛ в тысячах клеток/мкл (тыс.кл./мкл). На фиг. 22B показано процентное изменение АСЛ, нормированное к значению для 1 суток (D1).

На фиг. 23A-23B показана пролиферация CD4⁺ Т-клеток и занятость рецептора PD-1 на Т-клетках у яванских макаков, которым вводили DART D в концентрации 50 мг/кг (фиг. 23A) или DART D в концентрации 75 мг/кг (фиг. 23B).

На фиг. 24A-24B показан эффект введения DART D на пролиферацию CD4⁺ Т-клеток у яванских макаков, которым вводили DART D в концентрации 50 мг/кг (фиг. 24A) или DART D в концентрации 75 мг/кг (фиг. 24B).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение направлено на биспецифичные молекулы (например, диатела, биспецифичные антитела, тривалентные связывающие молекулы и т.д.), содержащие по меньшей мере один сайт связывания, обладающий иммуноспецифичностью в отношении эпитопа PD-1, и по меньшей мере один сайт связывания, обладающий иммуноспецифичностью в отношении эпитопа CTLA-4 (т.е. "биспеци-

фичные в отношении PD-1 х CTLA-4 молекулы"). Настоящее изобретение относится к таким биспецифичным в отношении PD-1 х CTLA-4 молекулам, которые содержат два сайта связывания эпитопа, обладающие иммуноспецифичностью в отношении одного (или двух) эпитопа (эпитопов) PD-1, и два сайта связывания эпитопа, обладающие иммуноспецифичностью в отношении одного (или двух) эпитопа (эпитопов) CTLA-4. Настоящее изобретение также направлено на такие биспецифичные в отношении PD-1 х CTLA-4 молекулы, которые дополнительно содержат Fc-фрагмент иммуноглобулина. Биспецифичные в отношении PD-1 х CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению способны одновременно связываться с PD-1 и CTLA-4, в частности, в том виде, в котором указанные молекулы распределены на поверхности клеток человека. Изобретение направлено на фармацевтические композиции, которые содержат такие биспецифичные в отношении PD-1 х CTLA-4 молекулы, и способы, включающие применение таких биспецифичных молекул в лечении рака и других заболеваний и состояний. Настоящее изобретение также относится к способам, включающим применение таких биспецифичных в отношении PD-1/CTLA-4 молекул для стимуляции иммунного ответа.

Для активации Т-клеток требуются два отдельных сигнала (Viglietta, V. et al. (2007) "Modulating Co-Stimulation" *Neurotherapeutics* 4:666-675; Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy" *Adv. Immunol.* 90:297-339). Первый сигнал обеспечивает молекула Т-клеточного рецептора (TCR), экспрессируемая на поверхности Т-клетки, которая распознала пептидный антиген, связанный с человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA), экспрессируемым на поверхности антиген-презентирующей клетки (АПК). Второй сигнал обеспечивается взаимодействием когнатных пар ко-стимулирующих лигандов B7-1 и B7-2, экспрессируемых на АПК, и их соответствующих рецепторов CD28 и CTLA-4, экспрессируемых на Т-клетках.

Связывание молекул B7-1 и B7-2 с CD28 стимулирует пролиферацию Т-клеток и дополнительно вызывает повышенную экспрессию CTLA-4. CTLA-4 является отрицательным регулятором, который конкурирует с B7-1 и B7-2 за связывание с CD28. Таким образом, ответ на заболевание включает две фазы: начальная фаза включает стимуляцию пролиферации Т-клеток; последующая фаза "сводит на нет" иммунный ответ и возвращает иммунную систему субъекта в состояние покоя. Антитела, которые связываются с CD28, могут имитировать связывание B7-1 или B7-2 и, таким образом, вызывать или усиливать эффекторные функции Т-клеток и возникновение иммунной реакции, направленной на ликвидацию опухоли; такие антитела являются ко-стимулирующими. Напротив, антитела, которые блокируют связывание CTLA-4 с B7-1 и B7-2, могут предотвращать возвращение Т-клеток в состояние покоя; поддерживая, таким образом, непрерывную пролиферацию указанных Т-клеток, что может приводить к аутоиммунной реакции и развитию "иммунноопосредованных нежелательных явлений" (иНЯ) (Wang, L. et al. (March 7, 2011) "VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses" *J. Exp. Med.* 10.1084/jem.20100619:l-16; Lepenies, B. et al. (2008) "The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections" *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 8:279-288). Особо важное значение имеет связывание между лигандами B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86) антиген-презентирующей клетки и рецепторами CD28 и CTLA-4 CD4⁺ Т-лимфоцита (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules" *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation", *Immunol. Rev.* 229:307-321). Связывание B7-1 или B7-2 с CD28 стимулирует активацию Т-клеток; связывание B7-1 или B7-2 с CTLA-4 ингибирует указанную активацию (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules", *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation" *Immunol. Rev.* 229:307-321; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited", *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548). CD28 конститутивно экспрессируется на поверхности Т-клеток (Gross, J., et al. (1992) "Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse", *J. Immunol.* 149:380-388), тогда как экспрессия CTLA-4 стимулируется сразу после активации Т-клеток (Linsley, P. et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement" *Immunity* 4:535-543). Поскольку рецептор CTLA-4 обладает более высокой аффинностью (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily" *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126), связывание лигандов сначала вызывает пролиферацию Т-клеток (через CD28), а затем ее ингибирует (в результате начала экспрессии CTLA-4), подавляя, таким образом, эффект, когда пролиферация больше не требуется.

Наряду с описанными выше взаимодействиями, второй набор рецепторов и связывающих лигандов функционирует как ингибитор иммунной системы, действуя, таким образом, в качестве тормоза для замедления опосредованного CD28/B7-1/B7-2 усиления иммунного ответа. Указанный дополнительный ответ включает связывание рецептора белка программированной клеточной гибели-1 (PD-1), экспрессируемого на поверхности Т-клеток, с соответствующими лигандами: PD-L1, экспрессируемым на антиген-презентирующих клетках (АПК), и PD-L2, экспрессируемым на эпителиальных клетках (Chen L. et al. (2013) "Molecular Mechanisms Of T-Cell Co-Stimulation And Co-Inhibition" *Nature Reviews Immunology* 13(4):227-242). В отличие от антител-агонистов, которые связываются с CD28, обеспечивая непосредственную стимуляцию Т-клеточных ответов, антитела, которые связываются с PD-1 или PD-L1, действуют как антагонисты или блокируют вовлечение PD-1/PD-L1 и, таким образом, поддерживают активацию Т-

клеток путем предотвращения передачи отрицательного сигнала Т-клеткам. в таком случае антитела, которые связываются с PD-1 или PD-L1, усиливают или поддерживают пролиферацию, цитотоксичность и/или секрецию цитокинов Т-клеток. В совокупности, антитела-агонисты, такие как антитела против CD28, направлены на положительные сигнальные пути и, таким образом, являются ко-стимуляторами, тогда как антитела-антагонисты, такие как антитела против CTLA-4 и антитела против PD-1, направлены на отрицательные сигнальные пути и называются ингибиторами контрольных точек иммунного ответа.

Как описано выше, CTLA-4 и PD-1 представляют собой канонические ингибирующие иммунный ответ контрольные точки, которые проявляют различные ингибирующие эффекты на активацию Т-клеток. Биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению способны связываться с молекулами клеточной поверхности PD-1 и CTLA-4, которые присутствуют на поверхности лимфоцитов и, таким образом, нарушать способность указанных молекул клеточной поверхности отвечать на их соответствующие рецепторы. Не ограничиваясь какой-либо теорией или механизмом, авторы изобретения считают, что связывание PD-1 может приводить к прекращению ингибирования Т-клеток (например, в местах локализации опухоли и/или в результате инфекции) и что связывание CTLA-1 может стимулировать поликлональную активацию и стимуляцию. В таком случае биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению способны ослаблять опосредованное PD-1 и CTLA-4 ингибирование иммунной системы и обеспечивать продолжительную активацию иммунной системы. В настоящей заявке было показано, что биспецифичные молекулы, которые направлены на два иммуномодулирующих пути, являются более активными по сравнению с комбинацией отдельных антител. Настоящее изобретение также обеспечивает биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы с отношением связывания PD-1:CTLA-4, составляющим 1:1, 1:2, 2:2 и 2:1, которые позволяют полное блокирование как PD-1, так и CTLA-4, а также блокирование, распространяющееся на CTLA-4 при его ко-экспрессии с PD-1. Таким образом, биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению обеспечивают неожиданное преимущество по сравнению с комбинацией отдельных антител против PD-1 и против CTLA-4. Дополнительно, биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению могут обеспечивать стимуляцию иммунного ответа со сниженным риском иммуноопосредованных нежелательных явлений (иНЯ).

I. Антитела и их связывающие домены.

Антитела согласно настоящему изобретению представляют собой молекулы иммуноглобулинов, способные специфично связываться с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т.д., по меньшей мере через один сайт распознавания антигена, расположенный в вариабельном домене указанной молекулы иммуноглобулина. В настоящей заявке термины "антитело" и "антитела" относятся к моноклональным антителам, мультиспецифичным антителам, антителам человека, гуманизированным антителам, синтетическим антителам, гибридным антителам, поликлональным антителам, камелизированным (верблюжьим) антителам, одноцепочечным Fv-фрагментам (scFv), одноцепочечным антителам, Fab-фрагментам, F(ab')-фрагментам, связанным дисульфидной связью биспецифичным Fv-фрагментам (sdFv), интрателам и связывающим эпитоп фрагментам любых из перечисленных выше молекул. В частности, термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулинов и иммунологически активные фрагменты молекул иммуноглобулинов, т.е. молекулы, которые содержат сайт связывания эпитопа. Молекулы иммуноглобулинов могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂) или подкласса. В настоящей заявке считается, что Fc-фрагмент принадлежит конкретному изотипу, классу или подклассу IgG, если его аминокислотная последовательность имеет наибольшую гомологию с указанным изотипом по сравнению с другими изотипами IgG. Было показано, что помимо известных способов применения антител в диагностике, антитела применимы в качестве терапевтических агентов. Антитела способны иммуноспецифично связываться с полипептидом или белком или небелковой молекулой благодаря присутствию в такой молекуле конкретного домена или фрагмента или структуры ("эпитопа"). Содержащая эпитоп молекула может обладать иммуногенной активностью, вызывающей ответную продукцию антитела у животного; такие молекулы называются "антигенами". Последние несколько десятилетий наблюдается оживленный интерес к терапевтическому потенциалу антител, и антитела стали одним из ведущих классов получаемых биотехнологическим путем лекарственных средств (Chan, C.E. et al. (2009) "The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases" Singapore Med. J. 50(7):663-666). Более 200 лекарственных средств на основе антител были одобрены для применения или находятся в стадии разработки.

Термин "моноклональное антитело" относится к гомогенной популяции антител, где указанное моноклональное антитело состоит из аминокислот (природных и неприродных), которые вовлечены в селективное связывание антигена. Моноклональные антитела являются высоко специфичными и направлены против единственного эпитопа (или антигенного сайта). Термин "моноклональное антитело" включает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂ Fv), одноцепочечные антитела (scFv), их мутанты, гибридные белки, содержащие часть антитела, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любые другие модифицированные конфигурации молекулы иммуноглобулина, обладающие сайтом распознавания антигена, необходимой специфичностью и способностью связывать

ся с антигеном. Подразумевается, что настоящее изобретение не ограничивает источник антитела или способ его получения (например, получение с использованием гибридомы, фагового отбора, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных и т.д.). Термин включает целые иммуноглобулины, а также фрагменты и т.д., описанные выше, в рамках определения "антитело". Способы получения моноклональных антител известны в данной области техники. Один способ, который можно использовать, представляет собой способ по Колеру (Kohler, G. et al. (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity", Nature 256:495-497) или его модификацию. Обычно моноклональные антитела вырабатывают у мышей, крыс или кроликов. Антитела получают путем иммунизации животного иммуногенным количеством клеток, клеточных экстрактов или белковых препаратов, которые содержат желаемый эпитоп. Иммуноген может представлять собой, но не ограничивается указанными, первичные клетки, культивируемые клеточные линии, раковые клетки, белки, пептиды, нуклеиновые кислоты или ткань. Клетки, используемые для иммунизации, можно культивировать в течение периода времени (например, по меньшей мере 24 часов) до их применения в качестве иммуногена. Клетки можно применять в качестве иммуногенов самостоятельно или в комбинации с неденатурирующим адъювантом, таким как Ribi (см. например, Jennings, V.M. (1995) "Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production", ILAR J. 37(3):119-125). В целом, клетки следует хранить интактными и предпочтительно жизнеспособными при использовании в качестве иммуногенов. Интактные клетки могут позволить лучшее выявление антигенов у иммунизированного животного по сравнению с разрушенными клетками. Применение денатурирующих или жестких адъювантов, например, адъюванта Фрейнда, может приводить к разрыву клеток и, таким образом, не рекомендуется. Иммуноген можно вводить многократно с периодическими интервалами, например, два раза в неделю или один раз в неделю, или можно вводить таким образом, чтобы поддерживать жизнеспособность у животного (например, в тканевом рекомбинанте). В качестве альтернативы, существующие моноклональные антитела и любые другие эквивалентные антитела, которые обладают иммуноспецифичностью в отношении желаемого патогенного эпитопа можно секвенировать и получать рекомбинантным путем с помощью любых способов, известных в данной области техники. Согласно одному варианту реализации изобретения такое антитело секвенируют и полинуклеотидную последовательность затем клонируют в вектор для экспрессии или амплификации. Последовательность, кодирующую интересующее антитело, можно поддерживать в векторе в хозяйской клетке, и хозяйскую клетку затем можно размножать и замораживать для будущего применения. Полинуклеотидную последовательность такого антитела можно применять для генетических манипуляций для создания моноспецифичных или мультиспецифичных (например, биспецифичных, триспецифичных и тетраспецифичных) молекул согласно изобретению, а также молекул с оптимизированной аффинностью, химерного антитела, гуманизированного антитела и/или кананизированного (собачьего) антитела для улучшения аффинности или других характеристик антитела. Общий принцип в гуманизировании антитела включает сохранение основной последовательности антиген-связывающей части антитела при замене оставшейся части антитела не человеческого происхождения на последовательности антитела человека.

Природные антитела (такие как антитела IgG) состоят из двух легких цепей, объединенных с двумя тяжелыми цепями. Каждая легкая цепь содержит переменный домен (VL) и константный домен (CL). Каждая тяжелая цепь содержит переменный домен (VH), три константных домена (CH1, CH2 и CH3) и шарнирный участок, расположенный между доменами CH1 и CH2. Основной структурной единицей природных иммуноглобулинов (например, IgG), таким образом, является тетрамер, содержащий две легкие цепи и две тяжелые цепи, которые обычно экспрессируются в виде гликопротеина с молекулярной массой примерно 150000 Да. Аминоконцевая ("N-концевая") часть каждой цепи содержит переменный домен, состоящий примерно из 100-110 или более аминокислот, отвечающих в первую очередь за распознавание антигена. Карбоксиконцевая ("C-концевая") часть каждой цепи определяет константную область, при этом легкие цепи имеют единственный константный домен, а тяжелые цепи обычно содержат три константных домена и шарнирный участок. Таким образом, структура легких цепей молекулы IgG представляет собой n-VL-CL-с, и структура тяжелых цепей IgG представляет собой n-VH-CH1-CH2-CH3-С (где Н представляет собой шарнирный участок, а n и с представляют собой N-конец и C-конец полипептида соответственно). Переменные домены молекулы IgG состоят из гиперпеременных участков (CDR), которые содержат остатки, контактирующие с эпитопом, и сегменты, не представляющие собой CDR, называемые каркасными участками (FR), которые в целом поддерживают структуру и определяют такую ориентацию петель CDR, которая позволяет указанное контактирование (несмотря на то что конкретные каркасные остатки могут также контактировать с антигеном). Таким образом, домены VL и VH имеют структуру n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-с. Полипептиды, которые представляют собой или могут служить в качестве первого, второго и третьего CDR легкой цепи антитела, обозначаются в настоящей заявке как домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2} и домен CDR_{L3} соответственно. Аналогично, полипептиды, которые представляют собой или могут служить в качестве первого, второго и третьего CDR тяжелой цепи антитела обозначаются в настоящей заявке как домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3} соответственно. Таким образом, термины домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2}, домен CDR_{L3}, домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2} и домен CDR_{H3} относятся к полипептидам, которые при встраивании в белок придают ему способность связываться с конкретным эпитопом, независимо от того, представляет ли со-

бой указанный белок антитела, содержащее легкие и тяжелые цепи, диатело или молекулу связывания с единственной цепью (например, scFv, а BiTe и т.д.) или белок другого типа. Соответственно при использовании в настоящей заявке термин "связывающий эпитоп фрагмент" обозначает фрагмент антитела, способный иммуноспецифично связываться с эпитопом, и термин "сайт связывания эпитопа" относится к части молекулы, содержащей связывающий эпитоп фрагмент. Связывающий эпитоп фрагмент может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 из доменов CDR указанного антитела и, несмотря на способность иммуноспецифично связываться с указанным эпитопом, может проявлять иммуноспецифичность, аффинность или селективность в отношении такого эпитопа, который отличается от эпитопа указанного антитела. Однако предпочтительно связывающий эпитоп фрагмент содержит все 6 из доменов CDR указанного антитела. Связывающий эпитоп фрагмент антитела может представлять собой единственную полипептидную цепь (например, scFv) или может содержать две или более полипептидных цепей, каждая из которых содержит аминоконец и карбоксиконец (например, диатело, Fab-фрагмент, Fab₂-фрагмент и т.д.). Если специально не указано, домены белковых молекул, описанных в настоящей заявке, расположены в направлении от N-конца к С-концу.

Изобретение, в частности, включает биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 связывающие молекулы, содержащие один, два или больше двух одноцепочечных фрагментов варибельного домена ("scFv") антитела против PD-1 и один, два или больше двух одноцепочечных фрагментов варибельного домена антитела против CTLA-4. Одноцепочечные фрагменты варибельного домена получены путем связывания варибельного домена легкой и тяжелой цепи с помощью короткого линкерного пептида. Линкеры можно модифицировать для обеспечения дополнительных функций, например, для возможности присоединения лекарственных средств или присоединения к твердым подложкам. Одноцепочечные варианты могут быть получены либо рекомбинантным, либо синтетическим путем. Для синтетического получения scFv можно применять автоматический синтезатор. Для рекомбинантного получения scFv в подходящую хозяйскую клетку - эукариотическую, такую как клетку дрожжей, растений, насекомых или млекопитающих, или прокариотическую, такую как *E. coli* - можно вводить подходящую плазмиду, содержащую полинуклеотид, кодирующий scFv. Полинуклеотиды, кодирующие интересующий scFv, можно получить с помощью стандартных процедур, таких как лигирование полинуклеотидов. Полученный в результате scFv можно выделять с применением стандартных методов очистки белка, известных в данной области техники.

Изобретение, в частности, также включает биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы, содержащие гуманизированные антитела против PD-1 и против CTLA-4. Термин "гуманизированное" антитело относится к гибридной молекуле, в целом полученной с помощью рекомбинантных методов и содержащей сайт связывания антигена иммуноглобулина из видов не человеческого происхождения с сохраненной структурой иммуноглобулиновой молекулы, основанной на структуре и/или последовательности иммуноглобулина человека. Полинуклеотидную последовательность варибельных доменов такого антитела можно применять для генетической манипуляции для создания таких производных и для улучшения аффинности или других характеристики указанного антитела. Общий принцип в гуманизировании антитела включает сохранение основной последовательности антиген-связывающей части антитела при замене оставшейся части антитела не человеческого происхождения на последовательности антитела человека. Существует четыре общих этапа гуманизирования моноклонального антитела: (1) определение нуклеотидной и предсказанной аминокислотной последовательности варибельных доменов легкой и тяжелой цепи исходного антитела; (2) проектирование гуманизированного антитела или канинизированного (собачьего) антитела, т.е. принятие решения о том, какой каркасный участок антитела будет использоваться во время процесса гуманизирования или канинизирования; (3) фактическое осуществление методов/технологий гуманизирования или канинизирования и (4) трансфекция и экспрессия гуманизированного антитела. См., например, патенты США № 4 816 567; 5 807 715; 5 866 692 и 6 331 415.

Сайт связывания антигена может содержать полноразмерный варибельный домен, слитый с константным доменом, или только гиперварибельные участки (CDR) указанного варибельного домена, привитые к подходящим каркасным участкам. Сайты связывания антигена могут представлять собой сайты дикого типа или сайты, модифицированные с помощью одной или более аминокислотных замен. Это позволяет избавиться от константной области, являющейся иммуногеном у субъектов, представляющих собой людей, но вероятность возникновения иммунного ответа на чужеродный варибельный домен сохраняется (LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response" Proc. Natl. Acad. Sci. (США) 86:4220-4224). Другой подход фокусируется не только на обеспечении константных областей человеческого происхождения, но и на модифицировании варибельных доменов, а также их реконструкции с максимальным приближением к форме человеческого происхождения. Известно, что варибельные домены как тяжелых, так и легких цепей содержат три гиперварибельных участка (CDR), различающихся в зависимости от конкретного антигена и определяющих способность связывания. Указанные домены фланкированы четырьмя каркасными участками (FR), которые являются относительно консервативными для данного вида и предположительно обеспечивают поддержку для CDR. При создании антител не человеческого происхождения, направленных на конкретный антиген, варибельные домены можно "реконструировать" или "гуманизировать" путем

прививания CDR, полученных от антитела не человеческого происхождения, к FR, присутствующим в человеческом антителе, которое подлежит модифицированию. Было описано применение указанного подхода к различным антителам Sato, K. et al. (1993) *Cancer Res* 53:851-856; Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy" *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity" *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation" *Protein Engineering* 4:773-783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity" *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody" *Proc. Natl. Acad. Sci. (США)* 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo" *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy" *Proc. Natl. Acad. Sci. (США)* 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-pl85her2 Antibody For Human Cancer Therapy" *Proc. Natl. Acad. Sci. (США)* 89:4285-4289; Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen" *J. Immunol.* 148:1149-1154. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения гуманизированные антитела сохраняют все последовательности CDR (например, гуманизированное мышиное антитело, которое содержит все шесть CDR от мышиных антител). Согласно другим вариантам реализации гуманизированные антитела содержат один или более CDR (один, два, три, четыре, пять или шесть), которые отличаются по последовательности от исходного антитела.

Был описан ряд молекул "гуманизированных" антител, содержащих сайт связывания антигена, происходящий из иммуноглобулина не человеческого происхождения, включая гибридные антитела, содержащие вариативный домен и связанные с ним гипервариативные участки (CDR) грызунов или модифицированный вариативный домен и связанные с ними гипервариативные участки (CDR) грызунов, слитые с константными доменами иммуноглобулина человека (см. например, Winter et al. (1991) "Man-made Antibodies" *Nature* 349:293-299; Lobuglio et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response" *Proc. Natl. Acad. Sci. (США)* 86:4220-4224 (1989), Shaw et al. (1987) "Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen" *J. Immunol.* 138:4534-4538, Brown et al. (1987) "Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody" *Cancer Res.* 47:3577-3583). Другие ссылки описывают CDR грызунов, привитые к поддерживающему каркасному участку (FR) человека до слияния с подходящим константным доменом человеческого антитела (см. например, Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy" *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity" *Science* 239:1534-1536; and Jones et al. (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse" *Nature* 321:522-525). В другой ссылке описаны CDR грызунов, которые поддерживаются рекомбинантно "венированными" каркасными участками грызунов. См., например, публикацию европейского патента № 519,596. Указанные "гуманизированные" молекулы сконструированы таким образом, чтобы минимизировать нежелательный иммунный ответ в отношении молекул антител грызунов, направленных против иммуноглобулина человека, ограничивающий продолжительность и эффективность терапевтического применения указанных фрагментов у реципиентов, представляющих собой людей. Другие способы гуманизации антител, которые также можно применять, описаны в источнике Daugherty et al. (1991) "Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins" *Nucl. Acids Res.* 19:2471-2476 и в патентах США № 6 180 377; 6 054 297; 5 997 867 и 5 866 692.

II. Рецепторы Fcγ (FcγRs).

CH2- и CH3-домены двух тяжелых цепей взаимодействуют с образованием Fc-фрагмента, который представляет собой домен, распознаваемый клеточными рецепторами Fc, включая, но не ограничиваясь Fc-рецепторами гамма (FcγRs). В настоящей заявке термин "Fc-фрагмент" применяется для определения C-концевого участка тяжелой цепи IgG. Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 примера человеческого IgG1 представляет собой (SEQ ID NO: 1)

```

231 240 250 260 270 280
APELLGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD

290 300 310 320 330
GVEVHNATK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

340 350 360 370 380
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

390 400 410 420 430
WESNGQPENN YKTTTPPVLD SGGFFLYSKL TVDKSRWQGG NVFSCSVMEH

440 447
ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

при нумерации в соответствии с индексом ЕС по Кэбату, где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 примера IgG2 человека представляет собой (SEQ ID NO: 2)

```

231 240 250 260 270 280
APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD

290 300 310 320 330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA

340 350 360 370 380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE

390 400 410 420 430
WESNGQPENN YKTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME

440 447
ALHNHYTQKS LSLSPGX
при нумерации в соответствии с индексом ЕС по Кэбату, где X представляет собой
лизин (K) или отсутствует.

```

Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 примера человеческого IgG3 представляет собой (SEQ ID NO: 3)

```

231 240 250 260 270 280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD

290 300 310 320 330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

340 350 360 370 380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

390 400 410 420 430
WESSGQPENN YNTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVME

440 447
ALHNRFTQKS LSLSPGX
при нумерации в соответствии с индексом ЕС по Кэбату, где X представляет собой
лизин (K) или отсутствует.

```

Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 примера человеческого IgG4 представляет собой (SEQ ID NO: 4)

```

231 240 250 260 270 280
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

290 300 310 320 330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

340 350 360 370 380
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

390 400 410 420 430
WESNGQPENN YKTPPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME

440 447
ALHNHYTQKS LSLSLGX
при нумерации в соответствии с индексом ЕС по Кэбату, где X представляет собой
лизин (K) или отсутствует.

```

На протяжении настоящей заявки нумерация остатков в константной области тяжелой цепи IgG представляет собой нумерацию согласно индексу ЕС в соответствии с Кэбатом (Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL Interest, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991) ("Kabat"), где указанный источник специально включен в настоящую заявку посредством ссылки. Термин "индекс ЕС по Кэбату" относится к нумерации IgG1 человека по европейской системе нумерации антител. Аминокислоты из переменных доменов зрелых тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов обозначены с помощью номера положения аминокислоты в цепи. Кэбат описал множество аминокислотных последовательностей антител, идентифицировал консенсусные аминокислотные последовательности для каждой подгруппы и присвоил каждой аминокислоте номер остатка. CDR идентифицированы, как определено по Кэбату (следует понимать, что CDR_{H1} начинается на пять остатков раньше в соответствии с нумерацией Чотия (Chothia, C. & Lesk, A. M. ((1987) "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins" J. Mol. Biol. 196:901-917). Схема нумерации по Кэбату распространяется на антитела, не включенные в перечень перечисленных им антител, путем выравнивания интересующего антитела с одной из консенсусных последовательностей по Кэбату со ссылкой на консервативные аминокислоты. Указанный способ присвоения остаткам номеров стал стандартным в данной области техники и позволяет легко идентифицировать аминокислоты в эквивалентных положениях в различных антителах, включая гибридные или гуманизированные варианты. Например, аминокислота в положении 50 легкой цепи антитела человека занимает положение, эквивалентное аминокислоте в положении 50 легкой цепи антитела мыши.

Полиморфизмы были обнаружены в нескольких различных положениях в пределах константных областей антитела (например, положениях в Fc-фрагменте, включая, но не ограничиваясь положениями 270, 272, 312, 315, 356 и 358 при нумерации в соответствии с индексом ЕС по Кэбату) и, таким образом, могут быть небольшие различия между представленной последовательностью и последовательностями согласно предшествующему уровню техники. Полиморфные формы иммуноглобулинов человека были хорошо охарактеризованы. В настоящее время известно 18 Gm-аллотипов: G1m (1, 2, 3, 17) или G1m (a,

x, f, z), G2m (23) или G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) или G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et al., "The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation:" Pergamon, Oxford, стр. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Специально предполагается, что антитела согласно настоящему изобретению могут включать любой аллотип, изоаллотип или гаплотип любого гена иммуноглобулина и не ограничиваются аллотипом, изоаллотипом или гаплотипом последовательностей, представленных в настоящей заявке. Более того, в некоторых экспрессионных системах С-концевой аминокислотный остаток (выделенный жирным шрифтом выше) домена CH3 может удаляться посттрансляционно. Таким образом, С-концевой остаток домена CH3 является необязательным аминокислотным остатком в биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулах согласно изобретению. Настоящее изобретение специально включает биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы с отсутствием С-концевого остатка CH3-домена. Также настоящее изобретение специально включает такие конструкции, которые содержат С-концевой остаток, представляющий собой лизин, домена CH3.

Как указано выше, Fc-фрагмент природных антител IgG способен связываться с клеточными Fc-гамма рецепторами (FcγR). Такое связывание приводит к передаче иммунной системе активирующих или ингибирующих сигналов. Способность такого связывания стимулировать диаметрально противоположные функции отражает структурные различия разных FcγR и, в частности, указывает на то, содержит связанный FcγR иммунорецепторный активирующий мотив на основе тирозина (ITAM) или иммунорецепторный ингибирующий мотив на основе тирозина (ITIM). Привлечение различных цитоплазматических ферментов к указанным структурам определяет результат FcγR-опосредованных клеточных ответов. ITAM-содержащие FcγR включают FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIA и активируют иммунную систему при связывании с Fc-фрагментом. FcγRIIB представляет собой единственный известный на сегодня природный ITIM-содержащий FcγR; он действует таким образом, чтобы ослаблять или подавлять иммунную систему при связывании с Fc-фрагментом. Нейтрофилы человека экспрессируют ген FcγRIIA. Кластеризация FcγRIIA путем образования иммунного комплекса или поперечного связывания специфичных антител служит для агрегации ITAM со связанными с рецептором киназами, которые облегчают фосфорилирование ITAM. Фосфорилированный ITAM служит в качестве докин-сайта для Сук-киназы, активация которой приводит к активации последующих субстратов (например, PI3K). Клеточная активация приводит к высвобождению провоспалительных медиаторов. Ген FcγRIIB экспрессируется в В-лимфоцитах; его внеклеточный домен на 96% идентичен FcγRIIA и неотличимым от него образом связывается с комплексами IgG. Наличие ITIM в цитоплазматическом домене FcγRIIB определяет этот ингибиторный подкласс FcγR. Недавно была установлена молекулярная основа описанного ингибирования. При ко-лигировании с активирующим FcγR мотив ITIM рецептора FcγRIIB фосфорилируется и привлекает SH2-домен инозитолполифосфат-5'-фосфатазы (SHIP), которая гидролизует фосфоинозитоловые мессенджеры, высвобождающиеся в результате активации тирозинкиназы, опосредуемый ITAM-соединением FcγR, что в результате предотвращает вход внутриклеточного Ca⁺⁺. Таким образом, поперечное связывание FcγRIIB гасит активирующий ответ на лигирование FcγR и подавляет клеточную чувствительность. Таким образом, прекращается активация и пролиферация В-клеток и секреция ими антигенов.

Биспецифичные антитела, мультиспецифичные диатела и диатела DART®.

Способность антитела связываться с эпитопом антигена зависит от присутствия и аминокислотной последовательности VL- и VH-доменов антитела. В результате взаимодействия легкой и тяжелой цепи антитела и, в частности, взаимодействия его VL- и VH-доменов, образуется один из двух сайтов связывания эпитопа природного антитела, такого как IgG. Природные антитела способны связываться только с одним видом эпитопа (т.е. они являются моноспецифичными), несмотря на то что они могут связываться со множеством копий эпитопов данного вида (т.е. проявляют бивалентность или мультвалентность).

Домены связывания антител и биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению связываются с эпитопами "иммунноспецифичным" образом. В настоящей заявке указано, что антитело, диатело или другая связывающая эпитоп молекула "иммунноспецифично" связываться с участком другой молекулы (т.е. эпитопом), если она реагирует или связывается чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с указанным эпитопом по сравнению с альтернативными эпитопами. Например, антитело, которое иммунноспецифично связывается с вирусным эпитопом, представляет собой антитело, которое связывается с данным вирусным эпитопом с большей аффинностью, авидностью, с большей скоростью и/или с большей продолжительностью по сравнению с иммунноспецифичным связыванием с другими вирусными эпитопами или невирусными эпитопами. При встрече указанного определения также необходимо понимать, что, например, антитело (или фрагмент или эпитоп), которое иммунноспецифично связывается с первой мишенью, может или не может специфично или предпочтительно связываться со второй мишенью. В связи с этим "иммунноспецифичное связывание" не обязательно требует исключительного связывания (несмотря на то, что может включать исключительное связывание). В целом, ссылка на связывание относится (но не обязательно) к "иммунноспецифичному" связыванию. Указано, что две молекулы способны связываться друг с другом с

"физиологической специфичностью", если такое связывание характеризуется специфичностью, с которой рецепторы связываются с их соответствующими лигандами.

Один аспект согласно настоящему изобретению основан на знании того, что функциональную активность антител можно повышать путем создания мультиспецифичных молекул на основе антител, которые могут одновременно связываться с одним или более эпитопами (эпитопом) PD-1, а также одним или более эпитопами (эпитопом) CTLA-4. Для молекул, содержащих более одного сайта связывания эпитопа, иммуноспецифичного в отношении эпитопа PD-1, указанные эпитопы могут быть идентичны друг другу, перекрываться или быть отдельными друг от друга; связывание с одним таким эпитопом может конкурировать или не конкурировать со связыванием с другими такими эпитопами. Аналогично, для молекул, содержащих более одного сайта связывания эпитопа, иммуноспецифичного в отношении эпитопа CTLA-4, такие эпитопы могут быть идентичны друг другу, перекрываться или быть отдельными друг от друга; связывание с одним таким эпитопом может конкурировать или не конкурировать со связыванием со вторым таким эпитопом. Специально предусмотрено, что указанные характеристики можно независимо изменять с получением биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул, которые, например, обладают:

- (1) способностью связываться с двумя идентичными эпитопами PD-1 и с:
 - (a) двумя идентичными эпитопами CTLA-4; или
 - (b) двумя перекрывающимися эпитопами CTLA-4; или
 - (c) двумя отдельными эпитопами CTLA-4;
 или
- (2) способностью связываться с двумя перекрывающимися эпитопами PD-1 и с:
 - (a) двумя идентичными эпитопами CTLA-4; или
 - (b) двумя перекрывающимися эпитопами CTLA-4; или
 - (c) двумя отдельными эпитопами CTLA-4;
 или
- (3) способностью связываться с двумя отдельными эпитопами PD-1 и с:
 - (a) двумя идентичными эпитопами CTLA-4; или
 - (b) двумя перекрывающимися эпитопами CTLA-4; или
 - (c) двумя отдельными эпитопами CTLA-4.

Для получения молекул, обладающих более высокой способностью связывания по сравнению с природными антителами, было разработано большое количество различных рекомбинантных биспецифичных антител (см. например, международные публикации согласно РСТ № WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), в большинстве из которых используются линкерные пептиды для слияния дополнительного эпитопсвязывающего фрагмента (например, scFv, VL, VH и т.д.) с антителом или для слияния в пределах его каркасной структуры (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) или для слияния нескольких связывающих эпитоп фрагментов (например, два Fab фрагмента или scFv). В альтернативных формах используются линкерные пептиды для слияния эпитопсвязывающего фрагмента (например, scFv, VL, VH и т.д.) с доменом димеризации, таким как домены CH2-CH3 или альтернативные полипептиды (WO 2005/070966, WO 2006/107786A WO 2006/107617A, WO 2007/046893). Публикации согласно РСТ № WO 2013/174873, WO 2011/133886 и WO 2010/136172 описывают трехспецифичное антитело, в котором домены CL и CH1 были перемещены из соответствующих природных положений, и домены VL и VH были изменены (WO 2008/027236; WO 2010/108127) таким образом, чтобы обеспечить возможность связывания указанного антитела с более чем одним антигеном. Публикации РСТ № WO 2013/163427 и WO 2013/119903 описывают модификацию домена CH2 таким образом, чтобы он содержал аддукт гибридного белка, имеющий домен связывания. Публикации РСТ № WO 2010/028797, WO2010028796 и WO 2010/028795 описывают рекомбинантные антитела, Fc-фрагменты которых были заменены на дополнительные VL- и VH-домены таким образом, чтобы образовывались тривалентные связывающие молекулы. Публикации согласно РСТ № WO 2003/025018 и WO2003012069 описывают рекомбинантные диатела, отдельные цепи которых содержат scFv-домены. Международная публикация согласно РСТ № WO 2013/006544 описывает мультивалентные Fab-молекулы, синтезированные в виде единственной полипептидной цепи и затем подвергнутые протеолизу с получением гетеродимерных структур. Публикации согласно РСТ № WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 и WO 1991/003493 описывают добавление дополнительных доменов связывания или функциональных групп к антителу или к части антитела (например, добавление диатела к легкой цепи антитела, или добавление дополнительных доменов VL и VH к легким или тяжелым цепям антитела, или добавление гетерологичного гибридного белка, или сцепление нескольких Fab-доменов друг с другом).

В уровне техники также описана возможность получать диатела, которые отличаются от таких природных антител способностью связываться с двумя или большим числом различных эпитопов (т.е. проявляющие биспецифичность или мультиспецифичность помимо бивалентности или мультивалентности) (см. например, Holliger et al. (1993) "Diabodies": Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", Proc.

Natl. Acad. Sci. (США) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 / WO 02/02781 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20): 19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications" Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange" Protein Engineering 14(2): 1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain" Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P. A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy" Cancer Res. 69(12):4941-4944).

Основой дизайна диатела является производное антитела, известное как одноцепочечный фрагмент варибельного домена (scFv). Такие молекулы получают путем связывания варибельного домена легкой и/или тяжелой цепи с помощью короткого связывающего пептида. В публикации Bird et al. (1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins" Science 242:423-426, описан пример связывающих пептидов, которые обеспечивают связь длиной примерно 3,5 нм между карбокси-концом одного варибельного домена и аминоконцом другого варибельного домена. Были созданы и использовались линкеры с другими последовательностями (Bird et al. (1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins" Science 242:423-426). Линкеры, в свою очередь, можно модифицировать для получения дополнительных функций, таких как присоединение лекарственных средств или присоединение к твердым подложкам. Одноцепочечные варианты могут быть получены либо рекомбинантным, либо синтетическим путем. Для получения scFv синтетическим путем можно применять автоматический синтезатор. Для получения scFv рекомбинантным путем можно вводить подходящую плазмиду, содержащую полинуклеотид, который кодирует scFv, в подходящую клетку-хозяина - эукариотическую, такую как клетки дрожжей, растений, насекомых или млекопитающих, или прокариотическую, такую как E. coli. Полинуклеотиды, кодирующие целевой scFv, могут быть получены с помощью стандартных процедур, таких как лигирование полинуклеотидов. Полученный в результате scFv можно выделять с применением стандартных методов очистки белка, известных в данной области техники.

Получение биспецифичных связывающих молекул (например, не моноспецифичных диател) обеспечивает значительное преимущество по сравнению с антителами, включая, способность к "транс"-связыванию, достаточную для ко-лигирования и/или обеспечения солокализации различных клеток, которые экспрессируют разные эпитопы, и/или способность к "цис"-связыванию, достаточную для ко-лигирования и/или обеспечения солокализации различных молекул, экспрессируемых одной и той же клеткой, но не ограничиваясь перечисленным. Таким образом, существуют различные варианты применения биспецифичных связывающих молекул (например, не моноспецифичных диател), включая терапию и иммунологическую диагностику. Биспецифичность обеспечивает очень гибкие возможности в проектировании и конструировании диател для различных приложений, обеспечивая повышенную avidность к мультимерным антигенам, поперечное связывание различных антигенов и таргетированное нацеливание на конкретные типы клеток на основании присутствия обоих антигенов-мишеней. Благодаря своей повышенной валентности, низкой скорости диссоциации и быстрому всасыванию из кровотока (для диател малого размера, ~50 кДа или меньше), молекулы диател, известные в данной области техники, также показали особую применимость в области визуализации опухолей (Fitzgerald et al. (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris", Protein Eng. 10:1221).

Возможность создавать биспецифичные диатела привела к их применению для ко-лигирования двух клеток ("транс"-связывания), например, путем ко-лигирования рецепторов, присутствующих на поверхности различных клеток (например, поперечного связывания цитотоксических Т-клеток с опухолевыми клетками) (Staerz et al. (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells", Nature 314:628-631, and Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", Protein Eng. 9:299-305; Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies" Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). В качестве альтернативы или дополнительно, биспецифичные диатела можно применять для ко-лигирования молекул, таких как рецепторы и т.д., которые присутствуют на поверхности одной и той же клетки ("цис"-связывание). Ко-лигирование различных клеток и/или рецепторов можно применять для модулирования эффекторных функций и/или сигнального пути клетки иммунной системы. Однако плата за эти преимущества высока. Образование таких не моноспецифичных диател требует успешного соединения двух или более отдельных и различных полипептидов (т.е. для образования указанных не моноспецифичных диател требуется, чтобы они формировались путем гетеродимеризации полипептидных цепей различных видов), в противоположность моноспецифичным диателам, которые образуются путем гомодимеризации идентичных полипептидных цепей. Поскольку необходимо обеспечивать по меньшей мере два различных полипептида (т.е. два вида полипептидов) для образования не моноспецифичного диатела, и поскольку гомодимеризация таких полипепти-

дов приводит к получению неактивных молекул (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588), получать такие полипептиды нужно таким образом, чтобы предотвратить образование ковалентной связи между полипептидами одного вида (т.е. чтобы предотвратить гомодимеризацию) (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588). Соответственно, в уровне техники было предложено нековалентное соединение таких полипептидов (см. например, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain" Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity" J. Biol. Chem. 280(20): 19665-19672).

Однако работы в данной области техники подтвердили, что биспецифичные диатела, состоящие из нековалентно связанных полипептидов, нестабильны и легко диссоциируют с образованием нефункциональных мономеров (см. например, Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20): 19665-19672).

В процессе решения этой задачи в данной области техники был достигнут успех в разработке стабильных ковалентно связанных гетеродимерных не моноспецифичных диател, названных диателами DART® (Dual Affinity Re-Targeting Reagents, re-направленные реагенты с двойной аффинностью); см., например, публикации патентов США №2013-0295121; 2010-0174053 и 2009-0060910; публикации европейских патентов № EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 и международные публикации согласно PCT № WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538 и Sloan, D.D. et al. (2015) "Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells", PLoS Pathog. 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat. 1005233; Al Hussaini, M. et al. (2015) "Targeting CD 123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform", Blood pii: blood-2014-05-575704; Chichili, G.R. et al. (2015) "A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates" Sci. Transl. Med. 7(289):289ra82; Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma", Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold" Arthritis Rheum. 62(7): 1933-1943; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion" J. Mol. Biol. 399(3):436-449). Такие диатела содержат два или более ковалентно объединенных полипептидов и включают встраивание в каждый из используемых видов полипептидов одного или более цистеиновых остатков, создающих возможность образования дисульфидных связей и, таким образом, ковалентного связывания одной или более пар таких полипептидных цепей друг с другом. Например, было показано, что добавление цистеинового остатка к С-концу такой конструкции позволяет образовываться дисульфидной связи между задействованными полипептидными цепями, которая стабилизирует полученное в результате диатело, без воздействия на характеристики связывания диатела.

Много вариантов таких молекул описано (см. например, публикации патентов США № 2015/0175697; 2014/0255407; 2014/0099318; 2013/0295121; 2010/0174053; 2009/0060910; 2007-0004909; публикации европейских патентов № EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221; EP 1868650 и международные публикации согласно PCT № WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; WO 2006/113665) и предложено в настоящей заявке.

В данной области техники известны альтернативные конструкции для применения в случаях, когда нужна тетравалентная молекула, но Fc-фрагмент не требуется, включая, без ограничения, тетравалентные тандемные антитела, также называемые "TandAb" (см. например, публикации патентов США № 2005-0079170, 2007-0031436, 2010-0099853, 2011-020667 2013-0189263; публикации европейских патентов № EP 1078004, EP 2371866, EP 2361936 и EP 1293514; публикации согласно PCT № WO 1999/057150, WO 2003/025018 и WO 2013/013700), которые образованы путем гомодимеризации двух идентичных цепей, каждая из которых содержит домен VH1, VL2, VH2 и VL2.

IV. Предпочтительные биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы.

Один вариант реализации настоящего изобретения относится к молекулам, биспецифичным в отношении PD-1 x CTLA-4, которые способны связываться с "первым эпитопом" и "вторым эпитопом", где указанные эпитопы не идентичны друг другу. Такие биспецифичные молекулы содержат домены "VL1"/"VH1", которые способны связываться с первым эпитопом, и домены "VL2"/"VH2", которые способны связываться со вторым эпитопом. Обозначения "VL1" и "VH1" относятся, соответственно, к ва-

риабельному домену легкой цепи и вариабельному домену тяжелой цепи таких биспецифичных молекул, где указанные домены связываются с "первым" эпитопом. Аналогично, обозначения "VL2" и "VH2" относятся, соответственно, к вариабельному домену легкой цепи и вариабельному домену тяжелой цепи таких биспецифичных молекул, где указанные домены связываются со "вторым" эпитопом. Не имеет значения, обозначен ли конкретный эпитоп как первый или как второй эпитоп; такие обозначения важны только с точки зрения присутствия и ориентации доменов полипептидных цепей молекулы связывания согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации изобретения один такой эпитоп представляет собой эпитоп PD-1 человека, а другой такой эпитоп представляет собой эпитоп CTLA-4. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения биспецифичная молекула содержит более двух сайтов связывания эпитопов. Такие биспецифичные молекулы связываются по меньшей мере с одним эпитопом PD-1 и по меньшей мере одним эпитопом CTLA-4 и могут дополнительно связываться с дополнительными эпитопами PD-1 и/или дополнительными эпитопами CTLA-4.

Настоящее изобретение, в частности, относится к молекулам, биспецифичным в отношении PD-1 х CTLA-4 (например, биспецифичным антителам, биспецифичным диантителам, тривалентным связывающим молекулам и т.д.), которые содержат связывающие эпитоп фрагменты антитела, которые обеспечивают их способность координированно связываться по меньшей мере с одним эпитопом PD-1 и по меньшей мере с одним эпитопом CTLA-4. Выбор VL- и VH-доменов для полипептидных доменов таких молекул координируется таким образом, чтобы VL-домен и VH-домен одной и той же полипептидной цепи не могли образовывать сайт связывания эпитопа, способный связываться с PD-1 или с CTLA-4. Выбор указанных доменов дополнительно координируется таким образом, чтобы сборка полипептидных цепей, которые образуют указанные биспецифичные в отношении PD-1 х CTLA-4 молекулы, происходила с образованием по меньшей мере одного функционального сайта связывания антигена, специфичного в отношении по меньшей мере одного эпитопа PD-1, и по меньшей мере одного функционального сайта связывания антигена, специфичного в отношении по меньшей мере одного эпитопа CTLA-4.

Настоящее изобретение, в частности, относится к таким молекулам, биспецифичным в отношении PD-1 х CTLA-4, которые проявляют активность, превышающую указанную активность двух моноспецифичных молекул, одна из которых содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи антитела, которое связывается с PD-1, и другая из которых содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи антитела, которое связывается с CTLA-4. Примеры такой активности включают ослабление активности PD-1, ослабление активности CTLA-4, усиление активации иммунной системы, усиление эффекторной функции, усиление противоопухолевой активности. В настоящей заявке указанное ослабление активности относится к снижению на 10% или более, снижению на 20% или более, снижению на 50% или более, снижению на 80% или более или снижению на 90% или более ингибирующей активности PD-1 и/или CTLA-4 или полному устранению такой ингибирующей активности PD-1 и/или CTLA-4. В настоящей заявке указанное усиление активности относится к усилению на 10% или более, усилению на 20% или более, усилению на 50% или более, усилению на 80% или более или усилению на 90% или более стимулирующей иммунную систему активности, опосредованной или зависимой от экспрессии или присутствия PD-1 и/или CTLA-4, по сравнению с активностью, которую проявляют две моноспецифичные молекулы, одна из которых содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи антитела, которое связывается с PD-1, и другая из которых содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи антитела, которое связывается с CTLA-4. Примеры активности, приводящей к активации иммунной системы, включают, но не ограничиваются следующими: пролиферацию клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцитов, естественных клеток-киллеров (НК-клеток)), продукцию и/или высвобождение иммунными клетками цитокинов, продукцию и/или высвобождение иммунными клетками литических молекул (например, гранзима, перфорина и т.д.) и/или экспрессию иммунными клетками маркеров активации. Цитокины, которые высвобождаются при активации иммунной системы, известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются следующими: IFN γ , IL-2 и TNF α , (см. например, Janeway, C.A. et al. 2011) Immunobiology" 8th ed. Garland Science Publishing, NY; Banyer, J.L. (2000) "Cytokines in innate and adaptive immunity" Rev Immunogenet. 2:359-373). Маркеры активации, экспрессируемые иммунными клетками, известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются следующими: CD69, CD25 и CD107a (см. например, Janeway, C.A. et al. (2011) IMMUNOBIOLOGY" 8th ed. Garland Science Publishing, NY; Shipkova, M. и Wieland, E. (2012) "Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation", Clin Chim Acta 413:1338-1349).

А. Биспецифичные в отношении PD-1 х CTLA-4 антитела.

Настоящее изобретение включает биспецифичные антитела, способные одновременно связываться с PD-1 и CTLA-4. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения биспецифичное антитело, способное одновременно связываться с PD-1 и CTLA-4, получают с помощью любого из способов, описанных в международных публикациях согласно РСТ № WO 1998/002463, WO 2005/070966, WO 2006/107786 WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 2006/107617, WO 2007/046893, WO 2007/146968, WO 2008/003103, WO 2008/003116, WO 2008/027236, WO 2008/024188, WO 2009/132876, WO 2009/018386, WO 2010/028797, WO2010028796, WO 2010/028795, WO 2010/108127, WO 2010/136172,

WO 2011/086091, WO 2011/133886, WO 2012/009544, WO 2013/003652, WO 2013/070565, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2013/174873 и WO 2014/022540, каждая из которых таким образом полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

В. Биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 диатела без Fc-фрагментов.

Один вариант реализации настоящего изобретения относится к биспецифичным диателам, которые содержат и, наиболее предпочтительно, состоят из, первой полипептидной цепи и второй полипептидной цепи, последовательности которых позволяют полипептидным цепям ковалентно связываться друг с другом с образованием ковалентно связанного диатела, которое способно одновременно связываться с PD-1 и CTLA-4.

Первая полипептидная цепь такого варианта реализации биспецифичных диател содержит (в направлении от N-конца к С-концу) N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способный связываться с PD-1 или CTLA-4 (т.е. VL_{PD-1} или VL_{CTLA-4}), первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1), VH-домен моноклонального антитела, способный связываться с CTLA-4 (если указанная первая полипептидная цепь содержит VL_{PD-1}) или с PD-1 (если указанная первая полипептидная цепь содержит VL_{CTLA-4}), второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2), необязательно содержащий цистеиновый остаток, стимулирующий образование гетеродимера доменов, и С-конец (фиг. 1).

Вторая полипептидная цепь указанного варианта реализации биспецифичных диател содержит (в направлении от N-конца к С-концу) N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 или CTLA-4 (т.е. VL_{PD-1} или VL_{CTLA-4}, где VL-домен не включен в первую полипептидную цепь диатела), промежуточный спейсерный пептид (линкер 1), VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CTLA-4 (если указанная вторая полипептидная цепь содержит VL_{PD-1}) или с PD-1 (если указанная вторая полипептидная цепь содержит VL_{CTLA-4}), второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2), необязательно содержащий цистеиновый остаток, стимулирующий образование гетеродимера доменов и С-конец (фиг. 1).

VL-домен первой полипептидной цепи взаимодействует с VH-доменом второй полипептидной цепи с образованием первого функционального сайта связывания антигена, специфичного в отношении первого антигена (т.е. PD-1 или CTLA-4). Аналогично, VL-домен второй полипептидной цепи взаимодействует с VH-доменом первой полипептидной цепи с образованием второго функционального сайта связывания антигена, специфичного в отношении второго антигена (т.е. CTLA-4 или PD-1). Таким образом, выбор VL- и VH-доменов первой и второй полипептидных цепей координируют таким образом, чтобы две полипептидные цепи диатела вместе содержали VL- и VH-домены, способные связываться как с эпитопом PD-1, так и с эпитопом CTLA-4 (т.е. совместно содержали VL_{PD-1}/VH_{PD-1} и VL_{CTLA-4}/VH_{CTLA-4}).

Длина промежуточного линкерного пептида (линкер 1, который разделяет указанные VL- и VH-домены) наиболее предпочтительно выбрана таким образом, чтобы по существу или полностью предотвращать связывание VL- и VH-доменов полипептидной цепи друг с другом (например, длина промежуточного линкера составляет от 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 аминокислотных остатков). Таким образом, VL- и VH-домены первой полипептидной цепи по существу или полностью не способны связываться друг с другом. Аналогично, VL- и VH-домены второй полипептидной цепи по существу или полностью не способны связываться друг с другом. Предпочтительный промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) имеет последовательность (SEQ ID NO: 5): GGGSGGGG.

Длину и состав второго промежуточного спейсерного пептида (линкер 2) выбирают на основе выбора одного или более полипептидных доменов, способствующих указанной димеризации (т.е. "способствующих образованию гетеродимера доменов"). Обычно второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2) содержит 3-20 аминокислотных остатка. В частности, когда используемый стимулирующий образование гетеродимера доменов (домены) содержит/не содержит цистеиновый остаток, используется второй цистеинсодержащий промежуточный спейсерный пептид (линкер 2). Второй цистеинсодержащий промежуточный спейсерный пептид (линкер 2) содержит 1, 2, 3 или более цистеинов. Предпочтительный цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) имеет последовательность SEQ ID NO: 6: GGCGGG. В качестве альтернативы, Линкер 2 не содержит цистеин (например, GGG, GGGS (SEQ ID NO: 7), LGGGSG (SEQ ID NO: 8), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 9), ASTKG (SEQ ID NO: 10), LEPKSS (SEQ ID NO: 11), APSSS (SEQ ID NO: 12) и т.д.), и используется цистеинсодержащий стимулирующий образование гетеродимера доменов, как описано ниже. Необязательно, используют как цистеинсодержащий линкер 2, так и цистеинсодержащий стимулирующий образование гетеродимера доменов.

Стимулирующие образование гетеродимера домены могут представлять собой GVEPKSC (SEQ ID NO: 13), или VEPKSC (SEQ ID NO: 14), или AEPKSC (SEQ ID NO: 15) на одной полипептидной цепи и GFNRGEC (SEQ ID NO: 16) или FNRGEC (SEQ ID NO: 17) на другой полипептидной цепи (US2007/0004909).

Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения стимулирующие образование гетеродимера домены содержат тандемно повторяющиеся спиральные домены с противоположным зарядом, например, спиральные домены "E-coil" (SEQ ID NO: 18: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK), глутаматные остатки которых будут иметь отрицательный заряд при pH 7, и "K-спиральные" домены (SEQ ID NO: 19: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE), лизиновые остатки которых будут иметь положительный заряд при pH 7.

Присутствие таких заряженных доменов способствует связыванию между первым и вторым полипептидами и, таким образом, способствует образованию гетеродимера. Можно применять стимулирующие образование гетеродимера домены, которые содержат такие модификации описанных выше последовательностей E-coil и K-coil, которые обеспечивают включение одного или более цистеиновых остатков. Присутствие таких цистеиновых остатков допускает ковалентное связывание спирального домена, присутствующего на одной полипептидной цепи, с комплементарным спиральным доменом, присутствующим на другой полипептидной цепи, обеспечивая, таким образом ковалентное связывание полипептидных цепей друг с другом и повышая стабильность диатела. Примеры таких предпочтительных стимулирующих образование гетеродимера доменов, в частности, включают модифицированный домен E-coil, имеющий аминокислотную последовательность EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 20), и модифицированный домен K-coil, имеющий аминокислотную последовательность KVAACEK-KVAALK-KVAALK-KVAALK (SEQ ID NO: 21)

Как описано в международной публикации патентной заявки WO 2012/018687, для улучшения фармакокинетических свойств диател *in vivo*, диател можно модифицировать таким образом, чтобы оно содержало полипептидную часть связывающегося с сывороткой крови белка на одном или более концах указанного диатела. В наиболее предпочтительном варианте такая полипептидная часть связывающегося с сывороткой белка добавлена на С-конце диатела. Альбумин представляет собой самый распространенный белок в плазме крови, время полужизни которого у людей составляет 19 суток. Альбумин содержит несколько сайтов связывания малых молекул, которые позволяют ему нековалентно связываться с другими белками и таким образом увеличивать их время полужизни в сыворотке. Альбумин-связывающий домен 3 (ABD3) белка G штамма *Streptococcus G148* состоит из 46 аминокислотных остатков, образующих стабильную трехспиральную нить, и обладает высокой специфичностью связывания с альбумином (Johansson, M.U. et al. (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules" J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). Таким образом, особо предпочтительная полипептидная часть связывающегося с сывороткой крови белка для улучшения фармакокинетических свойств диатела *in vivo*, представляет собой альбумин-связывающий домен (ABD) из белка G стрептококка, и более предпочтительно, альбумин-связывающий домен 3 (ABD3) белка G штамма *Streptococcus G148* (SEQ ID NO: 22): LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP.

Как описано в международной публикации патентной заявки WO 2012/162068 (которая включена в настоящую заявку посредством ссылки), "деиммунизированные" варианты SEQ ID NO: 22 способны ослаблять или предотвращать связывание ГКГС класса II. По результатам комбинирования мутаций следующие далее комбинации замен считаются предпочтительными для образования такого деиммунизированного ABD: 66D/70S +71A; 66S/70S +71A; 66S/70S +79A; 64A/65A/71A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E. Варианты ABD, имеющие модификации L64A, I65A и D79A, или модификации N66S, T70S и D79A. Вариант деиммунизированного ABD, имеющего аминокислотную последовательность

LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNLID₆₆NAKS₇₀ A₇₁EGVKALIDE ILAALP (SEQ ID NO:23),

или аминокислотную последовательность

LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNLA₆₄A₆₅NNAKT VEGVKALIA₇₉E ILAALP (SEQ ID NO:24),

или аминокислотную последовательность

LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNLIS₆₆NAKS₇₀ VEGVKALIA₇₉E ILAALP (SEQ ID NO:25),

в частности, являются предпочтительными для использования в качестве такого деиммунизированного ABD и по существу проявляют связывание, соответствующее связыванию молекулы дикого типа, обеспечивая при этом ослабление связывания молекул МНС класса II. Таким образом, первая полипептидная цепь такого диатела, содержащего ABD, содержит третий линкер (линкер 3), предпочтительно расположенный со стороны С-конца по отношению к домену E-coil (или K-coil) такой полипептидной цепи таким образом, что располагается между доменом E-coil (или K-coil) и ABD (который предпочтительно представляет собой деиммунизированный ABD). Предпочтительная последовательность для такого линкера 3 представляет собой SEQ ID NO: 7: GGGS.

С. Биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 диатела, содержащие Fc-фрагменты.

Один вариант реализации настоящего изобретения относится к биспецифичным содержащим Fc-фрагмент диателам, способным одновременно связываться с PD-1 и CTLA-4. Добавление домена CH2-CH3 IgG к одной или обоим из полипептидных цепей диатела таким образом, что объединение цепей указанного диатела приводит к образованию Fc-фрагмента, повышает биологическое время полужизни и/или изменяет валентность диатела. Включение доменов CH2-CH3 IgG в обе полипептидные цепи указанного диатела позволяет образование двухцепочечного биспецифичного содержащего Fc-фрагмент диатела (фиг. 2).

В качестве альтернативы, включение доменов CH2-CH3 IgG только в одну из полипептидных цепей диатела дает возможность образования более сложного четырехцепочечного биспецифичного содержащего Fc-фрагмент диатела ((фиг. 3A-3C). На фиг. 3C показано типичное четырехцепочечное диатело,

содержащее константный домен легкой цепи (CL) и константный домен тяжелой цепи CH1, однако в качестве альтернативы можно применять фрагменты таких доменов, а также других полипептидов (см. например, (фиг. 3А и 3В, публикации патентов США № 2013-0295121; 2010-0174053 и 2009-0060910; публикации европейских патентов № EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 и международные публикации согласно PCT № WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Таким образом, например, вместо домена CH1 можно применять пептид, имеющий аминокислотную последовательность GVEPKSC (SEQ ID NO: 13), VEPKSC (SEQ ID NO: 14) или AEPKSC (SEQ ID NO: 15), полученный из шарнирного участка IgG человека, а вместо домена CL можно применять 6 С-концевых аминокислот легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека, GFNRGEC (SEQ ID NO: 16) или FNRGEC (SEQ ID NO: 17). Типичное пептид-содержащее четырехцепочечное диатело показано на фиг. 3А. В качестве альтернативы или дополнительно можно применять пептид, содержащий tandemные спиральные домены с противоположным зарядом, такие как спиральные домены "E-coil" (SEQ ID NO: 18: $\overline{\text{EVAALEK}}\text{-}\overline{\text{EVAALEK}}\text{-}\overline{\text{EVAALEK}}\text{-}\overline{\text{EVAALEK}}$ или SEQ ID NO: 19: $\overline{\text{EVAACEK}}\text{-}\overline{\text{EVAALEK}}\text{-}\overline{\text{EVAALEK}}\text{-}\overline{\text{EVAALEK}}$) и домены "K-coil" (SEQ ID NO: 20: $\overline{\text{KVAALKE}}\text{-}\overline{\text{KVAALKE}}\text{-}\overline{\text{KVAALKE}}\text{-}\overline{\text{KVAALKE}}$ или SEQ ID NO: 21: $\overline{\text{KVAACEK}}\text{-}\overline{\text{KVAALKE}}\text{-}\overline{\text{KVAALKE}}\text{-}\overline{\text{KVAALKE}}$). Пример содержащего спиральный домен четырехцепочечного диатела показан на фиг. 3В.

Биспецифичные содержащие Fc-фрагмент молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать дополнительные промежуточные спейсерные пептиды (линкеры). Такие линкеры обычно встраивают между стимулирующим образование гетеродимера доменом пептида (например, E-coil или K-coil) и доменами CH2-CH3 и/или между доменами CH2-CH3 и переменным доменом (т.е. VH или VL). Обычно дополнительные линкеры содержат 3-20 аминокислотных остатков. Линкеры, которые можно применять в биспецифичных содержащих Fc-фрагмент молекулах диатела согласно настоящему изобретению включают: GGGG (SEQ ID NO: 7), LGGGSG (SEQ ID NO: 8), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 9), ASTKG (SEQ ID NO: 10), DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 26), EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 27), LEPKSS (SEQ ID NO: 11), APSSS (SEQ ID NO: 28) и APSSSPME (SEQ ID NO: 29), LEPKSADKTHTCPPC (SEQ ID NO: 30), GGC и GGG. SEQ ID NO: 11 можно применять вместо GGG или GGC для облегчения клонирования. Кроме того, за аминокислотами GGG или SEQ ID NO: 11 может сразу следовать последовательность SEQ ID NO: 26 с образованием альтернативных линкеров: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 31) и LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 32). Биспецифичные содержащие Fc-фрагмент молекулы согласно настоящему изобретению могут включать шарнирный участок IgG в дополнение к линкеру или вместо него. Примеры шарнирных участков включают: EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 33) из IgG1, ERKCCVECP (SEQ ID NO: 34) из IgG2, ESKYGPPCP (SEQ ID NO: 35) из IgG4 и ESKYGPPCP (SEQ ID NO: 36) вариант шарнирного участка IgG4, содержащий стабилизирующую замену S228P (при нумерации в соответствии с индексом ЕС по Кэбату) для снижения скорости обмена цепей.

Как показано на фиг. 3А-3С, биспецифичные содержащие Fc-фрагмент диатела согласно изобретению могут содержать четыре различные цепи. Первая и третья полипептидные цепи такого диатела содержат три домена: (i) VL1-содержащий домен, (ii) VH2-содержащий домен, (iii) стимулирующий образование гетеродимера домен и (iv) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Вторая и четвертая полипептидные цепи содержат: (i) VL2-содержащий домен, (ii) VH1-содержащий домен и (iii) стимулирующий образование гетеродимера домен, где указанные стимулирующие образование гетеродимера домены способствуют димеризации первой/третьей полипептидных цепей со второй/четвертой полипептидными цепями. Домены VL и/или VH третьей и четвертой полипептидных цепей и домены VL и/или VH первой и второй полипептидных цепей могут быть одинаковыми или могут различаться таким образом, чтобы позволять тетравалентное связывание, которое является моноспецифичным, биспецифичным или тетраспецифичным. Обозначения "VL3" и "VH3" относятся, соответственно, к переменному домену легкой цепи и переменному домену тяжелой цепи указанного диатела, которые связываются с "третьим" эпитопом. Аналогично, обозначения "VL4" и "VH4" относятся, соответственно, к переменному домену легкой цепи и переменному домену тяжелой цепи указанного диатела, которые связываются с "четвертым" эпитопом. Общая структура полипептидных цепей типичных четырехцепочечных биспецифичных содержащих Fc-фрагмент диател согласно изобретению представлена в табл. 1.

Таблица 1		
Биспецифичная молекула	2-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	2-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
Тетраспецифичная молекула	2-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VL3-VH4-HPD-CH2-CH3-COOH
	4-я цепь	NH ₂ -VL4-VH3-HPD-COOH

HPD = стимулирующий образование гетеродимера домен.

Согласно конкретному варианту реализации изобретения диатела согласно настоящему изобретению представляют собой биспецифичные тетравалентные (т.е. обладающие четырьмя сайтами связывания эпитопа) Fc-содержащие диатела, которые состоят из четырех (общее число) полипептидных цепей

(фиг. 3А-3С). Биспецифичные тетравалентные Fc-содержащие диатела согласно изобретению содержат два сайта связывания эпитопа, обладающих иммуноспецифичностью в отношении PD-1 (которые могут быть способны связываться с одним или с разными эпитопами PD-1), и два сайта связывания эпитопа, обладающих иммуноспецифичностью в отношении CTLA-4 (которые могут быть способны связываться с одним или с разными эпитопами CTLA-4).

Согласно другому варианту реализации изобретения биспецифичные содержащие Fc-фрагмент диатела могут содержать три полипептидные цепи. Первый полипептид такого диатела содержит три домена: (i) VL1 -содержащий домен, (ii) VH2-содержащий домен и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Второй полипептид такого диатела содержит: (i) VL2-содержащий домен, (ii) VH1 -содержащий домен и (iii) домен, способствующий гетеродимеризации и образованию ковалентной связи с первой полипептидной цепью указанного диатела. Третий полипептид такого диатела содержит последовательность CH2-CH3. Таким образом, первая и вторая полипептидные цепи такого диатела соединяются вместе с образованием сайта связывания VL1/VH1, который способен связываться с первым эпитопом (т.е. PD-1 или CTLA-4), а также сайта связывания VL2/VH2, который способен связываться со вторым эпитопом (т.е. CTLA-4 или PD-1). Первый и второй полипептиды связаны друг с другом через дисульфидную связь, включающую цистеиновые остатки в соответствующих третьих доменах. Следует отметить, что первая и третья полипептидные цепи объединяются друг с другом с образованием Fc-фрагмента, который стабилизируется через дисульфидную связь. Такие биспецифичные диатела обладают повышенной активностью. На фиг. 4А и 4В показаны структуры таких диател. Такие содержащие Fc-фрагмент биспецифичные диатела могут иметь любую из двух ориентаций (табл. 2).

Таблица 2		
Первая ориентация	3-я цепь	NH ₂ -CH2-CH3-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	2-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
Вторая ориентация	3-я цепь	NH ₂ -CH2-CH3-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	2-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH

HPD = стимулирующий образование гетеродимера домен.

Согласно конкретному варианту реализации изобретения диатела согласно настоящему изобретению представляют собой биспецифичные бивалентные (т.е. содержащие два сайта связывания эпитопа) Fc-содержащие диатела, которые в общем состоят из трех полипептидных цепей (фиг. 4А-4В). Биспецифичные бивалентные Fc-содержащие диатела согласно изобретению содержат один сайт связывания эпитопа, обладающий иммуноспецифичностью в отношении PD-1, и один сайт связывания эпитопа, обладающий специфичностью в отношении CTLA-4.

Согласно другому варианту реализации изобретения биспецифичные содержащие Fc-фрагмент диатела могут в общем содержать пять полипептидных цепей. Согласно конкретному варианту реализации изобретения две из пяти полипептидных цепей имеют одинаковую аминокислотную последовательность. Первая полипептидная цепь такого диатела содержит: (i) VH1-содержащий домен, (ii) CH1-содержащий домен и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Первая полипептидная цепь может представлять собой тяжелую цепь антитела, которая содержит VH1 и константную область тяжелой цепи. Вторая и пятая полипептидные цепи такого диатела содержат: (i) VL1-содержащий домен и (ii) CL-содержащий домен. Вторая и/или пятая полипептидные цепи такого диатела могут представлять собой легкие цепи антитела, которые содержат VL1, комплементарный VH1 первой/третьей полипептидной цепи. Первая, вторая и/или пятая полипептидные цепи могут быть выделены из природного антитела. В качестве альтернативы, указанные цепи могут быть сконструированы рекомбинантным путем. Третья полипептидная цепь такого диатела содержит: (i) VH1-содержащий домен, (ii) CH1-содержащий домен, (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3, (iv) VL2-содержащий домен, (v) VH3-содержащий домен и (vi) стимулирующий образование гетеродимера домен, где указанные стимулирующие образование гетеродимера домены способствуют димеризации третьей цепи с четвертой цепью. Четвертый полипептид таких диател содержит: (i) VL3-содержащий домен, (ii) VH2-содержащий домен и (iii) домен, способствующий гетеродимеризации, и образует ковалентную связь с третьей полипептидной цепью указанного диатела.

Таким образом, первая, вторая, третья и пятая полипептидные цепи таких диател соединяются вместе с образованием двух сайтов связывания VL1/VH1, способных связываться с первым эпитопом. Третья и четвертая полипептидные цепи таких диател связываются вместе с образованием сайта связывания VL2/VH2, который способен связываться со вторым эпитопом, а также сайта связывания VL3/VH3, который способен связываться с третьим эпитопом. Первый и третий полипептиды связаны друг с другом через дисульфидную связь, включающую цистеиновые остатки в соответствующих константных областях. Следует отметить, что первая и третья полипептидные цепи объединяются друг с другом с образованием Fc-фрагмента. Такие биспецифичные диатела обладают повышенной активностью. На фиг. 5 показана структура таких диател. Следует понимать, что домены VL1/VH1, VL2/VH2 и VL3/VH3 могут

быть одинаковыми или могут различаться таким образом, чтобы позволить связывание, которое является моноспецифичным, биспецифичным или триспецифичным. Однако, как предложено в настоящей заявке, указанные домены предпочтительно выбраны таким образом, чтобы обеспечивать связывание с PD-1 и CTLA-4.

VL- и VH-домены полипептидных цепей выбраны таким образом, чтобы образовывать сайт связывания VL/VH, специфичный в отношении желаемого эпитопа. VL/VH сайты связывания, образованные путем соединения полипептидных цепей, могут быть одинаковыми или различаться таким образом, чтобы позволять тетравалентное связывание, которое является моноспецифичным, биспецифичным, триспецифичным или тетраспецифичным. В частности, VL- и VH-домены могут быть выбраны таким образом, что биспецифичное диатело может содержать два сайта связывания для первого эпитопа и два сайта связывания для второго эпитопа или три сайта связывания для первого эпитопа и один сайт связывания для второго эпитопа или два сайта связывания для первого эпитопа, один сайт связывания для второго эпитопа и один сайт связывания для третьего эпитопа (как изображено на фиг. 5). Общая структура полипептидных цепей типичных пятицепочечных содержащих Fc-фрагмент диател согласно изобретению представлена в табл. 3.

Таблица 3		
Биспецифичные молекулы (2x2)	2-я цепь	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH2-HPD-COOH
	5-я цепь	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	4-я цепь	NH ₂ -VL2-VH2-HPD-COOH
Биспецифичные молекулы (3x1)	2-я цепь	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	5-я цепь	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	4-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
Триспецифичные молекулы (2x1x1)	2-я цепь	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH3-HPD-COOH
	5-я цепь	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	4-я цепь	NH ₂ -VL3-VH2-HPD-COOH

HPD = стимулирующий образование гетеродимера домен.

Согласно конкретному варианту реализации изобретения диатела согласно настоящему изобретению представляют собой биспецифичные тетравалентные (т.е. содержащие четыре сайта связывания эпитопа) Fc-содержащие диатела, которые состоят из пяти (общее число) полипептидных цепей, содержащих два сайта связывания эпитопа, обладающих иммунноспецифичностью в отношении PD-1 (которые могут быть способны связываться с одним или с разными эпитопами PD-1) и два сайта связывания эпитопа, специфичных в отношении CTLA-4 (которые могут быть способны связываться с одним или с разными эпитопами CTLA-4). Согласно другому варианту реализации изобретения биспецифичные тетравалентные Fc-содержащие диатела согласно изобретению содержат три сайта связывания эпитопа, обладающих иммунноспецифичностью в отношении PD-1 (которые могут быть способны связываться с одним или с двумя или тремя разными эпитопами PD-1) и один сайт связывания эпитопа, специфичный в отношении CTLA-4. Согласно другому варианту реализации изобретения биспецифичные тетравалентные Fc-содержащие диатела согласно изобретению содержат один сайт связывания эпитопа, обладающий иммунноспецифичностью в отношении PD-1, и три сайта связывания эпитопа, специфичных в отношении CTLA-4 (которые могут быть способны связываться с одним или с двумя или тремя разными эпитопами CTLA-4).

D. Биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 тривалентные связывающие молекулы, содержащие Fc-фрагменты.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к биспецифичным тривалентным связывающим молекулам, содержащим Fc-фрагмент, способным одновременно связываться с эпитопом PD-1 и эпитопом, присутствующим на CTLA-4. Такие биспецифичные тривалентные связывающие молекулы содержат три сайта связывания эпитопа, два из которых представляют собой домены связывания по типу диатела, которые обеспечивают сайт связывания A и сайт связывания B, и один из которых представляет собой домен связывания по типу Fab-фрагмента (или домен связывания типа scFv), который обеспечивает сайт связывания C (см. например, (фиг. 6A-6F и заявки PCT № PCT/US15/33081 и PCT/US15/33076). Такие биспецифичные тривалентные молекулы, таким образом, содержат домены "VL1"/"VH1", которые способны связываться с первым эпитопом, домены "VL2"/"VH2", которые способны связываться со вторым эпитопом, и домены "VL3" и "VH3", которые способны связываться с "третьим" эпитопом такой тривалентной молекулы. "Домен связывания по типу диатела" представляет собой тип сайта связывания эпитопа, присутствующего на диателе и, в частности, диателе DART®, как описано выше. Каждый из "домена связывания по типу Fab" и "домена связывания по типу scFv" представляет собой сайт связывания эпитопа, которые образуются путем взаимодействия

VL-домена легкой цепи иммуноглобулина и комплементарного VH-домена тяжелой цепи иммуноглобулина. Домены связывания по типу Fab отличаются от домена связывания по типу диатела тем, что две полипептидные цепи, которые образуют домен связывания по типу Fab, содержат только один сайт связывания эпитопа, тогда как две полипептидные цепи, которые образуют домен связывания типа диатела содержат по меньшей мере два сайта связывания эпитопа. Аналогично, домены связывания по типу scFv также отличаются от домена связывания по типу диатела тем, что они содержат только один сайт связывания эпитопа. Таким образом, при использовании в настоящей заявке домены связывания по типу Fab и по типу scFv отличаются от домена связывания по типу диатела.

Обычно тривалентные связывающие молекулы согласно настоящему изобретению содержат четыре различные полипептидные цепи (см. (фиг. 6A-6B), однако молекулы могут содержать меньшее или большее количество полипептидных цепей, например, в результате слияния таких полипептидных цепей друг с другом (например, через пептидную связь) или в результате разделения таких полипептидных цепей с образованием дополнительных полипептидных цепей или в результате соединения меньшего количества или дополнительных полипептидных цепей через дисульфидные связи. (фиг. 6C-6F иллюстрируют указанный аспект настоящего изобретения при помощи схематичного изображения таких молекул, содержащих три полипептидные цепи. Как представлено на фиг. 6A-6F, тривалентные связывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут иметь альтернативные варианты ориентации, при которых домен связывания по типу диатела расположен со стороны N-конца ((фиг. 6A, 6C и 6D) или C-конца ((фиг. 6B, 6E и 6F) по отношению к Fc-фрагменту.

Согласно конкретным вариантам реализации первая полипептидная цепь таких тривалентных связывающих молекул согласно настоящему изобретению содержит: (i) VL1-содержащий домен, (ii) VH2-содержащий домен, (iii) стимулирующий образование гетеродимера домен и (iv) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Домены VL1 и VL2 расположены со стороны N-конца или со стороны C-конца по отношению к CH2-CH3-содержащему домену, как представлено в табл. 4 (см. также (фиг. 6A и 6B). Вторая полипептидная цепь таких вариантов реализации тривалентных связывающих молекул содержит: (i) VL2-содержащий домен, (ii) VH1-содержащий домен и (iii) стимулирующий образование гетеродимера домен. Третья полипептидная цепь таких вариантов реализации тривалентных связывающих молекул содержит: (i) VH3-содержащий домен, (ii) CH1-содержащий домен и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3. Третья полипептидная цепь может представлять собой тяжелую цепь антитела, которая содержит VH3 и константную область тяжелой цепи, или полипептид, который содержит указанные домены. Четвертый полипептид таких вариантов реализации содержит: (i) VL3-содержащий домен и (ii) CL-содержащий домен. Четвертые полипептидные цепи могут представлять собой легкую цепь антитела, которая содержит VL3, комплементарный VH3 третьей полипептидной цепи, или полипептид, который содержит указанные домены. Третью или четвертая полипептидная цепь может быть выделена из природных антител. В качестве альтернативы, указанные полипептидные цепи могут быть созданы рекомбинантным путем, синтетическим путем или другими способами.

Вариабельный домен легкой цепи первой и второй полипептидных цепей отделены от вариабельных доменов тяжелой цепи указанных полипептидных цепей с помощью промежуточного спейсерного пептида, длина которого слишком мала, чтобы позволить доменам VL1/VH2 (или доменам VL2/VH1) указанных цепей соединяться с образованием сайта связывания эпитопа, способного связываться либо с первым, либо со вторым эпитопом. Предпочтительный промежуточный спейсерный пептид (линкер 1), используемый для этой цели, имеет последовательность (SEQ ID NO: 5): GGGSGGGG. Другие домены тривалентных связывающих молекул могут быть разделены одним или более промежуточными спейсерными пептидами (линкерами), необязательно содержащими цистеиновый остаток. В частности, как представлено выше, такие линкеры, как правило, встроены между вариабельными доменами (т.е. VH или VL) и пептидными стимулирующими образование гетеродимера доменами (например, E-coil или K-coil) и между такими пептидными стимулирующими образование гетеродимера доменами (например, E-coil или K-coil) и доменами CH2-CH3. Пример линкеров, применимых для создания тривалентных связывающих молекул, представлены выше и также описаны в заявках согласно РСТ №: РСТ/US15/33081 и РСТ/US15/33076. Таким образом, первая и вторая полипептидные цепи такой тривалентной связывающей молекулы связываются вместе с образованием сайта связывания VL1/VH1, способного связываться с первым эпитопом, а также сайта связывания VL2/VH2, который способен связываться со вторым эпитопом. Третья и четвертая полипептидные цепи таких тривалентных связывающих молекул связываются вместе с образованием сайта связывания VL3/VH3, который способен связываться с третьим эпитопом.

Как описано выше, тривалентные связывающие молекулы согласно настоящему изобретению могут содержать три полипептида. Трехвалентные связывающие молекулы, содержащие три полипептидные цепи, можно получать путем связывания доменов четвертого полипептида, расположенных со стороны N-конца по отношению к VH3-содержащему домену третьего полипептида (например, с помощью промежуточного спейсерного пептида (линкера 4)). В качестве альтернативы, используют третью полипептидную цепь тривалентной связывающей молекулы согласно изобретению, содержащую следующие домены: (i) VL3-содержащий домен, (ii) VH3-содержащий домен и (iii) домен, содержащий последовательность CH2-CH3, где VL3 и VH3 отделены друг от друга промежуточным спейсерным пептидом, длина

которого является достаточной (составляет по меньшей мере 9 или более аминокислотных остатков) для возможности соединения указанных доменов с образованием сайта связывания эпитопа. Один предпочтительный промежуточный спейсерный пептид, который можно применять для этой цели, имеет последовательность: GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37).

Следует понимать, что домены VL1/VH1, VL2/VH2 и VL3/VH3 таких тривалентных связывающих молекул могут различаться, обеспечивая возможность связывания, которое является биспецифичным или триспецифичным. Однако, как предложено в настоящей заявке, указанные домены выбраны таким образом, чтобы обеспечивать тривалентную связывающую молекулу, способную связываться с PD-1 и CTLA-4.

В частности, VL- и VH-домены могут быть выбраны таким образом, чтобы тривалентная связывающая молекула содержала два сайта связывания PD-1 (которые могут быть способны связываться с одним эпитопом PD-1 или с разными эпитопами PD-1) и один сайт связывания CTLA-4, или один сайт связывания PD-1 и два сайта связывания CTLA-4 (которые могут быть способны связываться с одним эпитопом CTLA-4 или с разными эпитопами CTLA-4), или один сайт связывания для PD-1, один сайт связывания для CTLA-4 и один сайт связывания для третьего антигена, который не представляет собой PD-1 или CTLA-4. Общая структура полипептидных цепей типичных тривалентных связывающих молекул согласно изобретению представлена на фиг. 6A-6F и в табл. 4

Таблица 4		
Четырехцепочечная молекула 1-й вариант ориентации	2-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	2-я цепь	NH ₂ -VL3-CL-COOH
Четырехцепочечная молекула 2-й вариант ориентации	2-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	2-я цепь	NH ₂ -VL3-CL-COOH
Трехцепочечная молекула 1-й вариант ориентации	2-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH
Трехцепочечная молекула 2-й вариант ориентации	2-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1-я цепь	NH ₂ -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	3-я цепь	NH ₂ -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH

HPD = стимулирующий образование гетеродимера доменов.

Один вариант реализации настоящего изобретения относится к биспецифичным тривалентным связывающим молекулам, которые содержат два сайта связывания эпитопа для PD-1 и один сайт связывания эпитопа для CTLA-4.

Два сайта связывания эпитопа для PD-1 могут связываться с одним эпитопом или различными эпитопами. Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к биспецифичным тривалентным связывающим молекулам, которые содержат один сайт связывания эпитопа для PD-1 и два сайта связывания эпитопа для CTLA-4. Два сайта связывания эпитопа для CTLA-4 могут связываться с одним эпитопом или с разными эпитопами CTLA-4. Как описано выше, такие биспецифичные тривалентные связывающие молекулы могут содержать три, четыре, пять или более полипептидных цепей.

V. Константные домены и Fc-фрагменты.

В настоящей заявке предложены константные домены антитела, применимые для создания биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул (например, антител, диател, тривалентных связывающих молекул и т.д.) согласно изобретению.

Предпочтительный домен CL представляет собой CL-домен каппа IgG человека. Аминокислотная последовательность примера домена CL-домена каппа человека представляет собой (SEQ ID NO: 38)

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC

В качестве альтернативы, пример CL-домена представляет собой CL-домен лямбда IgG человека. Аминокислотная последовательность примера CL-домена лямбда человека представляет собой (SEQ ID NO: 39)

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA
GVETTPSKQS NKNYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP
TECS

Как предложено в настоящей заявке, биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно изобретению могут содержать Fc-фрагмент. Fc-фрагмент таких молекул согласно изобретению может относиться к любому изотипу (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). Биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно изобретению могут дополнительно содержать CH1-домен и/или шарнирный участок. CH1-домен и/или шарнирный участок при их наличии могут относиться к любому изотипу (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) и предпочтительно относятся к тому же изотипу, что и

желаемый Fc-фрагмент.

Пример CH1-домена представляет собой CH домен IgG1 человека. Аминокислотная последовательность примера CH1 домена IgG1 человека представляет собой (SEQ ID NO: 40)

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

Пример CH1-домен представляет собой CH домен IgG2 человека. Аминокислотная последовательность примера CH1 домена IgG2 человека представляет собой (SEQ ID NO: 41)

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVNHNKPS NTKVDKTV

Пример CH1-домена представляет собой домен CH1 IgG4 человека. Аминокислотная последовательность примера CH1-домена IgG4 человека представляет собой (SEQ ID NO: 42)

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHNKPS NTKVDKRV

Один пример шарнирного участка представляет собой шарнирный участок IgG1 человека. Аминокислотная последовательность примера шарнирного участка IgG1 человека представляет собой (SEQ ID NO: 33): EPKSCDKTHTCPPCP.

Другой пример шарнирного участка представляет собой шарнирный участок IgG2 человека. Аминокислотная последовательность примера шарнирного участка IgG2 человека представляет собой (SEQ ID NO: 34): ERKCCVECPSP.

Другой пример шарнирного участка представляет собой шарнирный участок IgG4 человека. Аминокислотная последовательность примера шарнирного участка IgG4 человека представляет собой (SEQ ID NO: 35): ESKYGPPCPSP. Как описано в настоящей заявке, шарнирный участок IgG4 может содержать стабилизирующую мутацию, такую как замена S228P. Пример аминокислотной последовательности стабилизированного шарнирного участка IgG4 представляет собой (SEQ ID NO: 36): ESKYGPPCPSP.

Fc-фрагмент содержащих Fc-фрагмент молекул (например, антител, диател, тривалентных молекул и т.д.) согласно настоящему изобретению может представлять собой полный Fc-фрагмент (например, полный Fc-фрагмент IgG) или только часть Fc-фрагмента. Необязательно Fc-фрагмент содержащей Fc-фрагмент молекулы согласно настоящему изобретению не содержит C-концевой аминокислотный остаток, представляющий собой лизин.

В классических иммунных реакциях взаимодействие комплексов антиген-антитело с иммунными клетками приводит к широкому спектру ответов, варьирующих от эффекторных функций, таких как зависимость от антитела цитотоксичность, дегрануляция тучных клеток и фагоцитоз, до иммуномодулирующих сигналов, таких как сигналы, регулирующие пролиферацию лимфоцитов и секрецию антител. Все из указанных взаимодействий инициируются через связывание Fc-фрагмента антитела или иммунных комплексов со специализированными рецепторами клеточной поверхности на гематопоезических клетках. Разнообразие клеточных ответов, вызываемых антителами и иммунными комплексами, является результатом структурной гетерогенности трех Fc рецепторов: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) и FcγRIII (CD16) являются активирующими рецепторами (т.е. стимулируют иммунную систему); FcγRIIB (CD32B) является ингибирующим рецептором (т.е. подавляет иммунную систему). Кроме того, взаимодействие с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) опосредует рециклирование молекул IgG из эндосом к клеточной поверхности и их высвобождение в кровь. Примеры аминокислотной последовательности IgG1 (SEQ ID NO: 1), IgG2 (SEQ ID NO: 2), IgG3 (SEQ ID NO: 3) и IgG4 (SEQ ID NO: 4) дикого типа представлены выше.

Модификация Fc-фрагмента может приводить к изменению фенотипа, например, изменению времени полужизни в сыворотке крови, изменению стабильности, изменению чувствительности к клеточным ферментам или изменению эффекторной функции. Таким образом, может быть желательно модифицировать содержащую Fc-фрагмент биспецифичную в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулу согласно настоящему изобретению для изменения ее эффекторной функции, например, для усиления эффективности такой молекулы в лечении рака. Снижение или устранение эффекторной функции является желательным в определенных случаях, например, в случае антител, механизм действия которых включает блокирование или антагонизм, но не уничтожение клеток, содержащих антиген-мишень. Повышение эффекторной функции в целом является желательным, когда действие направлено на нежелательные клетки, такие как опухолевые и чужеродные клетки, где FcγR экспрессируются на низком уровне, например, на опухолеспецифичные В-клетки с низким уровнем FcγRIIB (например, клетки неходжкинской лимфомы, CLL и лимфомы Беркитта). Молекулы согласно изобретению, обладающие такой приобретенной или измененной эффекторной функциональной активностью, применимы для лечения и/или предотвращения заболевания, расстройства или инфекции, при которых повышение эффективности эффекторной функциональной активности указанных молекул является желаемым.

Таким образом, согласно конкретным вариантам реализации Fc-фрагмент содержащих Fc-фрагмент молекул согласно настоящему изобретению может представлять собой инженерный вариант Fc-фрагмента. Несмотря на то что Fc-фрагмент биспецифичных содержащих Fc-фрагмент молекул согласно настоящему изобретению может обладать способностью связываться с одним или более Fc-рецепторами

(например, FcγR)), более предпочтительно, такой вариант Fc-фрагмента обладает измененным связыванием с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (по сравнению со связыванием, которое проявляет Fc-фрагмент дикого типа), например, имеет повышенную способность связывания с активирующим рецептором и/или имеет значительно сниженную способность или не имеет способности связываться с ингибирующим рецептором (рецепторами). Таким образом, Fc-фрагмент содержащих Fc-фрагмент молекул согласно настоящему изобретению может содержать некоторые или все из CH2 доменов и/или некоторые или все из CH3 доменов полноразмерного Fc-фрагмента или может содержать вариант последовательности CH2 и/или вариант последовательности CH3 (который может содержать, например, одну или более инсерций и/или одну или более делеций по сравнению с доменами CH2 или CH3 полноразмерного Fc-фрагмента). Такие Fc-фрагменты могут содержать не представляющие собой Fc полипептидные части или части неприродных полноразмерных Fc-фрагментов или могут иметь неестественную ориентацию доменов CH2 и/или CH3 (например: два домена CH2 или два домена CH3 или CH3 домен, связанный с доменом CH2 в направлении от N-конца к С-концу, и т.д.

Модификации Fc-фрагмента, идентифицированные как изменяющие эффекторные функции, известны в данной области техники, включая модификации, которые повышают связывание с активирующими рецепторами (например, FcγRIIA (CD16A) и снижают связывание с ингибирующими рецепторами (например, FcγRIIB (CD32B) (см. например, Stavenhagen, J.B. et al. (2007) "Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγ Receptors" Cancer Res. 57(18):8882-8890). В табл. 5 перечислены примеры одной, двух, трех, четырех и пяти замен (по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1) примеров модификаций, которые повышают связывание с активирующими рецепторами и/или снижают связывание с ингибирующими рецепторами.

Таблица 5			
Варианты предпочтительных активирующих замен Fc-фрагментов			
Варианты с одной заменой			
F243L	R292G	D270E	R292P
Y300L	P396L		
Варианты с двумя заменами			
F243L и R292P	F243L и Y300L	F243L и P396L	R292P и Y300L
D270E и P396L	R292P и V305I	P396L и Q419H	P247L и N421K
R292P и P396L	Y300L и P396L	R255L и P396L	R292P и P305I
K392T и P396L			
Варианты с тремя заменами			
F243L, P247L и N421K		P247L, D270E и N421K	
F243L, R292P и Y300L		R255L, D270E и P396L	
F243L, R292P и V305I		D270E, G316D и R416G	
F243L, R292P и P396L		D270E, K392T и P396L	
F243L, Y300L и P396L		D270E, P396L и Q419H	
V284M, R292L и K370N		R292P, Y300L и P396L	
Варианты с четырьмя заменами			
L234F, F243L, R292P и Y300L		F243L, P247L, D270E и N421K	
L234F, F243L, R292P и Y300L		F243L, R255L, D270E и P396L	
L235I, F243L, R292P и Y300L		F243L, D270E, G316D и R416G	
L235Q, F243L, R292P и Y300L		F243L, D270E, K392T и P396L	
P247L, D270E, Y300L и N421K		F243L, R292P, Y300L и P396L	
R255L, D270E, R292G и P396L		F243L, R292P, V305I и P396L	
R255L, D270E, Y300L и P396L		F243L, D270E, P396L и Q419H	
D270E, G316D, P396L и R416G			
Варианты с пятью заменами			
L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L		F243L, R292P, V305I, Y300L и P396L	
L235P, F243L, R292P, Y300L и P396L			

Примеры вариантов Fc-фрагментов IgG1 человека со сниженным связыванием с CD32B и/или повышенным связыванием с CD16A включают замены F243L, R292P, Y300L, V305I или P296L. Указанные аминокислотные замены могут присутствовать в Fc-фрагменте IgG1 человека в любой комбинации. Согласно одному варианту реализации изобретения вариант Fc-фрагмента IgG1 человека содержит замены F243L, R292P и Y300L. Согласно другому варианту реализации изобретения вариант Fc-фрагмента IgG1 человека содержит замену F243L, R292P, Y300L, V305I и P296L.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения Fc-фрагменты биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению предпочтительно обладают пониженной (или по существу не обладают) способностью связываться с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (по сравнению со связыванием, проявляемым Fc-фрагментом IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 1). Согласно конкретному варианту реализации изобретения биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению содержат Fc-фрагмент IgG, который обладает сниженной эффекторной функцией, связанной с антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ). Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения домены CH2-CH3 таких биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул содержат любую 1, 2, 3 или 4 из замен: L234A, L235A, D265A, N297Q и N297G. Согласно другому варианту реализации изобретения домены CH2-CH3 содержат замену N297Q, замену N297G, замены L234A и L235A или замену D265A, поскольку указанные мутации предотвращают связывание FcR. В качестве альтернативы, используется домен CH2-CH3 природного Fc-фрагмента, который сам по себе обладает пониженной (по

существу не обладает) способностью связывания с FcγRIIA (CD16a) и/или сниженную эффекторную функцию (по сравнению со связыванием и эффекторной функцией Fc-фрагмента IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 1)). Согласно конкретному варианту реализации изобретения биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению содержат Fc-фрагмент IgG2 (SEQ ID NO: 2) или Fc-фрагмент IgG4 (SEQ ID: NO: 4). При использовании Fc-фрагмента IgG4 настоящее изобретение также включает введение стабилизирующей мутации, такой как замена S228P в шарнирном участке, описанная выше (см. например, SEQ ID NO: 36). Поскольку замены N297G, N297Q, L234A, L235A и D265A предотвращают эффекторную функцию, указанные замены предпочтительно не используются при условиях, при которых эффекторная функция является желаемой.

Предпочтительная последовательность IgG1 для доменов CH2 и CH3 содержащих Fc-фрагмент молекул согласно настоящему изобретению с пониженной или устраненной эффекторной функцией будет содержать замены L234A/L235A (SEQ ID NO: 43)

```

APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVSVLTIVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPFENN YKTTTPFVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

где, X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Время полужизни в сыворотке крови белков, содержащих Fc-фрагменты, можно повышать путем повышения аффинности связывания Fc-фрагмента в отношении FcRn. Термин "время полужизни" при использовании в настоящей заявке означает фармакокинетическое свойство молекулы, которое представляет собой показатель среднего времени жизни молекул после их введения. Время полужизни можно выражать как время, необходимое для выведения пятидесяти процентов (50%) известного количества молекулы из организма субъекта (например, пациента, представляющего собой человека или других млекопитающих) или из его конкретного компартмента, например, при измерении в сыворотке, т.е. как время полужизни в кровеносной системе или в других тканях. В целом, повышение времени полужизни приводит к повышению среднего времени удержания (СВУ) вводимой молекулы в кровотоке.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению содержат вариант Fc-фрагмента, где указанный вариант Fc-фрагмента содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с Fc-фрагментом дикого типа, обеспечивающую указанной молекуле увеличенное время полужизни (по сравнению с молекулой, содержащей Fc-фрагмент дикого типа). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению содержат вариант Fc-фрагмента IgG, где указанный вариант Fc-фрагмента содержит увеличивающую время полужизни аминокислотную замену в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из 238, 250, 252, 254, 256, 257, 258, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435 и 436. Множество мутаций, способных увеличивать время полужизни содержащей Fc-фрагмент молекулы, известны в данной области техники и включают, например, M252Y, S254T, T256E и их комбинации. См., например, мутации, описанные в патентах США № 6,277,375, 7,083,784; 7,217,797, 8,088,376; публикациях патентов США № 2002/0147311; 2007/0148164 и международных публикациях № WO 98/23289; WO 2009/058492 и WO 2010/033279, которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы с увеличенным временем полужизни также включают молекулы, содержащие варианты Fc-фрагментов с заменами двух или более из остатков 250, 252, 254, 256, 257, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435 и 436. В частности, две или более замены выбраны из T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K и Y436I.

Согласно конкретному варианту реализации изобретения биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы содержат вариант Fc-фрагмента IgG, содержащий следующие замены:

- (A) M252Y, S254T и T256E;
- (B) M252Y и S254T;
- (C) M252Y и T256E;
- (D) T250Q и M428L;
- (E) T307Q и N434A;
- (F) A378V и N434A;
- (G) N434A и Y436I;
- (H) V308P и N434A или
- (I) K288D и H435K.

Согласно предпочтительному варианту реализации биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы содержат вариант Fc-фрагмента IgG, содержащий любую 1, 2 или 3 из замен: M252Y, S254T и T256E. Изобретение дополнительно включает биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы, содержащие вариант Fc-фрагмента, содержащий:

- (A) одну или более мутаций, которые изменяют эффекторные функции и/или FcγR; и
- (B) одну или более мутаций, которые увеличивают время полужизни в сыворотке крови.

Предпочтительная последовательность IgG1 для доменов CH2 и CH3 содержащих Fc-фрагмент молекул согласно настоящему изобретению, имеющих увеличенное время полужизни в сыворотке крови, содержит замены M252Y, S254T и T256E (SEQ ID NO: 80)

AP~~EA~~AGGPSV FLFPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
ALHNHYTQKS LSLSPGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Следует отметить, что домены CH2-CH3 последовательности SEQ ID NO: 80 содержат замены аминокислот в положениях 234 и 235 на аланин, таким образом, образованный Fc-фрагмент связывается слабее (или по существу не связывается) с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (по сравнению с указанным связыванием для Fc-фрагмента дикого типа (SEQ ID NO: 1). Изобретение также включает такие домены CH2-CH3 IgG1, которые содержат остатки аланина дикого типа, альтернативные и/или дополнительные замены, которые модифицируют эффекторную функцию и/или активность связывания Fc-фрагмента с FcγR.

Предпочтительная последовательность IgG4 для доменов CH2 и CH3 содержащих Fc-фрагмент молекул согласно настоящему изобретению с увеличенным временем полужизни в сыворотке крови содержат замены M252Y, S254T и T256E (SEQ ID NO: 81)

APEFLGGPSV FLFPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME
ALHNHYTQKS LSLSLGX

где, X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

В случае конкретных антител, диател и тривалентных связывающих молекул, у которых первая и третья полипептидные цепи, содержащие Fc-фрагмент, не являются идентичными, желательно снижать или предотвращать возникновение гомодимеризации между доменами CH2-CH3 двух первых полипептидных цепей или между доменами CH2-CH3 двух третьих полипептидных цепей. Домены CH2 и/или CH3 таких полипептидных цепей не должны быть идентичными по последовательности и предпочтительно модифицированы таким образом, чтобы способствовать объединению двух полипептидных цепей. Например, аминокислотную замену (предпочтительно, замену на аминокислоту, содержащую объемную боковую группу, образующую "выступ", например, триптофан) можно вводить в домен CH2 или CH3 таким образом, чтобы стерическое влияние предотвращало взаимодействие с модифицированным сходным образом доменом и принуждало мутантный домен спариваться с доменом, в котором была создана комплементарная или адаптивная мутация, т.е. "впадина" (например, замена на глицин). Такие наборы мутаций можно встраивать в любую пару полипептидов, содержащих домены CH2-CH3, которые образуют Fc-фрагмент, для обеспечения гетеродимеризации. Способы белковой инженерии, способствующие гетеродимеризации по сравнению с гомодимеризацией, хорошо известны в данной области техники, в частности, применительно к инженерии иммуноглобулин-подобных молекул, и включены в настоящую заявку (см. например, Ridgway et al. (1996) "'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CHS Domains For Heavy Chain Heterodimerization", Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library", J. Mol. Biol. 270: 26-35, and Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis", J. Immunol. Methods 296:95-101; каждая из которых, таким образом, полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки).

Предпочтительно "выступ" создается путем модифицирования Fc-фрагмента IgG таким образом, чтобы он содержал модификацию T366W. Предпочтительно "впадина" создается путем модифицирования Fc-фрагмента IgG таким образом, чтобы он содержал модификацию T366S, L368A и Y407V. Для облегчения очистки гомодимера содержащей "впадину" третьей полипептидной цепи от конечной биспецифичной гетеродимерной содержащей Fc-фрагмент молекулы, сайт связывания белка A содержащих "впадину" доменов CH2 и CH3 третьей полипептидной цепи предпочтительно модифицируют путем введения аминокислотной замены в положении 435 (H435R). Таким образом, гомодимер содержащей "впадину" третьей полипептидной цепи не будет связываться с белком A, тогда как биспецифичный гетеродимер будет сохранять свою способность связываться с белком A через сайт связывания белка A на первой полипептидной цепи. Согласно альтернативному варианту реализации изобретения содержащая "впадину" третья полипептидная цепь может содержать аминокислотные замены в положениях 434 и 435 (N434A/N435K).

Предпочтительная аминокислотная последовательность IgG1 для доменов CH2 и CH3 первой полипептидной цепи содержащей Fc-фрагмент молекулы согласно настоящему изобретению будет содержать "содержащую выступ" последовательность (SEQ ID NO: 44)

```

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX,

```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Предпочтительная аминокислотная последовательность IgG1 для доменов CH2 и CH3 второй полипептидной цепи содержащей Fc-фрагмент молекулы согласно настоящему изобретению, состоящей из двух полипептидных цепей (или третьей полипептидной цепи содержащей Fc-фрагмент молекулы, состоящей из трех, четырех или пяти полипептидных цепей), будет иметь "содержащую впадину" последовательность (SEQ ID NO: 45)

```

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNRYTQKS LSLSPGX

```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Следует отметить, что домены CH2-CH3 последовательностей SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 45 включают замены аминокислот в положениях 234 и 235 на аланин и, таким образом, образующийся Fc-фрагмент связывается слабее (по существу не связывается) с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (по сравнению со связыванием для Fc-фрагмента дикого типа (SEQ ID NO: 1)). Изобретение также включает такие домены CH2-CH3 IgG1, которые содержат остатки аланина дикого типа, альтернативные и/или дополнительные замены, которые модифицируют эффекторную функцию и/или активность связывания FcγR Fc-фрагмента. Изобретение также включает такие домены CH2-CH3, которые дополнительно содержат одну или более увеличивающих время полужизни аминокислотных замен. В частности, как описано выше, изобретение включает такие содержащие "впадину" и такие содержащий "выступ" домены CH2-CH3, которые дополнительно содержат M252Y/S254T/T256E.

Предпочтительная аминокислотная последовательность IgG1 для дополнительно содержащих M252Y/S254T/T256E доменов CH2 и CH3 первой полипептидной цепи содержащей Fc-фрагмент молекулы согласно настоящему изобретению будет иметь "содержащую выступ" последовательность (SEQ ID NO: 82)

```

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Предпочтительная аминокислотная последовательность IgG1 для дополнительно содержащих M252Y/S254T/T256E доменов CH2 и CH3 второй полипептидной цепи содержащей Fc-фрагмент молекулы согласно настоящему изобретению, которая содержит две полипептидные цепи (или третьей полипептидной цепи содержащей Fc-фрагмент молекулы, которая содержит три, четыре или пять полипептидных цепей) будет иметь "содержащую впадину" последовательность (SEQ ID NO: 83)

```

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNRYTQKS LSLSPGX

```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Предпочтительная аминокислотная последовательность IgG4 для содержащих M252Y/S254T/T256E доменов CH2 и CH3 первой полипептидной цепи содержащей Fc-фрагмент молекулы согласно настоящему изобретению, будет иметь "содержащую выступ" последовательность (SEQ ID NO: 84)

```

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSLGX

```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Предпочтительная аминокислотная последовательность IgG4 для содержащих M252Y/S254T/T256E доменов CH2 и CH3 второй полипептидной цепи содержащей Fc-фрагмент молекулы согласно настоящему изобретению, которая содержит две полипептидные цепи (или третьей полипептидной цепи содержащей Fc-фрагмент молекулы, которая содержит три, четыре или пять полипептидных цепей) будет иметь "содержащую впадину" последовательность (SEQ ID NO: 85)

```

APEFLGGPSV FLFPKPKDT LYTRPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLSCAYK GFYPSDIAVE
WESNGQFENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSR LTVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
ALHNRYTQKS LSLSLGX

```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

Следует отметить, что домены CH2-CH3 с последовательностью SEQ ID NO: 84 и SEQ ID NO: 85 содержат замены M252Y/S254T/T256E и, таким образом, образуют Fc-фрагмент IgG4, обеспечивающий увеличенное время полужизни в сыворотке крови. Изобретение также включает домены CH2-CH3 IgG4, которые содержат остатки M252/S254/T256 дикого типа.

Домены CH2-CH3 первой полипептидной цепи предпочтительно имеют "содержащую выступ" последовательность, такую как последовательность SEQ ID NO: 44. Однако следует понимать, что в первой полипептидной цепи можно применять "содержащие впадину" домены CH2-CH3 (например, SEQ ID NO: 45), в случае чего "содержащие выступ" домены CH2-CH3 (например, SEQ ID NO: 44) будут использоваться во второй полипептидной цепи содержащей Fc-фрагмент молекулы согласно настоящему изобретению, которая содержит две полипептидные цепи (или в третьей полипептидной цепи содержащей Fc-фрагмент молекулы, которая содержит три, четыре или пять полипептидных цепей).

Согласно другим вариантам реализации изобретение включает биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы, содержащие CH2- и/или CH3-домены, которые были сконструированы таким образом, чтобы способствовать гетеродимеризации в отличие от гомодимеризации, с использованием мутаций, известных в данной области техники, таких как мутации, описанные в международных публикациях согласно PCT № WO 2007/110205; WO 2011/143545; WO 2012/058768; WO 2013/06867, все из которых полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

VI. Способность связывания с PD-1.

Известны антитела, которые обладают иммуноспецифичностью в отношении PD-1 (см. например, заявки на патент США № 62/198,867; 62/239,559; 62/255,140, патенты США №8,008,449; 8,552,154; международные публикации патентов согласно PCT WO 2012/135408; WO 2012/145549 и WO 2013/014668). Предпочтительная способность связываться с PD-1, применимая для создания биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению, представляет собой способность связываться с непрерывной или прерывистой (например, конформационной) частью (эпитопом) PD-1 человека (CD279) и, предпочтительно, также способность связываться с молекулой PD-1 одного или более видов не человеческого происхождения, в частности, видов приматов (в особенности, таких видов приматов, как яванский макак). Дополнительные желаемые антитела могут быть получены путем выделения гибридом с секрецией антитела, вызванной применением PD-1 или его пептидного фрагмента. Типичный полипептид PD-1 человека (последовательность в NCBI NP_005009.2; включая сигнальную последовательность из 20 аминокислотных остатков, показанную подчеркнутой) и 268 аминокислотных остатков зрелого белка имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 46)

```

MQIPQAPWPFV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPTTFSPA LLVVTEGDNA
TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTQL
PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE
VPTAHPSFSP RPAGQFQTLV VGVVGGLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI
GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPPEPPVP CVPEQTEYAT
IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL

```

Предпочтительные связывающиеся с PD-1 молекулы (например, антитела), применимые для создания биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению, содержат VL- и/или VH-домены моноклонального антитела против PD-1 человека "PD-1 mAb 1" (ниволумаб, регистрационный номер CAS:946414-94-4, также известен как 5C4, BMS-936558, ONO-4538, MDX-1106 и доступен на рынке как OPDIVO® от компании Bristol-Myers Squibb); "PD-1 mAb 2" (пембролизумаб, ранее известный как ламбролизумаб), регистрационный номер CAS:1374853-91-4, также известен как МК-3475, SCH-900475 и доступен на рынке как KEYTRUDA® от компании Merck); "PD-1 mAb 3" (EH12,2H7; Dana Farber), "PD-1 mAb 4" (пидилизумаб, регистрационный номер CAS: 1036730-42-3, также известен как CT-011, CureTech) или любого из антител против PD-1 из табл. 6 и, более предпочтительно, содержат 1, 2 или все 3 из CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из CDR_H VH-домена такого моноклонального антитела против PD-1. Дополнительные антитела против PD-1, обладающие уникальными свойствами связывания, применимые в соответствии со способами и композициями согласно настоящему изобретению, были недавно идентифицированы (см. заявки на патенты США № 62/198,867; 62/239,559; 62/255,140). В частности, предпочтительными являются молекулы, связывающие PD-1, которые содержат гуманизированный VH и/или VL домен антитела против PD-1 "PD-1 mAb 5" (hPD-1 mAb 2,

MacroGenics); "PD-1 mAb 6" (hPD-1 mAb 7, MacroGenics); "PD-1 mAb 7" (hPD-1 mAb 9, MacroGenics) или "PD-1 mAb 8" (hPD-1 mAb 15, MacroGenics) и более предпочтительно содержат 1, 2 или все 3 из участков CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из участков CDR_H VH-домена указанного гуманизированного моноклонального антитела против PD-1.

A. PD-1 mAb 1.

Аминокислотная последовательность VH-домена PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO: 47) показана ниже (остатки CDR_H подчеркнуты).

QVQLVESGGG VVQPGSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV
IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND
DYWGQGLTVT VSS

Аминокислотная последовательность VL-домена PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO: 48) показана ниже (остатки CDR_L подчеркнуты).

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
 GTKVEIK

B. PD-1 mAb 2.

Аминокислотная последовательность VH-домена PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 49) показана ниже (остатки CDR_H подчеркнуты).

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG
INPSNGGTNF NEKFKNRVTI TDSSTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD
YRFDMGFYDWGQGTITVTVSS

Аминокислотная последовательность VL-домена PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 50) показана ниже (остатки CDR_L подчеркнуты).

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL
 LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL
TFGGGGTKVEIK

C. PD-1 mAb 3.

Аминокислотная последовательность VH-домена PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 51) показана ниже (остатки CDR_H подчеркнуты).

QVQLQQSGAE LAKPGASVQM SCKASGYSTF SSWIHWVKQR PGQGLEWIGY
IYPSTGFTEY NQKFKDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARWR
DSSGYHAMDY WGQGTSTVTSS

Аминокислотная последовательность VL-домена PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 52) показана ниже (остатки CDR_L подчеркнуты).

DIVLTQSPAS LTVSLGQRAT ISCRASQSVS TSGYSYMHY QQKPGQPPKL
 LIKFGSNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQHSWEIPY
TFGGGTKLEI K

D. PD-1 mAb 4.

Аминокислотная последовательность VH-домена PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO: 53) показана ниже (остатки CDR_H подчеркнуты).

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

Аминокислотная последовательность VL-домена PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO: 54) показана ниже (остатки CDR_L подчеркнуты).

EIVLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSARSSVS YMHWFQQKPG KAPKLWIYRT
SNLASGVPSR FSGSGSGTSY CLTINSLQPE DFATYYCQQR SSFPLTFGGG
 TKLEIK

E. PD-1 mAb 5.

Аминокислотная последовательность VH-домена PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO: 55) показана ниже (CDR_H остатки подчеркнуты).

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGVFVS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAV
ISSGSMSISY ADTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRTEG TALYYCASLS
DYFDYWGQGT TVTVSS

Аминокислотная последовательность VL-домена PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO: 56) показана ниже (остатки CDR_L подчеркнуты).

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HSTGNTYHLW YLQKPGQSPQ
 LLIYRVSNRF SGVPDFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQTTHVP
WTFGQGTKLE IK

F. PD-1 mAb 6.

Аминокислотная последовательность домена VH PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 57) показана ниже (остатки CDR_H подчеркнуты).

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSTF SYWMWVRQA PGQGLEW_{X1}GV
IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLTVTVSS

где X₁ представляет собой I или A.

Аминокислотная последовательность домена VL PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 58) показана ниже (остатки CDR_L подчеркнуты).

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRAX₁ESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNX₂GS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKEI K

где: X₁ представляет собой N или S и X₂ представляет собой Q или R; или
X₁ представляет собой N и X₂ представляет собой Q; или
X₁ представляет собой S и X₂ представляет собой Q; или
X₁ представляет собой S и X₂ представляет собой R.

В частности, варианты реализации аминокислотной последовательности PD-1 mAb 6 включают:

(a) SEQ ID NO: 57, где X₁ представляет собой I, и SEQ ID NO: 58, где X₁ представляет собой N и X₂ представляет собой Q; или

(b) SEQ ID NO: 57, где X₁ представляет собой I, и SEQ ID NO: 58, где X₁ представляет собой S и X₂ представляет собой Q.

Пример антитела VH-домена против PD-1, обозначенный как "PD-1 mAb 6-I VH", содержит SEQ ID NO: 57, где X₁ представляет собой I, и имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 86)

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYST SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETLW DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

Пример VL-домена против PD-1, обозначенный как "PD-1 mAb 6-SQ VL", содержит SEQ ID NO: 58, где X₁ представляет собой S и X₂ представляет собой Q, и имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 87)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKEI K

Пример антитела против PD-1, который содержит VH-домен PD-1 mAb 6-I и VL-домен PD-1 mAb 6-SQ обозначен как "PD-1 mAb 6-ISQ."

G. PD-1 mAb 7.

Аминокислотная последовательность VH-домена PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO: 59) показана ниже (CDR_H остатки подчеркнуты).

EVQLVESGGG LX₁RPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVX₂WVRQA PGKGLEWXAAT
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSX₄RAED TATYYCARYCG
FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

где: X₁ представляет собой V или A; X₂ представляет собой S или G; X₃ представляет собой V или T; X₄ представляет собой L или A; или
X₁ представляет собой V, X₂ представляет собой S, X₃ представляет собой V и X₄ представляет собой L; или
X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой G, X₃ представляет собой T и X₄ представляет собой A.

Аминокислотная последовательность VL-домена PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO: 60) показана ниже (остатки CDR_L подчеркнуты).

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY X₁YLAWYQQKPK GKAPKLLIYX₂
AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYAVPWTFGQ
GTKLEIK

где: X₁ представляет собой S или N и X₂ представляет собой N или D; или X₁ представляет собой S и X₂ представляет собой N; или
X₁ представляет собой N и X₂ представляет собой D

В частности, варианты реализации PD-1 mAb 7 включают:

(a) SEQ ID NO: 59, где X₁ представляет собой V, X₂ представляет собой S, X₃ представляет собой V и X₄ представляет собой L, и SEQ ID NO: 60, где X₁ представляет собой S и X₂ представляет собой N; или

(b) SEQ ID NO: 59, где X₁ представляет собой A, X₂ представляет собой G, X₃ представляет собой T и X₄ представляет собой A, и SEQ ID NO: 60, где X₁ представляет собой N и X₂ представляет собой D.

H. mAb против PD-1 8.

Аминокислотная последовательность VH-домена mAb против PD-1 8 (SEQ ID NO: 61) показана ниже (остатки CDR_H подчеркнуты).

EVQLVESGGG LVRPGGSLRL SCAASGFTFS SYLISWVRQA PGKGLEWVAA
ISGGGADTTY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYCARRG
TYAMDYWGQG TLVTVSS

Аминокислотная последовательность VL-домена mAb против PD-1 8 (SEQ ID NO: 62) показана ниже (остатки CDR_L подчеркнуты).

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY NYLAWYQQKPK GKAPKLLIYD
AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYAVPWTFGQ
GTKLEIK

I. Дополнительные антитела против PD-1.

Дополнительные антитела против PD-1, которые можно применять для создания биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению, представлены в табл. 6.

Таблица 6: Дополнительные антитела против PD-1	
Антитела против PD-1	Ссылка / Источник
PD1-17, PD1-28, PD1-33, PD1-35 и PD1-F2	Патенты США № 7 488 802; 7 521 051 и 8 088 905; международная патентная публикация согласно PCT WO 2004/056875
17D8; 2D3; 4H1; 5C4; 4A11; 7D3 и 5F4	Патенты США № 8 008 449; 8 779 105 и 9 084 776; международная патентная публикация согласно PCT WO 2006/121168
hPD-1,08A; hPD-1,09A; 109A; K09A; 409A; h409A11; h409A16; h409A17; кодон-оптимизированный вариант 109A и кодон-оптимизированный вариант 409A	Патенты США № 8 354 509; 8 900 587 и 5 952 136; международная патентная публикация согласно PCT WO 2008/156712
1E3; 1E8 и 1H3	Публикация патента США 2014/0044738; международная патентная публикация согласно PCT WO 2012/145493
9A2; 10B11; 6E9; APE1922; APE1923; APE1924; APE1950; APE1963 и APE2058	Международная патентная публикация согласно PCT WO 2014/179664
GA1; GA2; GB1; GB6; GH1; A2; C7; H7; SH-A4; SH-A9; RG1H10; RG1H11; RG2H7; RG2H10; RG3E12; RG4A6; RG5D9; RG1H10-H2A-22-1S; RG1H10-H2A-27-2S; RG1H10-3C; RG1H10-16C; RG1H10-17C; RG1H10-19C; RG1H10-21C и RG1H10-23C2	Публикация патента США 2014/0356363; международная патентная публикация согласно PCT WO 2014/194302
H1M7789N; H1M7799N; H1M7800N; H2M7780N; H2M7788N; H2M7790N; H2M7791N; H2M7794N; H2M7795N; H2M7796N; H2M7798N; H4H9019P; H4xH9034P2; H4xH9035P2; H4xH9037P2; H4xH9045P2; H4xH9048P2; H4H9057P2; H4H9068P2; H4xH9119P2; H4xH9120P2; H4xH9128p2; H4xH9135p2; H4xH9145p2; H4xH8992p; H4xH8999p и H4xH9008p;	Публикация патента США 2015/0203579; международная патентная публикация согласно PCT WO 2015/112800
PD-1 mAb 1; PD-1 mAb 2; mAb против hPD-1 2; PD-1 mAb 3; PD-1 mAb 4; PD-1 mAb 5; PD-1 mAb 6; PD-1 mAb 7; mAb против hPD-1 7; mAb против PD-1 8; mAb против PD-1 9; mAb против hPD-1 9; PD-1 mAb 10; PD-1 mAb 11; PD-1 mAb 12; PD-1 mAb 13; PD-1 mAb 14; PD-1 mAb 15 и mAb против hPD-1 15	Заявки на патент США №. 62/198,867 и 62/239,559

J. Пример антитела против PD-1.

Пример антитела против PD-1, обозначенный как "PD-1 mAb 6 G4P", содержит: тяжелую цепь, содержащую VH-домен PD-1 mAb 6I (SEQ ID NO: 86), CH1-домен IgG4 (SEQ ID NO: 42), стабилизированный шарнирный участок IgG 4 (SEQ ID NO: 36) и домены CH2-CH3 IgG4 без C-концевого лизина (SEQ ID NO: 4), легкую цепь, содержащую VL-домен PD-1 mAb 6SQ (SEQ ID NO: 87) и каппа-CL (SEQ ID NO: 38).

Аминокислотная последовательность целой тяжелой цепи PD-1 mAb 6 G4P (SEQ ID NO: 88) показана ниже.

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVIT TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGKTGY
TCNVNDHKPSN TKVDKRVESK YGPPCPPCPA EFLLGGPSVF LFPPKPKDTL
MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL
PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTPPVLDSD
GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLG

Аминокислотная последовательность целой легкой цепи PD-1 mAb 6 G4P (SEQ ID NO: 89) показана ниже.

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFLTITIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKEVI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

VII. Способность связывания с CTLA-4.

Известны антитела, обладающие иммунносцифичностью в отношении CTLA-4 (см. например, патенты США № 6,984,720; 6,682,736; 7,034,121; 7,109,003; 7,132,281; 7,411,057; 7,605,238; 7,807,797; 7,824,679; 8,017,114; 8,143,379; 8,318,916; 8,491,895; 8,784,815 и 8,883,984; публикации патентов США 2009/0123477; 2009/0252741 и 2014/0105914; международные публикации патентов согласно PCT № WO 00/37504; WO 01/14424; WO 01/54732; WO 2006/029219; WO 2006/066568 и WO 2012/120125 и табл. 7). Предпочтительно способность связывания с CTLA-4, применимая для создания биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению, представляет собой способность связываться с непрерывной или прерывистой (например, конформационной) частью (эпитопом) CTLA-4 человека и предпочтительно также включает способность связываться с молекулами CTLA-4 одного или более видов не человеческого происхождения, в частности, видов приматов (и, в частности, таких видов приматов, как яванский макак). Дополнительные желаемые антитела могут быть созданы путем выделения секретирующих антитела гибридом, стимулированных с помощью CTLA-4 или его пептидного

фрагмента. Типичный полипептид CTLA-4 человека (последовательность NCBI NP_005205,2; включая сигнальную последовательность из 35 аминокислотных остатков (показана подчеркнутой) и 188 аминокислотных остатков зрелого белка) имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 75)

MACLGFORHK AQLNLATRTW PCTLLFFLLF IPVFCKAMHV AQPAVVLASS
RGIASFVCEY ASPGKATEVR VTVLRQADSQ VTEVCAATYM MGNELTFLDD
SICTGTSSGN QVNLTIQGLR AMDTGLYICK VELMYPPPPY LGIGNGTQIY
VIDPEPCPDS DFLLWILAAV SSGLFFYSFL LTAVSLSKML KKRSPLTGTG
YVKMPPTPE CEKQFPYFI PIN

Предпочтительные связывающие с CTLA-4 молекулы (например, антитела), применимые для создания биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению, содержат VL- и/или VH-домены моноклональных антител против CTLA-4 человека "mAb CTLA-4 1" (ипили-мумаб, регистрационный номер CAS: 477202-00-9, также известный как MDX010 и доступный на рынке как YERVOY® от компании Bristol-Myers Squibb); "mAb CTLA-4 2" (тремелимумаб, регистрационный номер CAS: 745013-59-6, также известный как CP-675206); "mAb CTLA-4 3" (4B6, как представлено в табл. 7) или любого из других антител против CTLA-4 из табл. 7 и, более предпочтительно, содержат 1, 2 или все 3 из CDR_L VL-домена и/или 1, 2 или все 3 из CDRH VH-домена таких моноклональных антител против CTLA-4.

A. CTLA-4 mAb 1.

Аминокислотная последовательность антитела против VH-домена CTLA-4 mAb 1 (SEQ ID NO: 76) показана ниже (остатки CDR_H подчеркнуты).

QVQLVESGGG VVQPGRLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF
ISYDGNKKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG
WLGPFFDYWGQ GTLVTVSS

Аминокислотная последовательность VL-домена mAb против CTLA-4 (SEQ ID NO: 77) показана ниже (остатки CDR_L подчеркнуты).

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY
GAFSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
QGTKVEIK

B. CTLA-4 mAb 2.

Аминокислотная последовательность VH-домена mAb2 против CTLA-4 (SEQ ID NO: 78) показана ниже (остатки CDRH подчеркнуты).

QVQLVESGGG VVQPGRLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV
IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP
RGATLYYYYY GMDVWGQGT VTVSS

Аминокислотная последовательность VL-домена mAb2 против CTLA-4 (SEQ ID NO: 79) показана ниже (остатки CDR_L подчеркнуты).

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIN SYLDWYQQK GKAPKLLIYA
ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQ YYSTPFTFG
GTKVEIK

C. CTLA-4 mAb 3.

Аминокислотная последовательность VH-домена mAb3 против CTLA-4 (SEQ ID NO: 90) показана ниже (остатки CDR_H подчеркнуты).

QVQLVESGGG VVQPGRLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF
ISYDGSNKHY ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG
WLGPFFDYWGQ GTLVTVSS

Аминокислотная последовательность VL-домена mAb3 против CTLA-4 (SEQ ID NO: 91) показана ниже (остатки CDR_L подчеркнуты).

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY
GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
QGTKVEIK

D. Дополнительные антитела против CTLA-4.

Дополнительные антитела против CTLA-4, которые можно применять для создания биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению, представлены в табл. 7.

Таблица 7: Дополнительные антитела против CTLA-4	
Антитела против CTLA-4	Ссылка / Источник
mAb 26	Патент США № 7 034 121; международная патентная публикация согласно PCT WO 01/54732
10D1; 1E2 и 4B6	Патенты США № 6 984 720; 7 605 238; 8 017 114; 8 318 916 и 8 784 815; международная патентная публикация согласно PCT WO 01/14424
2.1.3; 3.1.1; 4.1.1; 4.8.1; 4.9.1; 4.10.2; 4.13.1; 4.14.3; 6.1.1; 11.2.1; 11.6.1; 11.7.1; 12.2.1; 12.3.1; 12.3.1.1; 12.9.1 и 12.9.1.1	Патенты США № 6 682 736; 7 109 003; 7 132 281; 7 411 057; 7 807 797; 7 824 679; 8 143 379; 8 491 895 и 8 883 984; международная патентная публикация согласно PCT WO 00/37504
3B10; 8H5; 8H5-1B1; 3B10-4F7; 7B9-1A3; 2C7-1G10; 3B10-6E3 и 8H5-1A1	Публикация патента США 2014/0105914; международная патентная публикация согласно PCT WO 2012/120125
3.7F10A2; 4.3F6B5; 4.4A7F4; 4.6C1E3; 4.7A8H8; 4.7E11F1; 4.8H10H5; TGN2122 и TGN2422	Публикация патента США 2009/0123477; международная патентная публикация согласно PCT WO 2006/066568
L3D10; L1B11; K4G4; KM10 и YL2	Публикация патента США 2009/0252741; международная патентная публикация согласно PCT WO 2006/029219

Е. Примеры антител против CTLA-4.

Пример антитела против CTLA-4, обозначенный как "CTLA-4 mAb 3 G1AA" содержит тяжелую цепь, содержащую VH-домен CTLA-4 mAb 3 (SEQ ID NO: 90), CH1-домен IgG1 (SEQ ID NO: 40), шарнирную область IgG1 (SEQ ID NO: 33) и домены CH2-CH3 IgG1 с заменами L234A/L235A (SEQ ID NO: 43).

Аминокислотная последовательность целой тяжелой цепи CTLA-4 mAb 3 G1AA (SEQ ID NO: 92) показана ниже.

```
QVQLVESGGG VVQPGKSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF
ISYDGSNKHY ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG
WLGPFDFYWGQ GTLTVVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNT KVDKRVPEKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD
TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD
SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
```

Пример альтернативного антитела против CTLA-4, обозначенного как "CTLA-4 mAb 3 G4P", содержит тяжелую цепь, содержащую VH-домен CTLA-4 mAb 3 (SEQ ID NO: 90), CH1-домен IgG4 (SEQ ID NO: 42), стабилизированную шарнирную область IgG4 (SEQ ID NO: 36) и домены CH2-CH3 IgG4 без С-концевого лизина (SEQ ID NO: 4). Аминокислотная последовательность целой тяжелой цепи CTLA-4 mAb 3 G4P показана ниже (SEQ ID NO: 93).

```
QVQLVESGGG VVQPGKSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF
ISYDGSNKHY ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG
WLGPFDFYWGQ GTLTVVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY
FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPCCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM
ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV
VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF
PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG
SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSL SLSLSPGK
```

Аминокислотная последовательность целой легкой цепи CTLA-4 mAb 3 G1AA и CTLA-4 mAb 3 G4P (SEQ ID NO: 94) показана ниже.

```
EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY
GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
QGTEKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNMF YPREAKVQWK
VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTL TSKADYEKH KVAACEVTHQ
GLSSPVTKSF NRGEK
```

Оба из примеров антител против CTLA-4, CTLA-4 mAb 3 G1AA и CTLA-4 mAb 3 G4P, содержат легкую цепь, содержащую VL-домен CTLA-4 mAb 3 (SEQ ID NO: 91) и CL каппа (SEQ ID NO: 38).

VIII. Примеры биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул.

А. Примеры четырехцепочечных, содержащих Fc-фрагмент диател, имеющих домены E/K-coil.

Создавали три примера биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 четырехцепочечных содержащих Fc-фрагмент диател, имеющих домены E/K-coil, способствующие образованию гетеродимера (обозначенные как "DART B", "DART C" и "DART D"). Структура указанных содержащих Fc-фрагмент диател подробно описана ниже. Предполагается, что указанные примеры биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 диател иллюстрируют настоящее изобретение и никоим образом не ограничивают его объем.

1. DART B.

DART B представляет собой биспецифичное четырехцепочечное содержащее Fc-фрагмент диатело, содержащее два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, два сайта связывания, специфичных в отношении CTLA-4, вариант Fc-фрагмента IgG4, сконструированный для увеличения времени полужизни, и домены E/K-coil, способствующие образованию гетеродимера. Первая и третья полипептидные цепи DART B содержат (в направлении от N-конца к С-концу): N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CTLA-4 (VL_{CTLA-4} CTLA-4 mAb 1 VL) (SEQ ID NO: 77); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)); VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH_{PD-1} PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO: 86); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 6)); цистеинсодержащий домен, способствующий образованию гетеродимера (E-coil) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 20)); стабилизированную шарнирную область IgG4 (SEQ ID NO: 36); вариант домена CH2-CH3 IgG4, содержащий замены M252Y/S254T/T256E и не содержащий С-концевой остаток (SEQ ID NO: 81), и С-конец.

Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей DART В представляет собой (SEQ ID NO: 95)

```
EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY
GAFSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
QGTEVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCA SGYSFTSYWM
NWVRQAPGG LEWIGVIHPS DSETWLDQKF KDRVITITVDK STSTAYMELS
SLRSEDVAV YCAREHYGTS PFAYWGQGT VTVSSGGCGG GEVAACEKEV
AALEKEVAAL EKEVAALEKE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD
TLYITREPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPPVL
SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG
```

Вторая и четвертая полипептидные цепи DART В содержат (в направлении от N-конца к C-концу): N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL_{PD-1} PD-1 mAb 6-SQ VL) (SEQ ID NO: 87); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)); VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CTLA-4 (VHCTLA-4 CTLA-4 mAb 1 VH) (SEQ ID NO: 76); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 6)); цистеинсодержащий способствующий образованию гетеродимера домен (K-coil) (KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 21) и C-конец.

Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей DART В представляет собой (SEQ ID NO: 96)

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTEVEI KGGSGGGGGQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
YTMHWVRQAP GKGLEWVTFI SYDGNKYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
QMNSLRAEDT AIYYCARTGW LGPFYDWGQG TLVTVSSGGG GGGKVAACEK
KVAALKEKVA ALKEKVAALK E
```

2. DART C.

DART C представляет собой биспецифичное четырехцепочечное содержащее Fc-фрагмент диатела, которое содержит два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, два сайта связывания, специфичных в отношении CTLA-4, вариант Fc-фрагмента IgG4, сконструированный для увеличения времени полужизни, и домены E/K-coil, способствующие образованию гетеродимера. Первая и третья полипептидные цепи DART C содержат (в направлении от N-конца к C-концу): N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CTLA-4 (VLCTLA-4 CTLA-4 mAb 3 VL) (SEQ ID NO: 91); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)); VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH_{PD-1} PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO: 86); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 6)); цистеинсодержащий домен, способствующий образованию гетеродимера (E-coil) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 20)); стабилизированную шарнирную область IgG4 (SEQ ID NO: 36); вариант домена CH2-CH3 IgG4, содержащий замены M252Y/S254T/T256E и не содержащий C-концевой остаток (SEQ ID NO: 81); и C-конец.

Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей DART C представляет собой (SEQ ID NO: 97)

```
EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY
GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
QGTEVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCA SGYSFTSYWM
NWVRQAPGG LEWIGVIHPS DSETWLDQKF KDRVITITVDK STSTAYMELS
SLRSEDVAV YCAREHYGTS PFAYWGQGT VTVSSGGCGG GEVAACEKEV
AALEKEVAAL EKEVAALEKE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD
TLYITREPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPPVL
SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG
```

Вторая и четвертая полипептидные цепи DART C содержат (в направлении от N-конца к C-концу): N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL_{PD-1} PD-1 mAb 6-SQ VL) (SEQ ID NO: 87); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)); VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CTLA-4 (VHCTLA-4 CTLA-4 mAb 3 VH) (SEQ ID NO: 90); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 6)); цистеинсодержащий способствующий образованию гетеродимера домен (K-coil) (KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 21) и C-конец.

Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей DART C представляет собой (SEQ ID NO: 98)

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSTRFSGSG SGTDFLTITIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKEVEI KGGSGGGGGQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
YTMHWVRQAP GKGLEWVTFI SYDGSNKHYA DSVKGRFTVS RDNSKNTLYL
QMNSLRAEDT AIYYCARTGW LGPFYDWGQG TLVTVSSGGC GGGKVAACKE
KVAALKEKVA ALKEKVAALK E
```

3. DART D.

DART D представляет собой биспецифичное четырехцепочечное содержимое Fc-фрагмент диателло, которое содержит два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, два сайта связывания, специфичных в отношении CTLA-4, вариант Fc-фрагмента IgG4, сконструированный для увеличения времени полужизни, и домены E/K-coil, способствующие образованию гетеродимера. Первая и третья полипептидные цепи DART D содержат (в направлении от N-конца к C-концу): N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL_{PD-1} PD-1 mAb 6-SQ VL) (SEQ ID NO: 87); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)); VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CTLA-4 (VH_{CTLA-4} CTLA-4 mAb 3 VH) (SEQ ID NO: 90); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 6)); цистеинсодержащий домен, способствующий образованию гетеродимера (E-coil) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 20)); стабилизированную шарнирную область IgG4 (SEQ ID NO: 36); вариант домена CH2-CH3 IgG4, содержащий замены M252Y/S254T/T256E и не содержащий C-концевой остаток (SEQ ID NO: 81); и C-конец.

Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей DART D представляет собой (SEQ ID NO: 99)

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSTRFSGSG SGTDFLTITIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKEVEI KGGSGGGGGQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
YTMHWVRQAP GKGLEWVTFI SYDGSNKHYA DSVKGRFTVS RDNSKNTLYL
QMNSLRAEDT AIYYCARTGW LGPFYDWGQG TLVTVSSGGC GGGEVAACEK
EVAALEKEVA ALEKEVALE KESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP
KDTLYITREP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV
LDSGGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLG
```

Вторая и четвертая полипептидные цепи DART D содержат (в направлении от N-конца к C-концу): N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CTLA-4 (VLCTLA-4 CTLA-4 mAb 3 VL) (SEQ ID NO: 91); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)); VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VHPD-1 PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO: 86); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 6)); цистеинсодержащий способствующий образованию гетеродимера домен (K-coil) (KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 21) и C-конец.

Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей DART D представляет собой (SEQ ID NO: 100)

```
EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY
GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCA SGYSFTSYWM
NWRQAPGQG LEWIGVIHPS DSETWLDQKF KDRVTITVDK STSTAYMELS
SLRSEDNAVY YCAREHYGTS PFAYWGQGTI VTVSSGGCGG GKVAACEKEK
AALKEKVAAL KEKVAALKE
```

4. DART F.

DART F представляет собой биспецифичное четырехцепочечное содержащее Fc-фрагмент диателло, которое содержит два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, два сайта связывания, специфичных в отношении CTLA-4, вариант Fc-фрагмента IgG1, сконструированный для снижения/устранения эффекторной функции и для увеличения времени полужизни, и домены E/K-coil, способствующие образованию гетеродимера. Первая и третья полипептидные цепи DART F содержат (в направлении от N-конца к C-концу): N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL_{PD-1} PD-1 mAb 6-SQ VL) (SEQ ID NO: 87); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)); VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CTLA-4 (VH_{CTLA-4} CTLA-4 mAb 3 VH) (SEQ ID NO: 90); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 6)); цистеинсодержащий домен, способствующий образованию гетеродимера (E-coil) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 20)); линкер (SEQ ID NO: 30); вариант домена CH2-CH3 IgG1, содержащий замены L235A/L235A/M252Y/S254T/T256E и не содержащий C-концевой остаток (SEQ ID NO: 80); и C-конец.

Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей DART F (SEQ ID NO: 101) представляет собой

```

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSPRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKEI KGGGSGGGGQ VQLVESGGGV VQPGRLRLS CAASGFTFSS
YTMHWVRQAP GKGLEWVTFI SYDGSNKHYA DSVKGRFTVS RDNSKNTLYL
QMNSLRAEDT AIYYCARTGW LGPFYDWQG TLVTVSSGGC GGGEVAACEK
EVAALEKEVA ALEKEVAALE KLEPKSADKT HTCPCCPAPE AAGGPSVFLF
PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
SPG

```

Вторая и четвертая полипептидные цепи DART F содержат (в направлении от N-конца к С-концу): N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CTLA-4 (VL_{CTLA-4} CTLA-4 mAb 3 VL) (SEQ ID NO: 91); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)); VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH_{PD-1} PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO: 86); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 6)); цистеинсодержащий способствующий образованию гетеродимера домен (K-coil) (KVAACKK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 21) и С-конец.

Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей DART F является такой же, как аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей DART D (SEQ ID NO: 100).

В. Примеры четырехцепочечных содержащих Fc-фрагмент диател, которые содержат CL/CH1-домены: DART E.

Был создан пример биспецифичного в отношении PD-1 x CTLA-4 четырехцепочечного содержащего Fc-фрагмент диатела, который содержит CL/CH1-домены и обозначен как "DART E". Структура указанных содержащих Fc-фрагмент диател подробно описана ниже. Предполагается, что указанный пример биспецифичного в отношении PD-1 x CTLA-4 диатела иллюстрирует настоящее изобретение и никоим образом не ограничивает его объем.

DART E представляет собой биспецифичное четырехцепочечное содержащее Fc-фрагмент диатело, содержащее два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, два сайта связывания, специфичных в отношении CTLA-4, CL/CH1-домены и вариант Fc-фрагмента IgG4, сконструированный для увеличения времени полужизни. Первая и третья полипептидные цепи DART E содержат (в направлении от N-конца к С-концу): N-конец; VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CTLA-4 (VL_{CTLA-4} CTLA-4 mAb 3 VL) (SEQ ID NO: 91); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)); VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH_{PD-1} PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO: 86); промежуточный линкерный пептид (линкер 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 8)); CH1-домен IgG4 (SEQ ID NO: 42); стабилизированную шарнирную область IgG4 (SEQ ID NO: 36); вариант домена CH2-CH3 IgG4, содержащий замены M252Y/S254T/T256E и не содержащий С-концевой остаток (SEQ ID NO: 81), и С-конец.

Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей DART E представляет собой (SEQ ID NO: 102)

```

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY
GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCA SGYSFTSYWM
NWVRQAPQG LEWIGVIHPS DSETWLDQKF KDRVITITVDK STSTAYMELS
SLRSEDТАVY YCAREHYGTS PFAYWGQGTЛ VTVSSLGGS GASTKGPSVF
PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS
SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRV SKYGPPCPPC
PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLYITREPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV
DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP
SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH
EALHNHYTQK SLSLSLG

```

Вторая и четвертая полипептидные цепи DART E содержат (в направлении от N-конца к С-концу): N-конец; VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL_{PD-1} PD-1 mAb 6-SQ VL) (SEQ ID NO: 87); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)); VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CTLA-4 (VH_{CTLA-4} CTLA-4 mAb 3 VH) (SEQ ID NO: 90); промежуточный линкерный пептид (линкер 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 8)); CL-домен каппа (SEQ ID NO: 38) и С-конец.

Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей DART E представляет собой (SEQ ID NO: 103)

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKEI KGGSGGGGQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFS
YTMHWVRQAP GKGLEWVTFI SYDGSNKHYA DSVKGRFTVS RDNSKNTLYL
QMNSLRADET AIYYCARTGW LGPFYDWGQG TLVTVSSLG GSGRTVAAPS
VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT
EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
```

С. Примеры тривалентных связывающих молекул, содержащих Fc-фрагменты.

Были созданы два примера биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 четырехцепочечных содержащих Fc-фрагмент тривалентных связывающих молекул (обозначенных как "TRIDENT A" и "TRIDENT B"). Структура указанных содержащих Fc-фрагмент тривалентных связывающих молекул подробно описана ниже. Также ниже представлен трехцепочечный вариант, обозначенный как "TRIDENT C", который может быть создан. Указанные примеры биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 тривалентных связывающих молекул предложены для иллюстрации настоящего изобретения и никоим образом не ограничивают его объем.

1. TRIDENT A (ТРЕЗУБЕЦ А).

TRIDENT A представляет собой биспецифичную, четырехцепочечную, содержащую Fc-фрагмент тривалентную связывающую молекулу, содержащую два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, один сайт связывания, специфичный в отношении CTLA-4, вариант Fc-фрагмента IgG4, содержащий "выступ"/"впадину", сконструированный для увеличения времени полужизни, домены E/K-coil, способствующие образованию гетеродимера, и CL/CH1-домены. Первая полипептидная цепь TRIDENT A содержит (в направлении от N-конца к C-концу): VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL_{PD-1} PD-1 mAb 6-SQ VL) (SEQ ID NO: 87); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)); VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH_{PD-1} PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO: 86); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 6)); цистеинсодержащий домен, способствующий образованию гетеродимера (E-coil) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 20)); стабилизированную шарнирную область IgG4 (SEQ ID NO: 36); домен CH2-CH3 IgG4, содержащий "выступ" и замены M252Y/S254T/T256E и не содержащий C-концевой остаток (SEQ ID NO: 84), и C-конец.

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи TRIDENT A представляет собой (SEQ ID NO: 104)

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKEI KGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYSFTS
YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVTIT VDKSTSTAYM
ELSSLRSEDY AVYYCAREHY GTSFPAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGEVAACE
KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKESKYGPCC PPCPAPEFLG GPSVFLFPPK
PKDTLYITRE PEVTCVVVDV SQEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF
NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSQE EMTKNQVSLW CLVKGFPYSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP
VLDSGGSFFL YSRLTVDKSR WQEGNVFSCS VMHEALHNNY TQKSLSLSLG
```

Вторая полипептидная цепь TRIDENT A содержит (в направлении от N-конца к C-концу): N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL_{PD-1} PD-1 mAb 6-SQ VL) (SEQ ID NO: 87); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)); VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH_{PD-1} PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO: 86); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 6)); цистеинсодержащий способствующий образованию гетеродимера домен (K-coil) (KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 21)) и C-конец.

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи TRIDENT A представляет собой (SEQ ID NO: 105)

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKEI KGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYSFTS
YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVTIT VDKSTSTAYM
ELSSLRSEDY AVYYCAREHY GTSFPAYWGQ GTLVTVSSGG CGGKGVAACK
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE
```

Третья полипептидная цепь TRIDENT A содержит (в направлении от N-конца к C-концу): N-конец; VH-домен моноклонального антитела, способного связываться CTLA-4 (VH_{CTLA-4} CTLA-4 mAb 3 VH) (SEQ ID NO: 90); CH1-домен IgG4 (SEQ ID NO: 42); стабилизированную шарнирную область IgG4 (SEQ ID NO: 36); домен CH2-CH3 IgG4, содержащий "впадину" и замены M252Y/S254T/T256E и не содержащий C-концевой остаток (SEQ ID NO: 81), и C-конец.

Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи TRIDENT A представляет собой (SEQ ID NO: 106)

VQQLVESGGG VVQPGSRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF
ISYDGSNKHY ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG
WLGPFDFYWGQ GTLTVVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSSTEST AALGCLVKDY
FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTTKYT
CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLY
ITREPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV
VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF
PSQEEMTKNQ VSLSCAVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG
SFFLVSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMEAL HNRVTQKSL SLSL

Четвертая полипептидная цепь TRIDENT A содержит (в направлении от N-конца к C-концу): N-конец; VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CTLA-4 (VL_{CTLA-4} CTLA-4 mAb 3 VL) (SEQ ID NO: 91); CL-домен каппа (SEQ ID NO: 38) и C-конец.

Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи TRIDENT A представляет собой (SEQ ID NO: 107)

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY
GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK
VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ
GLSSPVTKSF NRGEK

2. TRIDENT B (ТРЕЗУБЕЦ B).

TRIDENT B представляет собой биспецифичную четырехцепочечную содержащую Fc-фрагмент тривалентную связывающую молекулу, которая содержит два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, один сайт связывания, специфичный в отношении CTLA-4, вариант Fc-фрагмента IgG1, содержащий "выступ"/впадину", сконструированный для снижения/устранения эффекторной функции и для увеличения времени полужизни, домены E/K-coil, способствующие образованию гетеродимера, и CL/CH1-домены. Первая полипептидная цепь TRIDENT B содержит (в направлении от N-конца к C-концу): VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL_{PD-1} PD-1 mAb 6-SQ VL) (SEQ ID NO: 87); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)); VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH_{PD-1} PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO: 86); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 6)); цистеинсодержащий домен, способствующий образованию гетеродимера (E-coil) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 20)); линкер (SEQ ID NO: 31); домен CH2-CH3 IgG1, содержащий "выступ" и замены L234A/L235A/M252Y/S254T/ T256E и не содержащий C-концевой остаток (SEQ ID NO: 82), и C-конец.

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи TRIDENT B представляет собой (SEQ ID NO: 108)

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTTKVEI KGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVVKVS CKASGYSFTS
YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSEWLD QKFKDRVTIT VDKSTSTAYM
ELSSLRSEDT AVYYCAREHY GTSPPFAYWGQ GTLTVVSSGG CGGGEVAACE
KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKGGGDKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP
KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL WCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP
GK

Вторая полипептидная цепь TRIDENT B содержит (в направлении от N-конца к C-концу): N-конец, VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VL_{PD-1} PD-1 mAb 6-SQ VL) (SEQ ID NO: 87); промежуточный линкерный пептид (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)); VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (VH_{PD-1} PD-1 mAb 6-I VH) (SEQ ID NO: 86); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 6)); цистеинсодержащий способствующий образованию гетеродимера домен (K-coil) (KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 21)) и C-конец.

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи TRIDENT B является такой же, как аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи TRIDENT A (SEQ ID NO: 105):

Третья полипептидная цепь TRIDENT B содержит (в направлении от N-конца к C-концу): N-конец; VH-домен моноклонального антитела, способного связываться CTLA-4 (VH_{CTLA-4} CTLA-4 mAb 3 VH) (SEQ ID NO: 90); CH1-домен IgG1 (SEQ ID NO: 40); шарнирную область IgG1 (SEQ ID NO: 33); домен CH2-CH3 IgG1, содержащий "впадину" и замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E и не содержащий C-концевой остаток (SEQ ID NO: 83), и C-конец.

Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи TRIDENT В представляет собой (SEQ ID NO: 109)

```
QVQLVESGGG VVQPGRSRLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF
ISYDGSNKHY ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNLSRAED TAIYYCARTG
WLGPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD
TLYITREPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK
```

Четвертая полипептидная цепь TRIDENT В содержит (в направлении от N-конца к С-концу): N-конец; VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CTLA-4 (VLCTLA-4 CTLA-4 mAb 3 VL) (SEQ ID NO: 91); CL-домен каппа (SEQ ID NO: 38) и С-конец.

Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи TRIDENT В является такой же, как аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи TRIDENT А (SEQ ID NO: 107).

3. TRIDENT С (ТРЕЗУБЕЦ С).

Как предложено в настоящей заявке, тривалентные связывающие молекулы, содержащие три полипептидные цепи, можно создавать путем объединения связывающих доменов двух отдельных полипептидных цепей в одну цепь (например, путем гибридизации кодирующих полинуклеотидов и т.д.). Одна биспецифичная трехцепочечная содержащая Fc-фрагмент тривалентная связывающая молекула, которая может быть сконструирована, содержит два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, один сайт связывания, специфичный в отношении CTLA-4, вариант Fc-фрагмента IgG4, содержащий "выступ"/впадину, сконструированный для увеличения времени полужизни, и домены E/K-coil, способствующие образованию гетеродимера ("TRIDENT С"). Первая и вторая полипептидные цепи TRIDENT С могут быть идентичны первой и второй полипептидной цепи TRIDENT А, представленным выше.

Если первая и вторая цепи идентичны первой и второй цепи TRIDENT А, третья полипептидная цепь TRIDENT С может содержать (в направлении от N-конца к С-концу): N-конец; VL-домен моноклонального антитела, способного связываться с CTLA-4 (VLCTLA-4 CTLA-4 mAb 3 VL) (SEQ ID NO: 91); промежуточный спейсерный пептид (GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37)); VH-домен моноклонального антитела, способного связываться с CTLA-4 (VHCTLA-4 CTLA-4 mAb 3 VH) (SEQ ID NO: 90); стабилизированную шарнирную область IgG4 (SEQ ID NO: 36); домен CH2-CH3 IgG4, содержащий "впадину" и замены M252Y/S254T/T256E и не содержащий С-концевой остаток (SEQ ID NO: 85), и С-конец.

Таким образом, аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи TRIDENT С представляет собой (SEQ ID NO: 110)

```
EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY
GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
QGTVKEIKGG GSGGGGSGG GGSQVQLVES GGGVVQPGRS LRLSCAASGF
TFSSYTMHWV RQAPKGLEW VTFISYDGSN KHYADSVKGR FTVSRDNSKN
TLYLQMNLSR AEDTAIYYCA RTGWLGPFDY WGQGLVTVS SESKYGPSCP
PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLYITREP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW
YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG
LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLSC AVKGFYPSDI
AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGSFFLV SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV
MHEALHNRYT QKSLSLSLG
```

IX. Способы получения.

Биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению наиболее предпочтительно получают путем рекомбинантной экспрессии молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих указанные полипептиды, как хорошо известно в данной области техники.

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

В качестве альтернативы, антитела можно получить рекомбинантным путем и экспрессировать с помощью способа, известного в данной области техники. Антитела можно получать рекомбинантным путем, выделяя сначала антитело, полученное от животного-хозяина, определяя его генную последовательность и используя указанную генную последовательность для рекомбинантной экспрессии антитела в хозяйских клетках (например, клетках CHO). Другой способ, который можно использовать, представляет собой экспрессию последовательности антитела в растениях (например, табаке) или молоке трансгенных животных. Были описаны подходящие способы рекомбинантной экспрессии антител в растениях или молоке (см. например, Peeters et al. (2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants" Vaccine 19:2756; Lonberg, N. et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice" Int. Rev. Immunol

13:65-93; and Pollock et al. (1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies" J. Immunol Methods 231:147-157). Подходящие способы создания производных антител, например, гуманизированного антитела, одноцепочечного антитела и т.д., известны в данной области техники и были описаны выше. Согласно другому альтернативному варианту, антитела могут быть получены рекомбинантным путем с помощью технологии фагового дисплея (см., например, патенты США № 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; 6,265,150; and Winter, G. et al. (1994) "Making Antibodies By Phage Display Technology" Annu. Rev. Immunol. 12:433-455).

Векторы, содержащие интересующие полинуклеотиды (например, полинуклеотиды, кодирующие полипептидные цепи биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению), можно встраивать в хозяйскую клетку с помощью любого из ряда подходящих способов, включая электропорацию, трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировку микрочастицами; липофекцию и инфекцию (например, где вектор представляет собой инфекционный агент, такой как вирус осповакцины). Выбор векторов или полинуклеотидов для введения часто зависит от характеристик хозяйской клетки.

Любую хозяйскую клетку, способную экспрессировать на повышенном уровне гетерологичную ДНК, можно применять для экспрессии интересующего полипептида или белка. Неограничивающие примеры подходящих хозяйских клеток млекопитающих включают, но не ограничиваются клетками COS, HeLa и CHO.

Изобретение включает полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению. Полипептиды согласно настоящему изобретению могут быть получены с помощью процедур, известных в данной области техники. Полипептиды могут быть получены путем протеолитической или другой деградации антител, с помощью рекомбинантных способов (т.е. в виде отдельных или гибридных полипептидов), как описано выше, или с помощью химического синтеза. Полипептиды антител, в частности, короткие полипептиды размером до примерно 50 аминокислот, удобно получать путем химического синтеза. Методы химического синтеза известны в данной области техники и являются коммерчески доступными.

Изобретение включает варианты биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул, содержащие функционально эквивалентные полипептиды, которые значительно не влияют на свойства указанных молекул, а также варианты, которые обладают повышенной или пониженной активностью. Модификация полипептидов относится к стандартной практике в данной области техники и не нуждается в подробном описании в настоящей заявке. Примеры модифицированных полипептидов включают полипептиды с консервативными заменами аминокислотных остатков, с одной или более делециями или добавлениями аминокислот, которые не оказывают значительного негативного влияния на функциональную активность, или с использованием химических аналогов. Аминокислотные остатки, которые можно заменять друг на друга в качестве консервативных замен, включают, но не ограничиваются следующими: глицин/аланин; серин/треонин; валин/изолейцин/лейцин; аспарагин/глутамин; аспарагиновая кислота/глутаминовая кислота; лизин/аргинин и фенилаланин/тирозин. Указанные полипептиды также включают гликозилированные и негликозилированные полипептиды, а также полипептиды с другими посттрансляционными модификациями, такими как, например, гликозилирование различными сахарами, ацетилирование и фосфорилирование. Предпочтительно, аминокислотные замены являются консервативными, т.е. заменяющая аминокислота обладает химическими свойствами, сходными со свойствами исходной аминокислоты. Такие консервативные замены известны в данной области техники, их примеры были предложены выше. Аминокислотные модификации могут варьировать от изменения или модифицирования одной или более аминокислот до полной реконструкции участка, такого как варибельный домен. Изменения в варибельном домене могут приводить к изменению аффинности связывания и/или специфичности. Другие способы модифицирования включают применение методов сочетания, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь, ферментативные способы, окислительное замещение и хелатирование. Модификации можно использовать, например, для присоединения меток для иммунологического анализа, такого как присоединение радиоактивных фрагментов для радиоиммунологического анализа. Модифицированные полипептиды можно получать с помощью общепринятых в данной области техники методов и подвергать скринингу с помощью стандартных анализов, известных в данной области техники.

Изобретение включает гибридные белки, содержащие один или более из полипептидов или антител согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации изобретения предложен гибридный полипептид, который содержит легкую цепь, тяжелую цепь или легкую и тяжелую цепь. Согласно другому варианту реализации изобретения гибридный полипептид содержит гетерологичный константный домен иммуноглобулина. Согласно другому варианту реализации изобретения гибридный полипептид содержит варибельный домен легкой цепи и варибельный домен тяжелой цепи антитела, полученного из публично доступной депонированной гибридомы. В целях настоящего изобретения, гибридный белок антитела содержит один или более полипептидных доменов, которые специфично связываются с PD-1 и/или CTLA-4, и другую аминокислотную последовательность, к которой он не присоединен в нативной молекуле, например, гетерологичную последовательность или гомологичную последовательность из другого участка.

Х. Способы применения биспецифичных в отношении PD-1 х CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение включает композиции, включая фармацевтические композиции, содержащие биспецифичные в отношении PD-1 х CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению (например, биспецифичные антитела, биспецифичные диатела, тривалентные связывающие молекулы и т.д.), полипептиды, полученные из таких молекул, полинуклеотиды, содержащие последовательности, кодирующие такие молекулы или полипептиды, и другие агенты, описанные в настоящей заявке.

Как обсуждается выше, PD-1 и CTLA-4 играют важную роль в отрицательной регуляции иммунных ответов (например, пролиферации, функционирования и гомеостаза иммунных клеток). Биспецифичные в отношении PD-1 х CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению способны ингибировать функцию PD-1 и таким образом обращать опосредованное PD-1 подавление иммунной системы. Кроме того, биспецифичные в отношении PD-1 х CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению способны ингибировать функцию CTLA-4 и таким образом стимулировать иммунную систему путем блокирования подавления иммунной системы, опосредованного PD-1 и CTLA-4. Биспецифичные в отношении PD-1 х CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению также позволяют полностью блокировать PD-1 и CTLA-4, а также преимущественно блокировать CTLA-4 при его ко-экспрессии с PD-1. Таким образом, биспецифичные в отношении PD-1 х CTLA-4 молекулы согласно изобретению применимы для ослабления Т-клеточного истощения и/или для усиления иммунного ответа (например, иммунного ответа, опосредованного Т-клетками и/или естественными клетками-киллерами (NK-клетками)) субъекта. В частности, биспецифичные в отношении PD-1 х CTLA-4 молекулы согласно изобретению могут применяться для лечения любых заболеваний или состояний, связанных с нежелательной супрессией иммунной системы, включая рак и заболевания, которые связаны с присутствием патогена (например, бактериальной, грибковой, вирусной или протозойной инфекции).

Раковые заболевания, которые можно лечить с помощью биспецифичных в отношении PD-1 х CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению, включают раковые заболевания, характеризующиеся присутствием раковой клетки, выбранной из группы, состоящей из клетки: опухоли надпочечника, ассоциированного со СПИДом рака, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитарной опухоли, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, метастатической опухоли головного мозга, рака молочной железы, опухоли каротидного тельца, рака шейки матки, хондросаркомы, хордомы, хромофобной почечно-клеточной карциномы, светлоклеточной карциномы, рака толстой кишки, рака толстой и прямой кишки, кожной доброкачественной фиброзной гистиоцитомы, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эпендимомы, саркомы Юинга, внескелетной мукоидной хондросаркомы, несовершенного костного фиброгенеза, фиброзной дисплазии кости, рака желчного пузыря или рака желчного протока, рак желудка, гестационной трофобластической болезни, эмбрионально-клеточной опухоли, рака головы и шеи, гепатоклеточной карциномы, опухоли островковых клеток поджелудочной железы, саркомы Капоши, рака почки, лейкоза, липомы/доброкачественной липоматозной опухоли, липосаркомы/злокачественной липоматозной опухоли, рака печени, лимфомы, рака легких, медуллобластомы, меланомы, менингиомы, множественной эндокринной неоплазии, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринных опухолей, рака яичников, рака поджелудочной железы, папиллярной тиреокарциномы, опухоли паращитовидной железы, педиатрического рака, опухоли оболочек периферических нервов, феохромоцитомы, опухоли гипофиза рака предстательной железы, задней увеальной меланомы, редкого гематологического расстройства, метастатического рака почки, рабдоидной опухоли, рабдомиосаркомы, саркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, плоскоклеточного рака, рака желудка, синовиальной саркомы, рака яичка, рака вилочковой железы, тимомы, метастатического рака щитовидной железы и рака матки.

В частности, биспецифичные в отношении PD-1 х CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению можно применять в лечении рака толстой и прямой кишки, гепатоклеточной карциномы, глиомы, рака почки, рака молочной железы, множественной миеломы, рака мочевого пузыря, нейробластомы; саркомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичников, рака поджелудочной железы и рака прямой кишки.

Инфекции, которые можно лечить с помощью биспецифичных в отношении PD-1 х CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению, включают хронические вирусные, бактериальные, грибковые и паразитарные инфекции. Хронические инфекции, которые можно лечить с помощью биспецифичных в отношении PD-1 х CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению, включают инфекции, вызванные вирусом Эпштейна-Барра, вирусом гепатита А (HAV); вирусом гепатита В (HBV); вирусом гепатита С (HCV); вирусами герпеса (например HSV-1, HSV-2, HHV-6, CMV), вирусами иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусом везикулярного стоматита (VSV), бактериями класса Bacilli, бактериями рода Citrobacter, холерным вибрионом, дифтерийной палочкой, энтеробактериями, гонококками, бактериями вида Helicobacter pylori, бактериями родов Klebsiella и Legionella, менингококками, микобактериями, бактериями рода Pseudomonas, пневмококками, риккетсиями, сальмонеллами, бактериями рода Serratia, стафилококками, стрептококками, столбнячной палочкой, грибами рода Aspergillus (A. fumigatus, A. niger и т.д.), грибами вида Blastomyces dermatitidis, грибами рода Candida (C. albicans, C. krusei, C. glabrata, C.

tropicalis и т.д.), грибами вида *Cryptococcus neoformans*, грибами рода *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), грибами видов *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, бактериями, вызывающими лептоспироз, бактериями вида *Borrelia burgdorferi*, гельминтами (нематодами, ленточными червями, трематодами, плоскими червями (например, шистосомами), кишечными лямблиями, червями рода *Trichinella*, амебами вида *Dientamoeba fragilis*, трипаносомами видов *Trypanosoma brucei* и *Trypanosoma cruzi* и протистами вида *Leishmania donovani*.

XI. Фармацевтические композиции.

Композиции согласно изобретению включают нефасованные композиции лекарственного средства, применимые в изготовлении фармацевтических композиций (например, неочищенные или нестерильные композиции), и фармацевтические композиции (т.е. композиции, подходящие для введения субъекту или пациенту), которые можно применять в приготовлении единичной формы дозирования. Такие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению или комбинацию таких агентов и фармацевтически приемлемый носитель. Предпочтительно, композиции согласно изобретению содержат профилактически или терапевтически эффективное количество биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Изобретение также включает такие фармацевтические композиции, которые дополнительно содержат второе терапевтическое антитело (например, опухоль-специфичное моноклональное антитело), которое специфично в отношении конкретного ракового антигена, и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно конкретному варианту реализации изобретения термин "фармацевтически приемлемый" означает, что указанное вещество одобрено регулирующим органом федерального правительства или правительства штата США или перечислено в Фармакопее США или других в целом признанных фармакопеех для применения у животных и более конкретно, у человека. Термин "носитель" относится к разбавителю, адъюванту (например, адъюванту Фрейнда (полному и неполному), вспомогательному веществу или наполнителю, с которым вводят терапевтический агент. В целом, ингредиенты композиции согласно изобретению обеспечиваются либо раздельно, либо в смешанном виде в единичной форме дозирования, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично запечатанном контейнере, таком как ампула или саше с указанием количества активного агента. Когда композицию предполагается вводить путем инфузии, ее можно дозировать с помощью инфузионного флакона, содержащего стерильную воду или солевой раствор фармацевтической степени чистоты. Когда композицию вводят путем инъекции, может быть предоставлена ампула со стерильной водой для инъекций или солевым раствором для того, чтобы ингредиенты можно было смешать до введения.

Изобретение также обеспечивает фармацевтический комплект или набор, содержащий один или более контейнеров, заполненных биспецифичными в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулами согласно настоящему изобретению, отдельно или с указанным фармацевтически приемлемым носителем. Кроме того, один или более других профилактических или терапевтических агентов, применимых для лечения заболевания, также могут быть включены в фармацевтический комплект или набор. Изобретение также обеспечивает фармацевтический комплект или набор, содержащий один или более контейнеров, наполненных одним или более из ингредиентов фармацевтических композиций согласно изобретению. Необязательно к указанному контейнеру (контейнерам) может прилагаться пояснение в виде, рекомендованном государственным органом, регулирующим изготовление, применение или реализацию фармацевтических препаратов или биологических продуктов, где указанное пояснение отражает одобрение указанным органом изготовления, применения или реализации указанного изделия для введения человеку.

Настоящее изобретение обеспечивает наборы, которые можно применять в указанных выше способах. Набор может содержать любую из биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению. Набор может дополнительно содержать один или более других профилактических и/или терапевтических агентов, применимых для лечения рака, в одном или более контейнерах.

XII. Способы введения.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть представлены для лечения, профилактики и смягчения одного или более симптомов, связанных с заболеванием, расстройством или инфекцией путем введения субъекту эффективного количества гибридного белка или конъюгированной молекулы согласно изобретению или фармацевтической композиции, содержащей гибридный белок или конъюгированную молекулу согласно изобретению. Согласно предпочтительному аспекту, такие композиции являются по существу очищенными (т.е. по существу не содержат вещества, которые ограничивают эффективность указанных композиций или вызывают нежелательные побочные явления). Согласно конкретному варианту реализации изобретения субъект представляет собой животное, предпочтительно млекопитающее, такое как млекопитающее, не являющееся приматом (например, быка, свинью, лошадь, собаку, грызуна и т.д.), или являющееся приматом (например, обезьяну, такую как яванский макак, человека и т.д.). Согласно предпочтительному варианту реализации, субъект представляет собой человека.

Различные системы доставки известны и могут использоваться для введения композиций согласно изобретению, например, инкапсулирование в липосомах, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать антитело или гибридный белок, опосредованный рецептором

эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System", J. Biol. Chem. 262:4429-4432), конструирование нуклеиновой кислоты в виде части ретровирусного или другого вектора и т.д.

Способы введения молекулы согласно изобретению включают, но не ограничиваются следующими, парентеральное введение (например, внутривенное, внутримышечное, внутривенное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и интратекальное введение (например, интраназальный и пероральный способ введения). Согласно конкретному варианту реализации изобретения биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композиции можно вводить с помощью любого удобного способа, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителий или кожнослизистые выстилки (например, слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с других биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным. Кроме того, также можно применять легочное введение, например, путем применения ингалятора или небулайзера и лекарственной формы с аэрозольным агентом. См., например, патенты США № 6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540 и 4,880,078 и международные публикации согласно РСТ № WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346 и WO 99/66903, каждая из которых полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

Согласно изобретению также предложено, что препараты биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению упакованы в герметично запечатанный контейнер, такой как ампула или саше с указанием количества молекул. Согласно одному варианту реализации изобретения такие молекулы поставляются в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично запечатанном контейнере и могут быть восстановлены, например, с помощью воды или солевого раствора до подходящей концентрации для введения субъекту. Предпочтительно, биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению представлены в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка в герметично запечатанном контейнере.

Лиофилизированные препараты биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению следует хранить при температуре между 2°C и 8°C в их оригинальном контейнере, и молекулы следует вводить в пределах 12 часов, предпочтительно в пределах 6 часов, в пределах 5 часов, в пределах 3 часов или в пределах 1 часа после их восстановления. Согласно альтернативному варианту реализации изобретения такие молекулы представлены в жидком виде в герметично запечатанном контейнере с указанием количества и концентрации указанной молекулы, гибридного белка или конъюгированной молекулы. Если такие биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы предоставлены в жидком виде, они предпочтительно поставляются в герметично запечатанном контейнере.

Количество указанных композиций согласно изобретению, которое будет эффективно в лечении, предотвращении или смягчении одного или более симптомов, связанных с расстройством, можно определить с помощью стандартных клинических методов. Точная доза для применения в лекарственной форме также зависит от способа введения и тяжести состояния и должна решаться в соответствии с мнением практикующего врача и условиями для каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать на основе кривых зависимости эффекта от дозы, полученных по результатам тест-систем *in vitro* или тест-систем на основе животной модели.

В настоящей заявке "эффективное количество" фармацевтической композиции согласно одному варианту реализации изобретения представляет собой количество, достаточное для достижения благоприятных или желаемых результатов, включая, но не ограничиваясь указанными, клинические результаты, такие как снижение симптомов, являющихся результатом заболевания, ослабление симптома инфекции (например, вирусной нагрузки, лихорадки, боли, сепсиса и т.д.) или симптома рака (например, пролиферации раковых клеток, присутствия опухоли, опухолевых метастазов и т.д.), обеспечивая, таким образом, повышение качества жизни страдающих заболеванием субъектов, снижение дозы других медикаментов, требуемых для лечения заболевания, усиление эффекта другого медикамента, например, путем таргетирования и/или интернализации, задержку прогрессирования заболевания и/или увеличение времени выживаемости субъектов.

Эффективное количество можно вводить в рамках одного или более введений. В целях настоящего изобретения, эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для уничтожения и/или снижения пролиферации раковых клеток и/или для устранения, снижения и/или задержки развития метастаза из первичного сайта раковой опухоли или снижения пролиферации (или эффекта) инфекционного патогена и снижения и/или задержки развития опосредованного патогеном заболевания, прямо или косвенно. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может достигаться или не достигаться совместно с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, "эффективное количество" можно рассматривать в контексте введения одного или более химиотерапевтических агентов, и можно считать, что один агент обеспечивается в эффективном количестве, если указанный агент вместе с одним или более другими агентами может позволить или позволяет достигнуть желаемый результат. Не-

смотря на индивидуальные различия в потребностях, определение оптимальных диапазонов эффективного количества каждого компонента находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники.

Для биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул, включенных согласно изобретению, дозу, вводимую пациенту, предпочтительно определяют на основе массы тела (кг) субъекта-реципиента. Для биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул, включенных согласно изобретению, доза, вводимая пациенту, как правило, составляет от примерно 0,01 мкг/кг до примерно 150 или более мг/кг массы тела субъекта.

Дозу и частоту введения биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению можно снижать или изменять путем усиления захвата молекулы и ее проникновения в ткани с помощью модификаций, таких как, например, липидизация.

Вводимая пациенту доза биспецифичной в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно изобретению для ее применения в качестве монотерапии может быть рассчитана. В качестве альтернативы, молекулу можно применять в комбинации с другими терапевтическими композициями, и доза, вводимая пациенту, будет ниже по сравнению с использованием указанной молекулы в качестве монотерапии.

Фармацевтические композиции согласно изобретению можно вводить местно в область, требующую лечения, что может достигаться, например (без ограничения), путем локальной инфузии, инъекции или с помощью имплантата, где указанный имплантат состоит из пористого, непористого или гелеобразного материала, включая мембраны, такие как силастиковые мембраны или волокна. Предпочтительно, при введении молекулы согласно изобретению следует обращать внимание на то, чтобы использовались материалы, к которым молекулы не абсорбируются.

Композицию согласно изобретению можно доставлять в везикуле, в частности, липосоме (см. Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533); Treat et al., в Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein, а также Fidler (eds.), Liss, New York, стр. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, стр. 3 17-327).

Когда композиция согласно изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифичную в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулу согласно настоящему изобретению, указанную нуклеиновую кислоту можно вводить *in vivo* для обеспечения экспрессии кодируемой ей биспецифичной в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы путем встраивания указанной нуклеиновой кислоты в виде части подходящего вектора экспрессии на основе нуклеиновой кислоты и введения указанного вектора таким образом, чтобы сделать его внутриклеточным, например, путем применения ретровирусного вектора (см. патент США № 4 980 286) или путем непосредственной инъекции или с помощью бомбардировки микрочастицами (например, генной пушки; Biolistic, Dupont) или путем покрытия липидами или рецепторами клеточной поверхности или трансфицирующими агентами или путем его введения в соединение с подобным гомеобоксу пептидов, который, как известно, входит в ядро (см. например, Joliot et al. (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis", Proc. Natl. Acad. Sci. (США) 88:1864-1868) и т.д. В качестве альтернативы, нуклеиновую кислоту можно вводить внутрь клетки и встраивать в ДНК хозяйской клетки для экспрессии путем гомологичной рекомбинации.

Лечение субъекта с помощью терапевтически или профилактически эффективного количества биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению может включать один курс лечения или, предпочтительно, может включать серию курсов лечения. Согласно предпочтительному примеру, субъект получает лечение с помощью указанного диатела один раз в неделю в течение примерно от 1 до 10 недель, предпочтительно, от 2 до 8 недель, более предпочтительно, примерно от 3 до 7 недель, и еще более предпочтительно, в течение примерно 4, 5 или 6 недель. Фармацевтические композиции согласно изобретению можно вводить один раз в день, два раза в день или три раза в день. В качестве альтернативы, фармацевтические композиции можно вводить один раз в неделю, два раза в неделю, один раз каждые две недели, один раз в месяц, один раз в каждые шесть недель, один раз в каждые два месяца, два раза в год или один раз в год. Следует также иметь в виду, что эффективную дозу молекул, применяемых для лечения, можно повышать или понижать на протяжении конкретного лечения.

XIII. Примеры вариантов реализации.

Изобретение, в частности, относится к вариантам реализации E1-E26.

E1. Биспецифичная молекула, содержащая один или более сайтов связывания эпитопа, способных иммуноспецифично связываться с эпитопом (эпитопами) PD-1, и один или более сайтов связывания эпитопа, способных иммуноспецифично связываться с эпитопом (эпитопами) CTLA-4, где указанная молекула содержит:

(А) вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи антитела, которое связывается с PD-1; и

(В) вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи антитела, которое связывается с CTLA-4;

где указанная молекула представляет собой:

(i) диатело, где указанное диатело представляет собой ковалентно связанный комплекс, который содержит две, три, четыре или пять полипептидных цепей; или

(ii) тривалентную связывающую молекулу, где указанная тривалентная связывающая молекула представляет собой ковалентно связанный комплекс, который содержит три, четыре, пять или более полипептидных цепей.

E2. Биспецифичная молекула согласно варианту реализации E1, где указанная молекула проявляет активность, превышающую указанную активность, которую проявляют две моноспецифичные молекулы, одна из которых содержит указанный вариабельный домен тяжелой цепи и указанный вариабельный домен легкой цепи антитела, которое связывается с PD-1, и другая из которых содержит указанный вариабельный домен тяжелой цепи и указанный вариабельный домен легкой цепи антитела, которое связывается с CTLA-4.

E3. Биспецифичная молекула согласно варианту реализации E1 или E2, где указанная молекула вызывает меньше иммуноопосредованных нежелательных явлений (иНЯ) при введении субъекту, нуждающемуся в указанном введении, по сравнению с такими иНЯ, вызываемыми введением моноспецифичного антитела, которое связывается с CTLA-4.

E4. Биспецифичная молекула согласно варианту реализации E3, где указанное моноспецифичное антитело, которое связывается с CTLA-4, представляет собой ипилимумаб.

E5. Биспецифичная молекула согласно любому из вариантов реализации E1-E4, где указанная молекула содержит Fc-фрагмент.

E6. Биспецифичная молекула согласно варианту реализации E5, где указанный Fc-фрагмент представляет собой вариант Fc-фрагмента, который содержит:

(A) одну или более аминокислотных модификаций, снижающих аффинность варианта Fc-фрагмента в отношении Fc γ R, и/или

(B) одну или более аминокислотных модификаций, увеличивающих время полужизни варианта Fc-фрагмента в сыворотке крови.

E7. Биспецифичная молекула согласно варианту реализации E6, где указанные модификации, снижающие аффинность варианта Fc-фрагмента в отношении Fc γ R, включают замену L234A; L235A, или L234A и L235A, где указанная нумерация соответствует индексу ЕС по Кэбату.

E8. Биспецифичная молекула согласно варианту реализации E6 или E7, где указанные модификации, увеличивающие время полужизни варианта Fc-фрагмента в сыворотке крови, включают замену M252Y; M252Y и S254T; M252Y и T256E; M252Y, S254T и T256E; или K288D и H435K, где указанная нумерация соответствует индексу ЕС по Кэбату.

E9. Биспецифичная молекула согласно любому из вариантов реализации E1-E8, где указанная молекула представляет собой указанное диатело и содержит два сайта связывания эпитопа, способные иммуноспецифично связываться с эпитопом PD-1, и два сайта связывания эпитопа, способные иммуноспецифично связываться с эпитопом CTLA-4.

E10. Биспецифичная молекула согласно любому из вариантов реализации E1-E8, где указанная молекула представляет собой указанную тривалентную связывающую молекулу и содержит два сайта связывания эпитопа, способные иммуноспецифично связываться с эпитопом PD-1, и один сайт связывания эпитопа, способный иммуноспецифично связываться с эпитопом CTLA-4.

E11. Биспецифичная молекула согласно любому из вариантов реализации E1-E10, где указанная молекула способна связываться с молекулами PD-1 и CTLA-4, присутствующими на клеточной поверхности.

E12. Биспецифичная молекула согласно любому из вариантов реализации E1-E11, где указанная молекула способна одновременно связываться с PD-1 и CTLA-4.

E13. Биспецифичная молекула согласно любому из вариантов реализации E1-E12, где указанная молекула способна стимулировать клетки иммунной системы.

E14. Биспецифичная молекула согласно варианту реализации E13, где указанная стимуляция иммунных клеток приводит к:

(A) пролиферации иммунных клеток и/или

(B) продукции и/или высвобождению иммунными клетками по меньшей мере одного цитокина и/или

(C) продукции и/или высвобождению иммунными клетками по меньшей мере одной литической молекулы и/или

(D) экспрессии иммунными клетками по меньшей мере одного маркера активации.

E15. Биспецифичная молекула согласно варианту реализации E13 или E14, где указанная клетка иммунной системы представляет собой Т-лимфоцит или естественную клетку-киллер (НК-клетку).

E16. Биспецифичная молекула согласно любому из вариантов реализации E1-E15, где указанные сайты связывания эпитопа, способные иммуноспецифично связываться с эпитопом PD-1, содержат:

(A) VH-домен PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO: 47) и VL-домен PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO: 48); или

(B) VH-домен PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 49) и VL-домен PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 50); или

(C) VH-домен PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 51) и VL-домен PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 52); или

(D) VH-домен PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO: 53) и VL-домен PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO: 54); или

(E) VH-домен PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO: 55) и VL-домен PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO: 56); или
 (F) VH-домен PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 57) и VL-домен PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 58); или
 (G) VH-домен PD-1 mAb 6-I VH (SEQ ID NO: 86) и VL-домен PD-1 mAb 6-SQ VL (SEQ ID NO: 87);

или

(H) VH-домен PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO: 59) и VL-домен PD-1 mAb 7 (SEQ ID NO: 60); или

(I) VH-домен mAb против PD-1 8 (SEQ ID NO: 61) и VL-домен mAb против PD-1 8 (SEQ ID NO: 62).

E17. Биспецифичная молекула согласно любому из вариантов реализации E1-E16, где указанный сайт (сайты) связывания эпитопа, способный иммунноспецифично связываться с эпитопом CTLA-4, содержит:

(A) VH-домен CTLA-4 mAb 1 (SEQ ID NO: 76) и VL-домен mAb против CTLA-4 (SEQ ID NO: 77);

или

(B) VH-домен CTLA-4 mAb 2 (SEQ ID NO: 78) и VL-домена CTLA-4 mAb 2 (SEQ ID NO: 79); или

(C) VH-домен CTLA-4 mAb 3 (SEQ ID NO: 90) и VL-домена CTLA-4 mAb 3 (SEQ ID NO: 91)

E18. Биспецифичная молекула согласно варианту реализации 17, где:

(A) указанные сайты связывания эпитопа, способные иммунноспецифично связываться с эпитопом PD-1, содержат VH-домен PD-1 mAb 6-I VH (SEQ ID NO: 86) и VL-домен PD-1 mAb 6-SQ (SEQ ID NO: 87) и

(B) указанный сайт (сайты) связывания эпитопа, способный иммунноспецифично связываться с эпитопом CTLA-4, содержат (содержат) VH-домен CTLA-4 mAb 3 (SEQ ID NO: 90) и VL-домен CTLA-4 mAb 3 (SEQ ID NO: 91).

E19. Биспецифичная молекула согласно любому из вариантов реализации E1-E18, где указанная молекула содержит:

(A) две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 95, и две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 96; или

(B) две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 97, и две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 98; или

(C) две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 99, и две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 100; или

(D) две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 102, и две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 103; или

(E) две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 101, и две полипептидные цепи, имеющие последовательность SEQ ID NO: 100; или

(F) одну полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 104, одну полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 105, одну полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 106, и одну полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 107; или

(G) одну полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 108, одну полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 105, одну полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 109, и одну полипептидную цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 107.

E20. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество биспецифичной молекулы согласно любому из вариантов реализации E1-E19 и фармацевтически приемлемый носитель.

E21. Биспецифичная молекула согласно любому из вариантов реализации E1-E19, где указанная молекула применяется для активации стимуляции опосредованного иммунной системой ответа у нуждающегося в этом субъекта.

E22. Биспецифичная молекула согласно любому из вариантов реализации E1-E19, где указанную молекулу применяют для лечения заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы.

E23. Биспецифичная молекула согласно варианту реализации E22, где указанное заболевание или состояние представляет собой рак или инфекцию.

E24. Биспецифичная молекула согласно варианту реализации E23, где указанный рак характеризуется присутствием раковой клетки, выбранной из группы, состоящей из клетки: опухоли надпочечника, ассоциированного со СПИДом рака, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитарной опухоли, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, метастатической опухоли головного мозга, рака молочной железы, опухоли каротидного тельца, рака шейки матки, хондросаркомы, хордомы, хромофобной почечно-клеточной карциномы, светлоклеточной карциномы, рака толстой кишки, рака толстой и прямой кишки, кожной доброкачественной фиброзной гистиоцитомы, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эпендимомы, саркомы Юинга, внескелетной мукоидной хондросаркомы, несовершенного костного фиброгенеза, фиброзной дисплазии кости, рака желчного пузыря или рака желчного протока, рака желудка, гестационной трофобластической болезни, эмбрионально-клеточной опухоли, рака головы и шеи, гепатоклеточной карциномы, опухоли островковых клеток поджелудочной

железы, саркомы Капоши, рака почки, лейкоза, липомы/доброкачественной липоматозной опухоли, липосаркомы/злокачественной липоматозной опухоли, рака печени, лимфомы, рака легких, медуллобластомы, меланомы, менингиомы, множественной эндокринной неоплазии, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринных опухолей, рака яичников, рака поджелудочной железы, папиллярной тиреокарциномы, опухоли паращитовидной железы, педиатрического рака, опухоли оболочек периферических нервов, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, рака предстательной железы, задней увеальной меланомы, редкого гематологического расстройства, метастатического рака почки, рабдоидной опухоли, рабдомиосаркомы, саркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, плоскоклеточного рака, рака желудка, синовиальной саркомы, рака яичка, рака вилочковой железы, тимомы, метастатического рака щитовидной железы и рака матки.

E25. Биспецифичная молекула согласно варианту реализации E24, где указанная инфекция характеризуется присутствием бактериального, грибкового, вирусного или протозойного патогена.

E26. Биспецифичная молекула согласно варианту реализации E25, где указанная инфекция характеризуется наличием вируса Эпштейна-Барра, вируса гепатита A (HAV); вируса гепатита B (HBV); вируса гепатита C (HCV); вирусов герпеса (например, HSV-1, HSV-2, HHV-6, CMV), вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса герпетического стоматита (VSV), бактерий класса Bacilli, бактерий рода Citrobacter, холерного вибриона, дифтерийной палочки, энтеробактерий, гонококков, бактерий вида Helicobacter pylori, бактерии родов Klebsiella и Legionella, менингококков, микобактерий, псевдомонад, пневмококков, риккетсий, сальмонелл, бактерий рода Serratia, стафилококков, стрептококков, столбнячной палочки, грибов рода Aspergillus (A.fumigatus, A. niger и т.д.), грибов вида Blastomyces dermatitidis, грибов рода Candida (C. albicans, C. krusei, C. glabrata, C. tropicalis и т.д.), грибов видов Cryptococcus neoformans, грибов рода Mucorales (mucor, absidia, rhizopus), грибов видов Sporothrix schenckii, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, бактерии, вызывающей лептоспироз, бактерий вида Borrelia burgdorferi, гельминтов (нематод, ленточных червей, трематод, плоских червей (например, шистосом), кишечных лямблий, червей рода Trichinella, амёб вида Dientamoeba fragilis, трипаносом видов Trypanosoma brucei и Trypanosoma cruzi и протистов вида Leishmania donovani.

Примеры

Описанное в целом изобретение будет более доступно для понимания после ознакомления с приведенными ниже примерами. Следующие примеры иллюстрируют различные способы применения композиций в способах диагностики или лечения согласно изобретению. Примеры приведены в качестве иллюстрации и никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

Пример 1. Биспецифичные молекулы обеспечивают повышенную стимуляцию иммунных ответов.

Биспецифичная молекула, обладающая специфичностью в отношении отдельных белков клеточной поверхности, регулирующих два иммунномодулирующих пути, PD-1 и LAG-3, была создана и обозначена как "DART A".

DART A представляет собой биспецифичное четырехцепочечное содержащее Fc-фрагмент диантело, которое содержит два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, два сайта связывания, специфичных в отношении LAG-3, вариант Fc-фрагмента IgG4, сконструированный для увеличения времени полужизни, и цистеинсодержащие домены E/K-coil, способствующие образованию гетеродимера. Как описано более подробно ниже, DART A обладает специфичностью связывания (т.е. доменами VH и VL) гуманизированного антитела против PD-1 (hPD-1 mAb 6) и гуманизированного антитела против LAG-3 (hLAG-3 mAb 1). Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей DART A представляет собой (SEQ ID NO: 63)

```
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFFGG
GTKLEIKGGG SGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCAKS GYSFTSYWMN
WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVTITVDKS TSTAYMELSS
LRSEDTAVYY CAREHYGTSP FAYWGQTLV TVSSGGCGGG EVAACEKEVA
ALEKEVALE KEVAALEKES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT
LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPDSQEEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL
DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVEFSCVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG
```

В последовательности SEQ ID NO: 63 аминокислотные остатки 1-107 соответствуют аминокислотной последовательности домена VL гуманизированного моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (hLAG-3 mAb 1); остатки 108-115 соответствуют промежуточному спейсерному пептиду (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)); остатки 116-234 соответствуют VH-домену моноклонального антитела, способному связываться с PD-1 (hPD-1 mAb 6, SEQ ID NO: 57, где X₁ представляет собой I); остатки 235-240 соответствуют промежуточному спейсерному пептиду (линкер 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 6)); остатки 241-268 соответствуют цистеинсодержащему домену, способствующему образованию гетеродимера (E-coil) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 20)); остатки 269-280 соответствуют стабилизированной шарнирной области IgG4 (SEQ ID NO: 36); остатки до 281-496 соответствуют варианту домена CH2-CH3 IgG4, содержащему замены M252Y/S254T/T256E и не содержаще-

му С-концевой остаток.

Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей DART А представляет собой (SEQ ID NO: 64)

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGSGGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYTFTD
YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRVMT TDTSTSTAYM
ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TLTVSSGGC GGGKVAACKE
KVAALKEKVA ALKEKVAALK E
```

В последовательности SEQ ID NO: 64 аминокислотные остатки 1-111 соответствуют аминокислотной последовательности VL-домена моноклонального антитела, способного связываться с PD-1 (hPD-1 mAb 6, SEQ ID NO: 58, где X₁ представляет собой S и X₂ представляет собой Q); остатки 112-119 соответствуют промежуточному спейсерному пептиду (линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)); остатки 120-237 соответствуют VH-домену гуманизированного моноклонального антитела, способного связываться с LAG-3 (hLAG-3 mAb 1); остатки 238-243 соответствуют цистеинсодержащему спейсерному линкерному пептиду (линкер 2: GCGGGG (SEQ ID NO: 6)); остатки 244-271 соответствуют цистеинсодержащему способствующему образованию гетеродимера домену (К-спиральному) (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 21)).

Способность DART А стимулировать Т-клетки оценивали в анализе с использованием энтеротоксина типа В *Staphylococcus aureus* ("SEB"). SEB представляет собой микробный суперантиген, способный активировать значительную часть Т-клеток (5-30%) у SEB-чувствительных доноров. SEB связывается с молекулой МНС II за пределами пептид-связывающей петли и, таким образом, SEB-сигнал зависит, но не ограничивается МНС II и опосредуется TCR. SEB-стимуляция Т-клеток приводит к олигоклональной пролиферации Т-клеток и продукции цитокинов (несмотря на то что может наблюдаться вариабельность, зависящая от донора). В пределах 48 часов после SEB-стимуляции в МКПК наблюдается положительная регуляция PD-1 и LAG-3, при этом на 5 сутки (после вторичной стимуляции путем культивирования в 96-луночном планшете в присутствии SEB) наблюдается дополнительная стимуляция указанных белков. Положительная регуляция белков контрольных точек иммунного ответа PD-1 и LAG-3 после SEB-стимуляции МКПК ограничивает высвобождение цитокина при повторной стимуляции SEB. Способность DART А усиливать высвобождение цитокина путем ингибирования контрольной точки иммунного ответа оценивали и сравнивали с активностью исходных антител в отношении PD-1 и LAG-3 отдельно и в комбинации.

Вкратце, МКПК очищали из цельной крови, полученной от здоровых доноров при информированном согласии (Biological Specialty Corporation) с использованием метода центрифугирования в градиенте плотности фикола Ficol-Paque Plus (GE Healthcare) в соответствии с инструкциями изготовителя и затем очищали Т-клетки с использованием набора для получения Т-клеток человека Dynabeads® (Life Technologies) в соответствии с инструкциями изготовителя. Очищенные МКПК культивировали в среде RPMI с добавлением 10% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) и 1% пенициллина/стрептомицина в объемных флаконах Т-25 в течение 2-3 дней отдельно или вместе с SEB (Sigma-Aldrich) в концентрации 0,5 нг/мл (первичная стимуляция). В конце первого цикла SEB-стимуляции МКПК промывали два раза фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и сразу высевали на 96-луночные планшеты для тканевых культур в концентрации $1-5 \times 10^5$ клеток на лунку просто в среде, в среде, содержащей контрольное антитело, в среде, содержащей SEB в концентрации 0,5 нг/мл (вторичная стимуляция) в отсутствие антитела, или среде, содержащей SEB и DART А, контрольный IgG или антитело против PD-1 +/- mAb против LAG-3 и культивировали в течение дополнительных 2-3 дней. В конце второй стимуляции супернатанты собирали для измерения секреции цитокинов с применением наборов для твердофазного ИФА клеток человека DuoSet для IFN γ , TNF α , IL-10 и IL-4 (R&D Systems) в соответствии с инструкциями изготовителя.

В указанных анализах DART А (биспецифичную в отношении PD-1 x LAG-3 молекулу) и антитела против PD-1 и LAG-3 использовали в концентрациях 0,0061, 0,024, 0,09, 0,39, 1,56, 6,25 или 25 нМ. Для указанных исследований, в которых использовали комбинацию антител, каждое антитело обеспечивали в указанной концентрации, таким образом, что общая концентрация антител в два раза превышала концентрацию, используемую для каждого антитела (т.е. 0,0122, 0,048, 0,18, 0,78, 3,12, 12,5 или 50 нМ). На фиг. 7 показаны профили секреции IFN γ для SEB-стимулированных МКПК от типичного донора (D: 56041). Сходные результаты наблюдались для биспецифичных в отношении PD-1 x LAG-3 молекул, содержащих VH/VL-домены от альтернативных антител против PD-1 и LAG-3, и для биспецифичных в отношении PD-1 x LAG-3 молекул, имеющих альтернативные структуры (см. например, фиг. 3C), у нескольких доноров.

Результаты указанных исследований демонстрируют, что биспецифичные в отношении PD-1 x LAG-3 молекулы значительно усиливают продукцию IFN γ в SEB-стимулированных МКПК при повторной стимуляции. Указанные результаты показывают, что биспецифичные молекулы, направленные на два иммунномодулирующих пути, являются более активными по сравнению с комбинацией отдельных

антител, направленных на те же пути.

Пример 2. Биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы.

Биспецифичные молекулы, обладающие специфичностью в отношении PD-1 и CTLA-4, можно создавать с помощью способов, предложенных в настоящей заявке и известных в данной области техники. Общая структура полипептидных цепей нескольких биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул представлена в табл. 8. В частности, можно получать молекулы биспецифичных бивалентных диател, содержащие две полипептидные цепи, имеющие один сайт связывания для PD-1 и один сайтом связывания для CTLA-4, где указанные полипептидные цепи имеют общую структуру варианта I (также см., например, фиг. 1). Могут быть созданы молекулы биспецифичных бивалентных диател, содержащие три полипептидные цепи, обладающие одним сайтом связывания PD-1, одним сайтом связывания CTLA-4 и Fc-фрагментом, где указанные полипептидные цепи имеют общую структуру варианта II (см. также, например, фиг. 4A). Могут быть созданы молекулы биспецифичных тетравалентных диател, содержащие четыре полипептидные цепи, обладающие двумя идентичными сайтами связывания PD-1, двумя идентичными сайтами связывания CTLA-4 и Fc-фрагментом, где указанные полипептидные цепи имеют общую структуру вариантов III или IV (также см., например, (фиг. 3A-3C). Кроме того, могут быть созданы биспецифичные тривалентные молекулы, содержащие четыре полипептидные цепи, имеющие два сайта связывания PD-1 и один сайт связывания CTLA-4 (или два сайта связывания CTLA-4 и один сайт связывания PD-1) и Fc-фрагмент, где указанные полипептидные цепи имеют общую структуру варианта V (также см., например, фиг. 6A). Кроме того, могут быть созданы биспецифичные бивалентные молекулы антитела, содержащие четыре полипептидные цепи, имеющие один сайт связывания PD-1, один сайт связывания CTLA-4 и Fc-фрагмент, где указанные полипептидные цепи имеют общую структуру варианта VI (также см., например, патент США № 7,695,936 и международную публикацию патента согласно PCT WO 2011/143545).

Таблица 8		
Вариант	Полипептидная цепь	Домены
I	Первая	(VL1) – (линкер 1) – (VH2) – (линкер 2) – (HPD)
	Вторая	(VL2) – (линкер 1) – (VH1) – (линкер 2) – (HPD)
II	Первая	(VL1) – (линкер 1) – (VH2) – (линкер 2) – (HPD) – (линкер 3) – (модифицированный домен CH2-CH3)
	Вторая	(VL2) – (линкер 1) – (VH1) – (линкер 2) – (HPD)
	Третья	(линкер3) – (модифицированный домен CH2-CH3)
III	Первая и Третья	(VL1) – (линкер 1) – (VH2) – (линкер 2) – (HPD) – (линкер 3) – (Домен CH2-CH3)
	Вторая и Четвертая	(VL2) – (линкер 1) – (VH1) – (линкер 2) – (HPD)
IV	Первая и Третья	(VL1) – (линкер 1) – (VH2) – (линкер 2) – (CH1) – (Шарнир) – (Домен CH2-CH3)
	Вторая и Четвертая	(VL2) – (линкер 1) – (VH1) – (линкер 2) – (CL)
V	Первая	(VL1) – (линкер 1) – (VH2) – (линкер 2) – (HPD) – (линкер 3) – (модифицированный домен CH2-CH3)
	Вторая	(VL2) – (линкер 1) – (VH1) – (линкер 2) – (HPD)
	Третья	(VH3) – (CH1) – (шарнир) – (модифицированный домен CH2-CH3)
	Четвертая	(VL3) – (CL)
VI	Первая	(VL1) – (линкер 1) – (VH2) – (линкер 2) – (HPD) – (линкер 3) – (модифицированный домен CH2-CH3)
	Вторая	(VL2) – (линкер 1) – (VH1) – (линкер 2) – (HPD)
	Третья	(VL3) – (линкер 4) – (VH3) – (CH1) – (Шарнир) – (модифицированный домен CH2-CH3)
VII	Первая	(VH1) – (CH1) – (шарнир) – (модифицированный домен CH2-CH3)
	Вторая	(VL1) – (CL)
	Третья	(VH2) – (CH1) – (шарнир) – (модифицированный домен CH2-CH3)
	Четвертая	(VL2) – (CL)

HPD = стимулирующий образование гетеродимера доменов.

Для каждого варианта биспецифичных молекул, представленных в табл. 8:

(a) VL1 и VH1 представляют собой переменные домены антитела против PD-1, и VL2 и VH2 представляют собой переменные домены антитела против CTLA-4; или

(b) VL1 и VH1 представляют собой переменные домены антитела против CTLA-4, и VL2 и VH2 представляют собой переменные домены антитела против PD-1.

Для вариантов V и VI: VL3 и VH3 представляют собой переменные домены антитела против PD-1 или представляют собой переменные домены антитела против CTLA-4.

Линкеры, стимулирующие образование гетеродимера домены и константные области (например, CH1, шарнирный участок, домены CH2-CH3), применимые в создании таких биспецифичных молекул, представлены выше. В частности, как подробно описано в настоящей заявке, домены CH2-CH3 молекул, первая и третья полипептидные цепи которых не идентичны, модифицируют таким образом, что указанные модификации способствуют гетеродимеризации и снижают или предотвращают гомодимеризацию, например, путем модификации доменов CH2-CH3 одной цепи таким образом, чтобы они содержал "впа-

дину", и модификации доменов CH2-CH3 на другой цепи таким образом, чтобы они содержали "выступ". Как подробно описано выше, шарнирный участок и/или домены CH2-CH3 могут содержать аминокислотные замены, которые стабилизируют биспецифичные молекулы и/или изменяют их эффекторные функции и/или увеличивают время их полужизни в сыворотке крови.

Пример 3. Универсальные биспецифичные адапторные молекулы ("UBA").

В качестве альтернативы, может быть сконструирована биспецифичная молекула (например, биспецифичное антитело, биспецифичное диатело, тривалентная связывающая молекула и т.д.), содержащая один сайт связывания эпитопа, который специфично связывается с PD-1 (или CTLA-4), и второй сайт связывания эпитопа, который специфично связывается с гаптенем, например, изотиоцианатом флуоресцеина (также известным как фторизотиоцианат, или FITC). Такая биспецифичная молекула служит в качестве молекулы универсального биспецифичного адаптера ("UBA"), способного ко-лигировать домен связывания, специфичный в отношении PD-1 (или CTLA-4), с конъюгированными с флуоресцеином связывающими молекулами (например, антителом, scFv и т.д.), специфичными в отношении CTLA-4 (или PD-1). Например, FITC-реактивную группу такой универсальной биспецифичной адапторной молекулы можно применять для связывания с меченным FITC антителом, которое связывается с CTLA-4 (или PD-1), создавая таким образом универсальную биспецифичную адапторную молекулу, которая адаптирована для связывания с PD-1 и CTLA-4. Такие универсальные биспецифичные адапторные молекулы применимы для быстрой оценки биспецифичных молекул.

Антитело против флуоресцеина, 4-4-20 ("mAb 4-4-20"), можно применять в качестве источника FITC-специфичных доменов связывания (Gruber, M. et al. (1994) "Efficient Tumor Cell Lysis Mediated By A Bispecific Single Chain Antibody Expressed In Escherichia coli", J. Immunol. 152(11): 5368-5374).

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи mAb 4-4-20 (SEQ ID NO: 65) (остатки CDR_H подчеркнуты)

EVKLDETGGG LVQPGRPMKL SCVASGFTFS DYWMNNVQRQ PEKGLEWVAQ
IRNKPYNYET YYSDSVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNLRV EDMGIYYCTG
SYYGMDYWGQ GTSVTVSS

Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи mAb 4-4-20 (SEQ ID NO: 66) (остатки CDR_L подчеркнуты)

DVVMQTTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNGNTYLRW YLQKPGQSPK
 VLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
WTFGGGTKLE IK

Можно применять любые биспецифичные структуры, предложенные в настоящей заявке (см., например, табл. 1, 2, 3 и 4). Предпочтительные биспецифичные молекулы содержат только один сайт связывания гаптена (например, флуоресцеина) и связываются с единственным меченным гаптенем антителом, обеспечивая таким образом в полученных комплексах отношение универсальная адапторная биспецифичная молекула:меченное гаптенем антитело, составляющее 1:1. Такие универсальные биспецифичные адапторные молекулы можно создавать с использованием, например, VL- и VH-доменов антитела против PD-1 и антитела против флуоресцеина. Предпочтительно, такая универсальная биспецифичная адапторная молекула представляет собой ковалентно связанное диатело или тривалентную связывающую молекулу, содержащую два, три, четыре, пять или более полипептидных цепей. Типичные универсальные биспецифичные адапторные молекулы, которые можно создавать, представлены ниже.

A. UBA1.

Одна из универсальных биспецифичных адапторных молекул, которая может быть создана, представляет собой ковалентно связанное диатело, состоящие из двух полипептидных цепей и содержащее один сайт связывания эпитопа PD-1 и один сайт связывания флуоресцеина ("UBA 1").

Первая полипептидная цепь UBA 1 содержит (в направлении от N-конца к C-концу) N-конец, VL-домен mAb 4-4-20 (SEQ ID NO: 66), промежуточный спейсерный пептид (линкер 1, GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)), VH-домен PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 57, где X₁ представляет собой I)), промежуточный спейсерный пептид (линкер 2, GGC GGG (SEQ ID NO: 6)), стимулирующий образование гетеродимера E-coil домен: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 18)) и C-конец.

Таким образом, аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи UBA 1 представляет собой (SEQ ID NO: 67)

DVVMQTTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNGNTYLRW YLQKPGQSPK
 VLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
 WTFGGGTKLE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
 SYWMNWRQA PGQGLEWIGV IHPDSEETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
 MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAL
 EKEVAALEKE VAALKEVAAL LEK

Вторая полипептидная цепь UBA 1 содержит (в направлении от N-конца к C-концу) N-конец, VL-домен PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 58, где X₁ представляет собой S и X₂ представляет собой Q)), промежуточный спейсерный пептид (линкер 1, GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)), VH-домен mAb 4-4-20 (SEQ ID NO: 65)), промежуточный спейсерный пептид (линкер 2, GGC GGG (SEQ ID NO: 6)), стимулирующий образование гетеродимера K-coil домен: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 19)) и C-

конец.

Таким образом, аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи UBA 1 представляет собой (SEQ ID NO: 68)

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSPRFSGS SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGG EVKLDETTGG LVQPGRPMKL SCVASGFTFS
DYWMNWVRQS PEKGLEWVAQ IRNKPYNYET YYSDSVKGRF TISRDDSKSS
VYLQMNLRV EDMGIYYCTG SYYGMDYWQ GTSVTVSSGG CGGGKVAALK
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE
```

B. UBA2.

Как предложено выше, встраивание доменов CH2-CH3 IgG в одну полипептидную цепь диатела, такого как UBA 1, может позволить образование более сложного четырехцепочечного биспецифического содержащего Fc-фрагмент диатела. Таким образом, вторая универсальная биспецифическая адапторная молекула, которая может быть создана, представляет собой ковалентно связанное диатело, состоящие из четырех полипептидных цепей, содержащих два сайта связывания эпитопа PD-1, два сайта связывания флуоресцеина и Fc-фрагмент ("UBA 2"). Следует отметить, что UBA 2 может связываться с двумя меченными флуоресцеином молекулами через два сайта связывания флуоресцеина.

Первая и третья полипептидные цепи UBA 2 содержат (в направлении от N-конца к С-концу) N-конец, VL-домен mAb 4-4-20 (SEQ ID NO: 66), промежуточный спейсерный пептид (линкер 1, GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)), VH-домен PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 57, где X₁ представляет собой I)), промежуточный спейсерный пептид (линкер 2, GGCGGG (SEQ ID NO: 7)), стимулирующий образование гетеродимера домен E-coil: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 18)), промежуточный спейсерный пептид (линкер 3, GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 31)), Fc-фрагмент IgG1, содержащий замены L234A/L235A (SEQ ID NO: 43), где X представляет собой K), и С-конец.

Таким образом, аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей UBA 2 представляет собой (SEQ ID NO: 69)

```
DVVMQTQPFPS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNQNTYLRW YLQKPGQSPK
VLIYKVSNNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
WTFGGGTKLE IKGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTSLTVSSG GCGGGEVAAL
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT
PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSL
PGK
```

Вторая и четвертая полипептидные цепи UBA 2 идентичны второй полипептидной цепи UBA 1. Таким образом, каждая из второй и четвертой полипептидных цепей UBA 2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

C. UBA3.

Третья универсальная биспецифическая адапторная молекула, которая может быть создана, представляет собой ковалентно связанное диатело, состоящее из трех полипептидных цепей и содержит один сайт связывания эпитопа PD-1, один сайт связывания флуоресцеина и Fc-фрагмент ("UBA 3").

Первая полипептидная цепь UBA 3 содержит (в направлении от N-конца к С-концу), N-конец, VL-домен mAb 4-4-20 (SEQ ID NO: 66), промежуточный спейсерный пептид (линкер 1, GGGSGGGG (SEQ ID NO: 5)), VH-домен PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 57, где X₁ представляет собой I)), промежуточный спейсерный пептид (линкер 2, GGCGGG (SEQ ID NO: 6)), стимулирующий образование гетеродимера домен E-coil: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 18)), промежуточный спейсерный пептид (линкер 3, GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 31)), "содержащий "выступ" Fc-фрагмент IgG1, содержащий замены L234A/L235A (SEQ ID NO: 44, где X представляет собой K)), и С-конец.

Таким образом, аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи UBA 3 представляет собой (SEQ ID NO: 70)

```
DVVMQTQPFPS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNQNTYLRW YLQKPGQSPK
VLIYKVSNNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
WTFGGGTKLE IKGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTSLTVSSG GCGGGEVAAL
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYCKKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT
PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSL
PGK
```

Вторая полипептидная цепь UBA 3 может быть идентична второй полипептидной цепи UBA 1. Та-

ким образом, вторая полипептидная цепь UBA 3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Третья полипептидная цепь UBA 3 содержит (в направлении от N-конца к C-концу), N-конец, спейсерный пептид (линкер 3, DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 26)), содержащий "впадину" Fc-фрагмент IgG1 с заменами L234A/L235A (SEQ ID NO: 45, где X представляет собой K), и C-конец.

Таким образом, аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи UBA 3 представляет собой (SEQ ID NO: 71)

```
DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
NVFSCSVME ALHNRYTQKS LSLSPGK
```

D. UBA 4.

Четвертая универсальная биспецифичная адапторная молекула, которая может быть создана, представляет собой ковалентно связанную тривалентную связывающую молекулу, состоящую из четырех полипептидных цепей и содержащую два сайта связывания эпитопа PD-1, один сайт связывания флуоресцеина и Fc-фрагмент ("UBA 4").

Первая полипептидная цепь UBA 4 идентична первой полипептидной цепи UBA 3. Таким образом, первая полипептидная цепь UBA 4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

Вторая полипептидная цепь UBA 4 идентична второй полипептидной цепи UBA 1. Таким образом, вторая полипептидная цепь UBA 4 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Третья полипептидная цепь UBA 4 содержит (в направлении от N-конца к C-концу) VH-домен PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 57, где X₁ представляет собой I), CH1 домен IgG1 (SEQ ID NO: 40), шарнирную область IgG1 (SEQ ID NO: 33), содержащий "впадину" Fc-фрагмент IgG1 с заменами L234A/L235A (SEQ ID NO: 45, где X представляет собой K) и C-конец.

Таким образом, аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи UBA 4 представляет собой (SEQ ID NO: 72)

```
QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVQLQSSG LYSLSVTVT PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPKPK
DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
YTLPPSREEM TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
DSGGSFFLVK KLTVDKSRWQ QGNVFCSSVM HEALHNRYTQ KSLSLSPGK
```

Четвертая полипептидная цепь UBA 4 содержит (в направлении от N-конца к C-концу) VL-домен PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 58, где X₁ представляет собой S и X₂ представляет собой Q), CL-домен (например, каппа-домен IgG (SEQ ID NO: 38)) и C-конец.

Таким образом, аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи UBA 4 представляет собой (SEQ ID NO: 73)

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL STLTLKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC
```

E. UBA 5.

Пятая универсальная биспецифичная адапторная молекула, которая может быть создана, представляет собой ковалентно связанную тривалентную связывающую молекулу, состоящую из трех полипептидных цепей и содержащую два сайта связывания эпитопа PD-1, один сайт связывания флуоресцеина и Fc-фрагмент ("UBA 4", см., например, фиг. 6C-6D).

Первая полипептидная цепь UBA 5 идентична первой полипептидной цепи UBA 3. Таким образом, первая полипептидная цепь UBA 5 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70.

Вторая полипептидная цепь UBA 5 идентична второй полипептидной цепи UBA 1. Таким образом, вторая полипептидная цепь UBA 5 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Третья полипептидная цепь UBA 5 содержит (в направлении от N-конца к C-концу) VL-домен PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 58, где X₁ представляет собой S и X₂ представляет собой Q), промежуточный спейсерный пептид (линкер 4, GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 37)), VH-домен PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 57, где X₁ представляет собой I), CH1 домен IgG1 (SEQ ID NO: 40), шарнирную область IgG1 (SEQ ID NO: 33), содержащий "впадину" Fc-фрагмент IgG1 с заменами L234A/L235A (SEQ ID NO: 45, где X представляет собой K) и C-конец.

Таким образом, аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи UBA 5 представляет собой (SEQ ID NO: 74)

```
EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGKTVEI KGGGSGGGG SGGGSGVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCA
SGYSFTSYWM NWVRQAPGGG LEWIGVIHPS DSETWLDQKF KDRVITVVDK
STSTAYMELS SLRSEDVAVY YCAREHYGTS PFAYWGQGTI VTVSSASTKG
PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
VLQSSGLYSL SSVVTVPSST LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KRVEPKSCDK
THTCPPCPAP EAAGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLSCAVKGF
YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLVSKLTV DKSRWQQGNV
FSCSVMEAL HNRVTQKSL SLPKG
```

Антитела против CTLA-4 можно метить флуоресцеином с использованием стандартных способов. Когда такую меченую молекулу инкубируют в присутствии универсальной биспецифичной адапторной молекулы, представленной выше, имеющей сайт связывания эпитопа, который связывается с PD-1, и сайт связывания эпитопа, который связывается с флуоресцеином, образуются биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы, которые можно оценивать, как описано ниже.

С учетом принципов, предложенных в настоящей заявке, очевидно, что различные VH-домены, VL-домены, линкеры, способствующие образованию гетеродимера домены и/или константные домены IgG можно применять для создания альтернативных универсальных биспецифичных адапторных молекул. Например, VH- и VL- домены антитела против CTLA-4 и/или другого антитела против PD-1 можно применять вместо VH- и VL-доменов используемого антитела против PD-1 для создания альтернативных или эквивалентных универсальных биспецифичных адапторных молекул. В качестве альтернативы, VH- и VL-домены антитела против CTLA-4 можно применять вместо VH- и VL-доменов антитела против флуоресцеина для создания биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул, имеющих общую структуру, соответствующую вариантам I, II, III, V и VI, предложенным выше. Такие биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы можно непосредственно использовать прямо в анализах, описанных ниже.

Пример 4. Анализы.

Биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно настоящему изобретению можно характеризовать с помощью любого из различных способов. В частности, можно анализировать способность биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно изобретению иммуноспецифично связываться с молекулами PD-1 и CTLA-4 (например, в том виде, в котором они присутствуют на клеточной поверхности и т.д.), и/или можно определять кинетику связывания при взаимодействии с антигеном. Когда биспецифичные молекулы содержат Fc-фрагмент (или его часть), можно анализировать их способность обеспечивать взаимодействие Fc-FcγR, например, специфичное связывание Fc-фрагмента (или его части) с FcγR, опосредовать эффекторную функцию, передачу сигнала и т.д. Иммуномодулирующую активность и/или противоопухолевую эффективность *in vivo* биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно изобретению можно оценивать с применением *in vitro* и *in vivo* анализов, известных данной области техники.

А. Получение иммунных клеток и клеток, экспрессирующих PD-1 и/или CTLA-4.

1. Выделение МКПК и субпопуляций иммунных клеток из цельной крови человека МКПК выделяли из цельной крови здоровых доноров, представляющих собой людей, с применением, например, центрифугирования в градиенте фиколла. Вкратце, цельную кровь разводили в отношении 1:1 в стерильном фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Разведенную кровь (35 мл) наслаивали на 15 мл раствора Ficoll-Paque™ Plus в пробирке на 50 мл и пробирки центрифугировали при 400 × g (1320 об./мин) в течение 30 минут с торможением. Лейкоцитарную пленку между двумя фазами собирали в пробирки на 50 мл и центрифугировали при 600 × g (1620 об./мин) в течение 5 минут. Супернатант выливали и клеточный осадок промывали 3 раза с помощью ФСБ (например, путем центрифугирования пробирок при 600 × g (1620 об./мин) в течение 5 минут). Количество жизнеспособных клеток определяли с помощью красителя трипанового синего. МКПК ресуспендировали в полной питательной среде (например, RPMI 1640, 10% ЭБС, 1% пенициллин/стрептомицин) и инкубировали при 37°C в присутствии 5% CO₂ в течение ночи или дополнительно обрабатывали для выделения желаемой субпопуляции иммунных клеток, таких как Т-клетки, (например, регуляторные Т-клетки, CD8-клетки, CD4-клетки), NK-клетки, дендритные клетки и моноциты, как описано ниже.

Определенные субпопуляции иммунных клеток быстро выделяли из МКПК с применением коммерческого набора для получения указанных субпопуляций (например, набора для выделения Т-клеток человека Untouched™ для выделения Т-клеток, CD4 Т-клеток, CD8 Т-клеток, моноцитов, дендритных клеток (Life Technologies/ThermoFisher Scientific); набора для выделения регуляторных Т-клеток (CD4+/CD25+) DYNABEADS® Regulatory CD4+/CD35+ T Cell (ThermoFisher) и т.д.), в соответствии с инструкциями изготовителя. После выделения субпопуляцию иммунных клеток (например, Т-клеток)

ресуспендировали в подходящий полной культуральной среде (например, RPMI 1640, 10% ЭБС, 1% пенициллин/стрептомицин), в которую можно добавлять цитокины (например, IL-2, GM-CSF, IL-4, TNF- α и т.д.), и инкубировали при 37°C в присутствии 5% CO₂ в течение ночи. Как предложено в настоящей заявке, такие очищенные субпопуляции применимы для оценки экспрессии на клеточной поверхности PD-1 и/или CTLA-4 и для оценки стимулирующей иммунную систему активности биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно изобретению.

2. Выделение МКПК из цельной крови яванского макака или макака-резус.

МКПК яванского макака или макака-резус выделяли из цельной крови, например, с использованием центрифугирования в градиенте Фиколла. Вкратце, цельную кровь разводили в отношении 1:3 в стерильном ФСБ. Разведенную кровь (35 мл) наслаивали на 15 мл 90% раствора Ficoll-Paque™ Plus (90 мл фиколла + 10 мл ФСБ) в 50 мл полипропиленовой центрифужной пробирке и центрифугировали при 931 × g (2000 об./мин) в течение 30 минут при комнатной температуре с торможением. Лейкоцитарную пленку между двумя фазами собирали и переносили в чистую пробирку на 50 мл и промывали 45 мл ФСБ посредством центрифугирования пробирок при 600 × g (1620 об./мин) в течение 5 минут. Супернатант выливали и осадок промывали 3х ФСБ. МКПК яванских макаков или макаков-резус затем ресуспендировали в 30 мл полной питательной среды и количество жизнеспособных клеток определяли с помощью исключения красителя трипанового синего.

Конкретные субпопуляции иммунных клеток можно легко выделить из МКПК примата, не представляющего собой человека, с применением коммерческого набора для получения указанных субпопуляций (например, наборов для выделения пан- Т-клеток, CD4+ Т-клеток и CD4+/CD25+ регуляторных Т-клеток (Miltenyl Biotech)), в соответствии с инструкциями изготовителя. В качестве альтернативы, можно применять сортировку на основе проточной цитометрии с применением специфичных mAb приматов, не представляющих собой людей, или кросс-реактивных mAb для сортировки.

3. Получение незрелых или зрелых дендритных клеток человека миелоидного происхождения (mDC) из выделенных моноцитов человека.

Моноциты человека выделяли из полученных от донора очищенных МКПК с применением коммерческого набора для их получения, например, набора для получения моноцитов человека Untouched™ (Life Technologies/ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями изготовителя. Запускали дифференцировку выделенных моноцитов человека в незрелые мДК человека путем их культивирования (например, в минимальной эссенциальной среде альфа с нуклеозидами (α MEM) с добавлением 2% АВ-отрицательной сыворотки человека и 1% пенициллина/стрептомицина) в течение 5-7 дней в присутствии рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (например, hGM-CSF; Peprotech, 100 нг/мл) и рекомбинантного интерлейкина-4 человека (hIL-4; Peprotech, 40 нг/мл). Незрелые мДК собирали и промывали ФСБ посредством центрифугирования пробирок при 600 × g (1620 об./мин) в течение 5 минут для использования в качестве стимулирующих клеток в анализе аллогенной реакции смешанной культуры лимфоцитов (алло-СКЛ), таком как анализы, описанные ниже.

В конкретных экспериментах с использованием алло-СКЛ дифференцировку незрелых мДК индуцировали путем добавления TNF α или коктейля дополнительных цитокинов (IFN γ , IL-1 β) и митогенов (ЛПС) в течение двух дополнительных дней культивирования (см. например, Han, T. (2009) "Evaluation of 3 Clinical Dendritic Cell Maturation Protocols Containing LPS and IFN-gamma", J Immunother 32:399). Чистоту, степень созревания и активацию мДК можно оценивать с помощью проточной цитометрии с применением одного или более из следующих антител: анти-CD14, анти-CD80, анти-CD83, анти-CD86, анти-HLA-DR и подходящих контролей изотипов. Данные проточной цитометрии в ходе такой оценки можно получать на приборе FACSCalibur/Fortessa (Becton Dickinson/BD Biosciences) и анализировать с помощью программы FlowJo software (TreeStar).

4. Экспрессия PD-1 и CTLA-4.

Клетки, экспрессирующие PD-1 и/или CTLA-4, могут быть созданы с применением способов, известных в данной области техники. Например, клетки (такие как NSO, Jurkat, CHO и т.д.) могут быть получены таким образом, чтобы они экспрессировали PD-1 и/или CTLA-4, с применением ретровирусных векторов, содержащих подходящий ген (например, гена PD-1). В качестве альтернативы, клетки иммунной системы можно стимулировать для индукции или повышения экспрессии PD-1 и/или CTLA-4. Вкратце, очищенные клетки иммунной системы (например, МКПК, Т-клетки, дендритные клетки и т.д.) выделяли, как описано выше, культивировали в течение 2-6 дней в присутствии или в отсутствие митогена и оценивали экспрессию PD-1 и/или CTLA-4 в необработанных (наивных) и стимулированных клетках, например, с использованием проточной цитометрии. Коммерческие антитела против PD-1 и антитела против CTLA-4 можно применять для предварительной оценки паттерна экспрессии в наивных клетках и в ответ на стимуляцию митогена. Дополнительно или необязательно можно применять биспецифичные в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы согласно изобретению.

Митогены, которые можно применять для таких исследований, хорошо известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются следующими: гранулы CD3/CD28, липополисахариды (ЛПС), энтеротоксин типов А-Е Staphylococcus aureus (например, SEB), форбол миристат ацетат (PMA),

фитогемагглютинин (РНА), конканавалин А (сopA), митоген лаконоса (PWM) и т.д. Митоген (митогены), идентифицированный как вызывающий/повышающий экспрессию PD-1 и/или CTLA-4, можно применять в функциональных анализах для оценки стимулирующей активности биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно настоящему изобретению. См., например, анализы "SEB" и "СКЛ", описанные в настоящей заявке.

В. Анализы связывания.

Иммунологические анализы, которые можно применять для анализа иммуноспецифичного связывания с молекулами PD-1 или CTLA-4, кросс-реактивности связывания или взаимодействий Fc-FcγR включают, но не ограничиваются следующими, конкурентные и не конкурентные аналитические системы с применением методов, таких как Вестерн блоттинг, радиоиммунологические анализы, твердофазный ИФА (твердофазный иммунологический анализ), иммунологический анализ по типу "сэндвич", анализы иммунопреципитации, реакции преципитации, реакции диффузной преципитации в геле, иммунохроматографические анализы, иммунодиффузионные анализы, реакции агглютинации, анализ фиксации комплемента, радиоиммунные анализы, флуоресцентные иммунологические анализы и иммунологические анализы на основе белка А и т.д. (см. например, Ausubel et al., 2008, Current Protocols in Molecular Biology). Аффинность связывания с антигеном-мишенью, как правило, измеряют или определяют с помощью стандартных анализов антитело-антиген, таких как конкурентные анализы Biacore, анализы насыщения или иммунологические анализы, такие как твердофазный ИФА или РИА. Сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS) с применением методов, известных специалисту в данной области техники, использовали для иммунологических или функциональных анализов для характеристики биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно изобретению.

Например, МКПК можно получать, как описано выше. В случае, когда желаемые подтипы иммунных клеток (например, Т-регуляторные, Т-хелперные, АПК и т.д.) можно выделить из очищенных МКПК, в указанных выделенных клетках затем оценивают экспрессию PD-1 и CTLA-4 для различных подтипов клеток (например, Т-регуляторных, Т-хелперных, АПК и т.д.) путем совместного окрашивания и анализа путем сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS), как описано ниже.

1. Связывание с клеточной поверхностью (анализ насыщения).

Способность биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул связываться с PD-1 и/или CTLA-4, экспрессируемыми на клеточной поверхности, можно измерить в анализах на основе насыщения/разведения с применением клетки, которая экспрессирует PD-1 и/или CTLA-4 (клетки-мишени). Такие клетки могут представлять собой клетки иммунной системы, стимулированные таким образом, чтобы они экспрессировали PD-1 и/или CTLA-4, или клеточную линию (например, клетки NSO), полученную таким образом, чтобы она стабильно экспрессировала на повышенном уровне молекулы PD-1 и/или CTLA-4. Вкратце, культивируемые клетки-мишени (например, клетки NSO с экспрессией PD1⁺) собирали и ресуспендировали (например, в концентрации примерно 5×10^6 клеток/мл) в блокирующем буфере (например, FACS-буфере с добавлением 10% сыворотки АВ человека). Биспецифичную в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулу, антитело против PD-1, антитело против CTLA-4 или комбинацию антитела против PD-1 и антитела против CTLA-4 готовили для разведения в отдельном титрационном микропланшете, начиная с одинаковых молярных концентраций (например, 20 нМ в общем объеме 200 мкл), и затем осуществляли серийное разведение (например, 1:4, 1:5, 1:10 и т.д.) 5-12 раз для получения 5-12-точечной кривой. Максимальная начальная концентрация во всех экспериментах определялась опытным путем. Одинаковый объем (например, 50 мкл) каждого разведения добавляли в новый титрационный микропланшет и клетки-мишени добавляли в каждую лунку (например, в концентрации $0,25 \times 10^6$ клеток на лунку) и инкубировали (например, при 4-25°C в течение 30-120 минут). Клетки промывали 1-3 раза (например, титрационный микропланшет откручивали при $600 \times g$ (1620 об./мин) в течение 5 минут и затем промывали в блокирующем буфере и снова откручивали) и ресуспендировали в блокирующем буфере. Для вторичного окрашивания выбирали подходящий вторичный реагент, например, козы Fc-специфичные антитела против иммуноглобулина человека, конъюгированные с APC, можно применять для выявления человеческих первичных антител, в то время как козы Fc-специфичные IgG против иммуноглобулина мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 647, использовали для выявления мышинных первичных антител. Выбранный вторичный реагент разводили в блокирующем буфере и на основе концентрации каждого отдельного вторичного реагента готовили стоковый раствор и смесь вторичного реагента в одинаковом объеме на лунку аликвотировали в отдельные лунки и инкубировали (например, при 4-25°C в течение 30-120 минут). Клетки промывали, как описано выше, и ресуспендировали в блокирующем буфере. Окрашенные клетки анализировали с помощью проточной цитометрии. Данные проточной цитометрии можно получать на приборе FACSCalibur/Fortessa (Becton Dickinson/Fortessa), анализировать в виде средней интенсивности флуоресценции с применением программы FlowJo software (TreeStar) и наносить на график и нормировать с использованием функции "log(агонист) - эффект -переменный наклон (четыре параметра)" в программе Prism6 (Graphpad).

2. Анализы связывания рецептор/лиганд и сигнального пути.

Анализы, которые можно применять для оценки способности биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно изобретению модулировать (например, блокировать, ингибировать, стимулировать и т.д.) связывание лиганда и сигнальные пути, описаны более подробно ниже.

а. Связывание рецептор PD-1/лиганд.

Способность биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул ингибировать связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2 можно оценить с использованием клеток, которые экспрессируют PD-1 (клеток-мишеней). Такие клетки могут представлять собой клетки иммунной системы, стимулированные таким образом, чтобы они экспрессировали PD-1, или клеточную линию, полученную таким образом, чтобы она экспрессировала молекулы PD-1, например, NSO-клетки, трансфицированные с помощью ретровируса геном PD-1 человека. Вкратце, экспрессирующие PD-1 клетки (например, NSO/PDCD1 (NSO-PD1⁺)) собирали и ресуспендировали (например, в концентрации примерно $1,5 \times 10^6$ клеток/мл) в блокирующем буфере (например, FACS-буфер с добавлением 10% сыворотки АВ человека) и высевали на титрационный микропланшет (например, в концентрации $0,25 \times 10^6$ клеток на лунку). Биспецифичную в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулу, антитело против PD-1, антитело против CTLA-4 или комбинацию антитела против PD-1 и антитела против CTLA-4 готовили для разведения в отдельном титрационном микропланшете, начиная с одинаковой молярной концентрации (например, 20 нМ в общем объеме 200 мкл) и осуществляли серийные разведения (например, 1:4, 1:5, 1:10 и т.д.) 5-12 раз для получения 5-12-точечной кривой. Максимальную начальную концентрацию во всех экспериментах определяли эмпирическим путем. Одинаковый объем (например, 50 мкл) каждого разведения добавляли в каждую лунку титрационного микропланшета, содержащего клетки-мишени. Для оценки ингибирования связывания PD-L1 в каждую лунку добавляли растворимый гибридный белок PD-L1 (например, hPD-L1 (B7H1) TEV-hIgG1-Fc-биотин (Ancell)), за исключением неокрашенных лунок отрицательного контроля, и инкубировали (например, при 4-25°C в течение 30-120 минут). Для оценки ингибирования связывания PD-L2 в каждую лунку добавляли растворимый гибридный блок PD-L2 (например, CD273 (PD-L2) muIgG/биотин (Ancell)), за исключением неокрашенных лунок отрицательного контроля, и инкубировали (например, при 4-25°C в течение 30-120 минут). Клетки промывали 1-3 раза (например, титрационный микропланшет откручивали при $600 \times g$ (1620 об./мин) в течение 5 минут и затем промывали блокирующим буфером и снова откручивали). Клетки ресуспендировали в блокирующем буфере. Добавляли подходящий вторичный реагент (за исключением неокрашенных лунок отрицательного контроля) для выявления гибридного белка PD-L1 или PD-L2 (например, стрептавидин-РЕ меченный вторичный реагент (eBiosciences)) и инкубировали (например, при 4-25°C в течение 15-120 минут). Клетки промывали, как описано выше, и ресуспендировали в блокирующем буфере. Окрашенные клетки можно анализировать с помощью проточной цитометрии. Данные проточной цитометрии можно получать на приборе FACSCalibur/Fortessa (Becton Dickinson/Fortessa) и анализировать снижение средней интенсивности флуоресценции меченных sPD-L1 или sPD-L2 в присутствии биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул, антитела против PD-1, антитела против CTLA-4 или комбинации антитела против PD-1 и антитела против CTLA-4 с применением программы FlowJo software (TreeStar) и наносить на график и нормировать с использованием функции "log(агонист) - эффект - переменный наклон (четыре параметра)" в программе Prism6 (Graphpad).

б. Связывание рецептор/лиганд CTLA-4.

Способность биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул ингибировать связывание CTLA-4 с CD80 и/или CD86 можно оценить с применением клеток, которые экспрессируют CTLA-4 (клетки-мишени). Такие клетки могут представлять собой клетки иммунной системы, стимулированные таким образом, чтобы они экспрессировали CTLA-4, или клеточную линию, полученную таким образом, чтобы она экспрессировала CTLA-4, например, NSO-клетки, трансфицированные с помощью ретровируса геном CTLA-4 человека. Вкратце, экспрессирующие CTLA-4 клетки собирали и ресуспендировали в блокирующем буфере (например, FACS-буфере с добавлением 10% сыворотки АВ человека) и высевали на титрационный микропланшет (например, в концентрации $0,25 \times 10^6$ - $1,0 \times 10^6$ клеток на лунку). Биспецифичную в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулу, антитело против PD-1, антитело против CTLA-4 или комбинацию антитела против PD-1 и антитела против CTLA-4 готовили для разведения в отдельном титрационном микропланшете, начиная с одинаковой молярной концентрации (например, 20 нМ в общем объеме 200 мкл) и осуществляли серийные разведения (например, 1:4, 1:5, 1:10 и т.д.) 5-12 раз для получения 5-12-точечной кривой. Максимальную начальную концентрацию во всех экспериментах определяли эмпирическим путем. Каждое разведение в одинаковом объеме (например, 50 мкл) добавляли в каждую лунку титрационного микропланшета, содержащего клетки-мишени. Для оценки ингибирования связывания CD80 в каждую лунку, за исключением неокрашенных лунок отрицательного контроля, добавляли растворимый гибридный белок CD80 (например, hCD80-muIg-биотин (ADIPOGEN®)) и инкубировали (например, при 4-25°C в течение 30-120 минут). Для оценки ингибирования связывания CD86 в каждую лунку, за исключением неокрашенных лунок отрицательного контроля, добавляли растворимый CD86 гибридный белок (например, hCD86-muIg-биотин (ADIPOGEN®)) и инкубировали (например, при 4-25°C в течение 30-120 минут). Клетки промывали 1-3 раза (например, титрационный микропланшет откручивали при $600 \times g$ (1620 об./мин) в течение 5 минут и затем промывали блокирующим буфером и снова откручивали). Клетки ресуспендировали в блокирующем буфере. Добавляли подходящий вторичный реагент для выявления CD80 или CD86 гибридного белка (например, стрептавидин-РЕ меченные

вторичные (eBiosciences)), за исключением неокрашенных лунок отрицательного контроля, и инкубировали (например, при 4-25°C в течение 15-120 минут). Клетки промывали, как описано выше, и ресуспендировали в блокирующем буфере. Окрашенные клетки можно анализировать с помощью проточной цитометрии. Данные проточной цитометрии можно получать с помощью системы FACSCalibur/Fortessa (Becton Dickinson/Fortessa) и анализировать снижение средней интенсивности флуоресценции меченных CD86 или CD80 в присутствии биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул, антитела против PD-1, антитела против CTLA-4 или комбинации антитела против PD-1 и антитела против CTLA-4 с применением программы FlowJo software (TreeStar) и наносить на график и нормировать с использованием функции "log(агонист) - эффект - переменный наклон (четыре параметра)" в программе Prism6 software (Graphpad).

С. Репортерные анализы.

Функциональную активность биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул в блокировании взаимодействия PD-1 с PD-L1 можно оценивать с применением коммерчески доступной репортерной системы, разработанной компанией Promega, в соответствии с рекомендациями изготовителя. Вкратце, использовали две клеточные линии, созданные таким образом, чтобы они функционировали либо в качестве стимулирующей линии, либо в качестве репортерной клеточной линии. Стимулирующую линию создавали из исходной линии CHO таким образом, чтобы она экспрессировала молекулы PD-L1 и Т-клеточный активатор, который представляет собой связанное с мембраной mAb-агонист против CD3 [клетки CHO/PDL1]. Репортерную клеточную линию создавали из исходной линии клеток CD3⁺ Jurkat таким образом, чтобы указанная линия экспрессировала люциферазную репортерную конструкцию под контролем транскрипции ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) [клетки NFAT-luc2/PD-1 Jurkat]. При совместном культивировании вместе анти-CD3 агонист, экспрессируемый на клеточной линии CHO-PDL1, запускает экспрессию люциферазы через путь передачи сигнала NFAT, опосредованную вовлечением сигнального комплекса TCR/CD3, присутствующего в клеточной линии Jurkat-NFAT-luc/PD-1. В отсутствие антител против PD-1 или PD-L1 люцифераза экспрессируется на уровне, обусловленном активностью сигнального пути TCR/CD3, но подавляется или ингибируется при наличии пути PD-1/PD-L1, который действует как "тормоз". В присутствии молекул, которые ингибируют сигнальный путь PD-1/PD-L1 (например, антитела против PD-1 или PD-L1), этот ингибирующий путь, или "тормоз", выключается, позволяя повышение экспрессии люциферазы, которое можно измерить. Соответственно, ингибирующую PD-1 активность биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул можно оценивать путем культивирования клеток CHO/PDL1 с NFAT-luc2/PD1 Jurkat (3H-D5). Вкратце, клетки CHO-PDL1 высевали на титрационный микропланшет (например, в концентрации $4,0 \times 10^4$ клеток на лунку) и культивировали в течение ночи (например, в среде RPMI, содержащей 10% ЭБС и 100 мкг/мл гигромицина В и 500 мкг/мл G418). На следующий день готовили аналитический буфер (например, среду RPMI с добавлением 2% ЭБС) и серийные разведения биспецифичной в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы или антитела против PD-1 в аналитическом буфере, включающие 5-12 точек, с максимальным разведением при одинаковом молярном эквиваленте (например, 100-200 нМ) и получали 5-12 серийных разведений (например, 1:4, 1:5, 1:10 и т.д.). На следующем этапе часть культуральной среды удаляли из титрационного микроплшета, содержащего адгезивные клетки CHO/PDL1, и аликвоты каждого разведения добавляли к указанным клеткам CHO/PDL1. Культивируемые клетки NFAT-luc2/PD-1 Jurkat собирали и ресуспендировали в аналитическом буфере и добавляли (например, в концентрации $5,0 \times 10^4$ клеток на лунку в объеме 40 мкл на лунку) к клеткам CHO/PDL1. Культуры совместно инкубировали (например, в течение 6 часов при 37°C). В конце инкубирования восстанавливали субстрат Bio-Glo (Promega) и добавляли в титрационный микропланшет комнатной температуры. После инкубирования (например, в течение 5-10 минут) считывали оптическую плотность каждой лунки на многоканальном считывателе для планшетов VICTOR™ X4 (Perkin Elmer #2030-0040) при длине волны 450 нм с получением значений в относительных единицах люминесценции (RLU) в качестве выходных данных. Данные затем можно наносить на график и нормировать с использованием функции "log(агонист) - эффект - переменный наклон (четыре параметра)" с помощью программы Prism6 (Graphpad).

Сходные репортерные анализы доступны для сигнального пути CTLA-4 (например, CTLA-4 Blockade Bioassay Kit (Promega)) и/или могут быть легко созданы для оценки функциональной активности биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул в блокировании взаимодействий CTLA-4 с помощью соответствующего лиганда (лигандов).

Д. Анализы иммунномодулирующей активности.

Анализы, которые можно применять для оценки иммунномодулирующей активности биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно изобретению, включают анализы митогенной стимуляции, такие как "SEB"-анализ, описанный выше, и анализ реакции в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ), такой как анализы, описанные более подробно ниже. Ожидается, что способность биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно изобретению модулировать ингибирующие пути как PD-1, так и CTLA-4, будет приводить к усиленной стимуляции в анализах по сравнению с антителом против PD1 и антителом против CTLA-4 отдельно или в комбинации.

МКПК или Т-клетки выделяли из крови здорового донора (доноров) - из крови одного и того же пациента (аутологичные клетки) или неродственных пациентов (аллогенные клетки) - посредством центрифугирования в градиенте фикола Ficoll-Paque™, как описано выше, и ресуспендировали в полной питательной среде. Для анализов с помощью алло-СКЛ, в которых используются мДК, моноциты очищали и дифференцировали, как описано выше. Для одностороннего (однаправленного) анализа с помощью реакции алло-СКЛ клетки-респондеры (например, МКПК) сокультивировали со стимулирующими клетками в титрационном микропланшете. В зависимости от контекста, стимулирующие клетки представляли собой дендритные клетки (ДК), аутологичные МКПК (для реакции ауто-СКЛ, т.е. отрицательный контроль) или аллогенные МКПК (для реакции алло-СКЛ, т.е. положительный контроль). Отношение клетки-респондеры:стимулирующие клетки, как правило, составляет 1:1 или 2:1, но может варьировать. Сокультивирование осуществляли в присутствии одинакового молярного количества биспецифичной в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулы, антитела против PD-1, антитела против CTLA-4, комбинации антитела против PD-1 и антитела против CTLA-4 или соответствующих изотипов mAb в серийных разведениях (например, 1:4 1:5, 1:10 и т.д.). Серийные разведения антитела можно приготовить, как описано выше. Кроме того, контрольные популяции клеток одного типа, стимулированные с добавлением или без добавления mAb против CD3 +/-CD28, можно применять в качестве контролей в таких экспериментах. Стимулирующие клетки (стимуляторы) предварительно облучали (например, при 45 Грей [Gy] (4500 рад) с применением аппарата для облучения Gammacell® 3000 Elan Blood/Cell Irradiator (Theratronics)) для предотвращения пролиферации указанных стимулирующих клеток и возможности измерения пролиферации только респондерной клетки (респондера). Через 5-7 суток (время корректируют для обеспечения экспрессии PD-1 и CTLA-4 во время анализа), добавляли [³H]-тимидин (например, 1 мКи/лунку (Perkin Elmer)) на дополнительные 18-48 часов. Измеряли радиоактивность включенной в ДНК метки (например, с помощью β-сцинтилляционного счётчика TOPCount NXT (Perkin Elmer)). Результаты выражали либо как среднее число импульсов в минуту (cpm), либо как коэффициент стимуляции (SI), что позволяло сравнивать результаты от различных доноров. SI рассчитывали следующим образом: среднее число импульсов в минуту (cpm) для стимулированных клеток, деленное на среднее cpm для нестимулированных клеток. Ответы в СКЛ считали положительными, когда SI составлял ≥3 для вызванной МКПК стимуляции и SI ≥ 6 для вызванной ДК стимуляции. В качестве альтернативы, пролиферацию можно измерять с применением анализа пролиферации на основе CEFSE (Boks, M.A., et al. (2010) "An optimized CFSE based T-cell suppression assay to evaluate the suppressive capacity of regulatory T-cells induced by human tolerogenic dendritic cells," *Scand J Immunol* 72:158-168).

Дополнительные анализы с помощью реакции СКЛ, которые можно применять для оценки стимулирующей иммунную систему активности биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно изобретению, известны в данной области техники. См., например, Davies, J.K. et al. (2011) "Induction of alloantigen-specific anergy in human peripheral blood mononuclear cells by alloantigen stimulation with co-stimulatory signal blockade" *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (49), 2673; Kruisbeek, A.M., et al. (2004) "Proliferative Assays for T cell Function", *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, 60:111:3.12.1-3.12.20; Wallgren, A.C. et al. (2006) "The Direct Pathway Of Human T-Cell Allorecognition Is Not Tolerized By Stimulation With Allogeneic Peripheral Blood Mononuclear Cells Irradiates With High-Dose Ultraviolet" *Ba. Scand J of Immunol* 63:90-96; Levitsky, J. et al. (2009) "The Human 'Treg MLR' Immune Monitoring for Foxp3+ T regulatory cell generation, *Transplantation* 88:1303-11.

Е. Противоопухолевые анализы *in vivo*.

Противоопухолевую активность биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул согласно изобретению можно оценивать на различных животных моделях, известных в данной области техники. Ожидается, что лечение биспецифичными в отношении PD-1 x CTLA-4 молекулами согласно изобретению будет ингибировать образование опухоли и/или рост опухоли в большей степени по сравнению с лечением антителом против PD1 и антителом против CTLA-4 отдельно или комбинацией таких антител.

В частности, можно применять мышинные модели опухолевых ксенотрансплантатов. Вкратце, мышам имплантируют линию раковых клеток или интересующие опухолевые клетки и лечат с помощью (i) биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул, (ii) антитела против PD-1, (iii) антитела против CTLA-4, (iv) комбинации антитела против PD-1 и антитела против CTLA-4 и (vi) контроля с отсутствием лечения, который может представлять собой отдельно наполнитель и/или нерелевантное антитело. Лечение можно начинать до имплантации (например, за 1 день (т.е. -1 сутки)); в день имплантации (т.е. 0 сутки) или после формирования опухоли (например, 7 сутки). Животным можно проводить один курс лечения или несколько курсов лечения (например, каждую неделю после имплантации). За животными наблюдают в течение продолжительного времени для определения *in vivo* эффекта указанных молекул на формирование и/или рост опухоли. За ростом опухолей можно следить путем их измерения и определения объема (высота × ширина × длина). Подверженных лечению животных, у которых наблюдается полная регрессия опухоли, можно применять для оценки опухоль-специфичного иммунного ответа путем повторной стимуляции с использованием тех же или опухолевых клеток и нерелевантных опухолевых клеток в качестве контроля. Кроме того, указанные модели можно модифицировать с обеспечением спо-

соба лечения, комбинированного со стандартными методами лечения, такими как химиотерапия, лучевая терапия и т.д.

Множество раковых клеточных линий, которые можно трансплантировать и использовать на таких моделях ксенотрансплантата, известно в данной области техники. Указанные линии включают, но не ограничиваются следующими: клетки рака толстой и прямой кишки MDST8, SW480 и SW620; клетки рака желудка AGS; клетки меланомы UACC-62, A2058 и LOX IMVI; клетки рака предстательной железы 22rv; клетки рака поджелудочной железы AsPC-1 и BxPc-3; клетки рака почки Caki-1, A498 и 786-0; клетки рака мочевого пузыря HT-1197; клетки рака молочной железы 4T1, MDA-MB-231; клетки рака легких A549, WX322; клетки фибросаркомы HT1080; клетки HBL-2 мантийноклеточной лимфомы человека; клетки лимфомы Беркитта Raji. В частности, предпочтительными являются модели полученного от пациента ксенотрансплантата (PDX). Такие раковые клеточные линии или полученные от пациента опухоли трансплантируют линейным мышам с иммунодефицитом (например, мышам Nude, мышам Scid, мышам NOD, нулевым по Rag 1 мышам и т.д. (см. например, Belizario, J.E., (2009) "Immunodeficient Mouse Models: An Overview" Bentham Open 1874-2262/09) или гуманизированным мышам, таким как трансгенные мыши с HLA-A2 человека (см. например, Shultz, L.D., et al. (2012) "Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges" Nature Rev Immunol 12:786-798), как описано выше. Кроме того, для оценки молекул, модулирующих контрольные точки иммунного ответа, мышам с иммунодефицитом можно трансплантировать компоненты иммунной системы человека (например, восстанавливать иммунную систему с помощью МПКК, стволовых клеток, прогениторных иммунных клеток человека и т.д.) до или одновременно с имплантацией желаемых опухолевых клеток и лечением, как подробно описано выше.

Пример 5. Исследования связывания биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул.

Создавали несколько биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул, включая содержащие Fc-фрагмент диатела и содержащие Fc-фрагмент тривалентные молекулы, имеющие четыре полипептидные цепи. Создавали три диатела, имеющие четыре полипептидные цепи и содержащие домены E/K-coil, способствующие образованию гетеродимера, и обозначали их как "DART B", "DART C" и "DART D". Создавали одно диатело, имеющее четыре цепи и содержащее домены CH1/CL, и обозначали его как "DART E." Создавали две тривалентные связывающие молекулы, имеющие четыре цепи и содержащие домены E/K-coil, способствующие образованию гетеродимера, и домены CH1/CL, и обозначали указанные молекулы как "TRIDENT A" и "TRIDENT B".

Кроме того, было создано несколько антител, обладающих специфичностью в отношении PD-1 или CTLA-4. Создавали одно антитело, специфичное в отношении PD-1, и обозначали его как "PD-1 mAb 6 G4P". Создавали три антитела, специфичных в отношении CTLA-4, и обозначали их как "CTLA-4 mAb 1", "CTLA-4 mAb 3 G1AA" и "CTLA-4 mAb 3 G4P".

Структура и аминокислотные последовательности указанных биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул, антител против PD-1, антител против CTLA-4 представлены выше и суммированы в табл. 9 ниже.

Таблица 9					
Название	Вариабельные участки	Fc [‡]	цепи	SEQ ID NO:	Другие компоненты
DART B	CTLA-4 mAb 1 PD-1 mAb 6-ISQ	IgG4 (YTE)	1	95	Домены E/K-coil; см. Фигуру 3B
			2	96	
			3	95	
			4	96	
DART C	CTLA-4 mAb 3 PD-1 mAb 6-ISQ	IgG4	1	97	Домены E/K-coil; см. Фигуру 3B
			2	98	
			3	97	
			4	98	
DART D	PD-1 mAb 6-ISQ CTLA-4 mAb 3	IgG4 (YTE)	1	99	Домены E/K-coil; см. Фигуру 3B
			2	100	
			3	99	
			4	100	
DART E	CTLA-4 mAb 3 PD-1 mAb 6-ISQ	IgG4 (YTE)	1	102	CL/CH1; см. Фигуру 3C
			2	103	
			3	102	
			4	103	
DART F	PD-1 mAb 6-ISQ CTLA-4 mAb 3	IgG1 (AA/YTE)	1	101	Домены E/K-coil; см. Фигуру 3B
			2	100	
			3	101	
			4	100	

TRIDENT A	PD-1 mAb 6-ISQ CTLA-4 mAb 3	IgG4 (YTE)	1	104	Домены E/K-coil и CL/CH1; см. Фигуру 6A
			2	105	
			3	106	
			4	107	
TRIDENT B	PD-1 mAb 6-ISQ CTLA-4 mAb 3	IgG1 (AA/YTE)	1	108	Домены E/K-coil и CL/CH1; см. Фигуру 6A
			2	105	
			3	109	
			4	107	
PD-1 mAb 6 G4P	PD-1 mAb 6-ISQ	IgG4	1	88	природная структура антитела
			2	89	
			3	88	
			4	89	
CTLA-4 mAb 1	CTLA-4 mAb 1 (копия ипилимумаба)	IgG1	4	**	природная структура антитела
CTLA-4 mAb 3 G1AA	CTLA-4 mAb 3	IgG1 (AA)	1	92	природная структура антитела
			2	94	
			3	92	
			4	94	
CTLA-4 mAb 3 G4P	CTLA-4 mAb 3	IgG4	1	93	природная структура антитела
			2	94	
			3	93	
			4	94	

‡ Молекулы, содержащие Fc-фрагменты IgG4, также включают стабилизированную шарнирную область IgG4.

** Такая же аминокислотная последовательность, как у ипилимумаба (см., например, базу данных 3D и 2D структур IMGT, номер доступа 8568_H и 8568_L).

Дополнительные биспецифичные в отношении PD-1 х CTLA-4 молекулы, содержащие альтернативные сайты связывания эпитопа PD-1 и/или CTLA-4, можно легко создавать путем включения различных VH- и VL-доменов. Аналогично, могут быть созданы молекулы, содержащие альтернативные линкеры, Fc-фрагменты и/или имеющие альтернативные структуры, как предложено в настоящей заявке (см. например, табл. 8).

А. Исследования связывания с помощью твердофазного ИФА.

Исследования с помощью твердофазного ИФА проводили для измерения связывания связывающих молекул в серийных разведениях (антитело CTLA-4 mAb 3 G4P, DART D, TRIDENT A или DART B) с растворимым hCTLA-4-Avi-His (1 мкг/мл) или hPD-1-His (1 мкг/мл), который был нанесен на планшеты-подложки. Козьи Fc-специфичные антитела против иммуноглобулина человека, конъюгированные с HRP, (1:10,000) использовали в качестве вторичной детектирующей молекулы для выявления связывания. Результаты такого исследования показаны в табл. 10 и на фиг. 8A-8B. Данные показывают, что связывание с PD-1 и CTLA-4 биспецифичных в отношении PD-1 х CTLA-4 молекул, содержащих два сайта связывания для PD-1 и CTLA-4 (например, DART D и DART B), было сходно со связыванием их соответствующих исходных антител против PD-1 и против CTLA-4. Связывание с PD-1 биспецифичных в отношении PD-1 х CTLA-4 молекул, содержащих два сайта связывания для PD-1 и один сайт связывания для CTLA-4 (например, TRIDENT A), было сходно со связыванием исходного антитела против PD-1, а связывание с CTLA-4 было понижено по сравнению со связыванием исходного антитела в связи со сниженной авидностью тривалентной молекулы, содержащей только один сайт связывания для CTLA-4. Сходные результаты связывания наблюдались для DART F и TRIDENT B, содержащих CH1 IgG1 и/или (AA/YTE) Fc-фрагменты IgG1.

Таблица 10		
Конструкт	EC ₅₀ для связывания CTLA-4 (нМ)	EC ₅₀ для связывания PD-1 (нМ)
CTLA-4 mAb 3 G4P	0.4	N/A
PD-1 mAb 6 G4P	N/A	0.3
DART D	0.4	0.3
TRIDENT A	1.0	0.4
DART B	0.4	0.4

Эффект изменения распределения и соединения доменов на связывание исследовали путем инкубирования биспецифичных в отношении PD-1 х CTLA-4 молекул, содержащих домены связывания CTLA-4 антитела CTLA-4 mAb 1 (например, DART B) и CTLA-4 mAb 3 (например, DART C и DART D) в присутствии растворимого PD-1 человека (фиг. 8C) или растворимого CTLA-4 человека-Avi-His (фиг. 8D), которые наносили на планшеты-подложки. Козьи Fcγ-специфичные антитела против иммуноглобулина человека, конъюгированные с HRP, использовали в качестве вторичных детектирующих молекул для выявления связывания с применением хемилюминесцентного субстрата PICO. Результаты показывают, что биспецифичные в отношении PD-1 х CTLA-4 молекулы, содержащие домены связывания CTLA-4 антитела CTLA-4 mAb 1 (например, DART B) и CTLA-4 mAb 3 (например, DART C и DART D), связывались с CTLA-4 сходным образом. Было обнаружено, что связывание с PD-1 или CTLA-4 значительно не изменялось в зависимости от распределения связывающих доменов, т.е. их расположения на первой или второй цепи (для сравнения - связывание DART C и DART D).

В. Исследования блокирования с помощью твердофазного ИФА.

Проводили серию твердофазных ИФА для оценки способности биспецифичных молекул согласно изобретению блокировать связывание лиганда с PD-1 и CTLA-1, отдельно и в комбинации. Блокирова-

ние связывания PD-L1 с PD-1 оценивали в присутствии равного количества нерелевантного антигена и равного количества CTLA-4. Планшеты покрывали смесью меченного гистидином (His) растворимого PD-1 человека (shPD-1) и меченного His нерелевантного антигена (irrAg), 1:1, (2 мкг/мл каждого) или смесью shPD-1 и меченного His растворимого CTLA-4 человека (shCTLA-4), 1:1, (2 мкг/мл каждого). PD-1 mAb 6 G4P, DART D, TRIDENT A или контрольную молекулу TRIDENT (содержащую два сайта связывания для RSV и один сайт связывания для CTLA-4) в указанной концентрации предварительно смешивали в течение 5 мин с меченым биотином PD-L1 в концентрации 6 мкг/мл и добавляли в планшеты. Связывание PD-L1 выявляли с применением конъюгированного с HRP стрептавидина (1:3,000). Результаты оценки представлены на фиг. 9А-9В. Было обнаружено, что все из исследованных связывающих PD-1 молекул были способны ингибировать связывание PD-L1 с PD-1.

Блокирование связывания B7-1 с CTLA-4 оценивали в присутствии равного количества нерелевантного антигена и равного или большего в четыре раза количества PD-1. Планшеты покрывали смесью shCTLA-4 и irrAg (2 мкг/мл каждого), 1:1, смесью shCTLA-4 shPD-1 (2 мкг/мл каждого), 1:1, или смесью shCTLA-4 (0,8 мкг/мл) и shPD-1 (3,2 мкг/мл), 1:4. PD-1 mAb 6 G4P, DART D, TRIDENT A, CTLA-4 mAb 3 G4P или контрольную молекулу в указанной концентрации предварительно перемешивали в течение 5 мин с меченым биотином B7-1 в концентрации 0,2 мкг/мл и добавляли в планшеты. Связывание B7-1 выявляли с применением конъюгированного с HRP стрептавидина (1:3,000). Результаты оценки представлены на фиг. 9С-9Е. Было обнаружено, что все из исследованных связывающих CTLA-4 молекул были способны ингибировать связывание B7-1 с CTLA-4. Было обнаружено, что блокирование связывания B7-1 молекулой TRIDENT A усиливалось в результате взаимодействия его PD-1-связывающего фрагмента с иммобилизованным PD-1 (для сравнения - контрольная молекула TRIDENT, которая не связывается с PD-1) (фиг. 9D). Более того, было обнаружено, что при отношении CTLA-4:PD-1, составлявшем 1:4, где данные условия лучше имитируют относительный уровень экспрессии, наблюдаемый в стимулированных клетках (см. фиг. 19А), блокирование связывания B7-1 молекулой TRIDENT A дополнительно усиливалось (т.е. кривая TRIDENT A была дополнительно смещена по сравнению с кривой контрольной молекулы TRIDENT, которая не связывается с PD-1) (фиг. 9Е).

Результаты указанных исследований с помощью твердофазного ИФА демонстрируют, что все из исследованных связывающих PD-1 молекул были способны ингибировать связывание PD-L1 с PD-1 (фиг. 9А-9В). Все указанные молекулы являются бивалентными в отношении PD-1 и проявляли сходные профили ингибирования. Все из исследованных CTLA-4-связывающих молекул были способны ингибировать связывание B7-1 с иммобилизованным CTLA-4 (фиг. 9С-9Е), при этом молекулы, содержащие два сайта связывания PD-1 и один сайт связывания CTLA-4, вызывали более сильное ингибирование в присутствии PD-1 (фиг. 9D-9Е). Таким образом, тривалентные молекулы, содержащие единственный сайт связывания CTLA-4, вызывают опосредованное PD-1 блокирование лигандов CTLA-4, демонстрируя, что взаимодействие CTLA-4 можно адаптировать путем корректировки валентности.

С. Исследования BIACORE®.

Аффинность связывания DART A, TRIDENT A и CTLA-4 mAb 1 с CTLA-4 человека и яванского макака исследовали с применением анализа BIACORE®. Вкратце, меченный His растворимый CTLA-4 (внеклеточную часть CTLA-4 человека или яванского макака сливали с содержащим гистидин пептидом) захватывали на иммобилизованные молекулы против пентагистидина (пента-His) и затем молекулы связывания CTLA-4 в различных концентрациях (12,5-200 нМ) пропускали вдоль иммобилизованных белков CTLA-4. Кинетику связывания определяли с помощью анализа BIACORE® (аффинность по модели связывания Ленгмюра 1:1 (одновременная аппроксимация k_a/k_d); или авидность с помощью раздельной аппроксимации кривых k_a/k_d , 1:1). Рассчитанные k_a , k_d и K_D от указанных исследований представлены в табл. 11

Таблица 11						
Молекула	CTLA-4 человека			CTLA-4 яванского макака		
	k_a ($\times 10^5$)	k_d ($\times 10^{-4}$)	K_D (нМ)	k_a ($\times 10^5$)	k_d ($\times 10^{-3}$)	K_D (нМ)
CTLA-4 mAb 1*	6,6	8,9	1,4	10	1,3	1,3
DART D*	2,3	7,1	3,1	3,5	1,7	4,9
TRIDENT A*	1,2	32	26,7	2,5	65	260

* Авидность по раздельной аппроксимации кривых k_a/k_d , 1:1.

‡ Аффинность по модели связывания Ленгмюра, 1:1.

DART D является бивалентным в отношении CTLA-4 и проявляет аффинность связывания с CTLA-4 человека и яванского макака в пределах примерно 2 - 4-кратной аффинности CTLA-4 mAb 1. TRIDENT A, который является моновалентным в отношении CTLA-4, обладает более низкой аффинностью как в отношении CTLA-4 человека, так и CTLA-4 яванского макака, что является ожидаемым с учетом его пониженной авидности.

Аффинность связывания DART A, TRIDENT A, PD-1 mAb 6 G4P и CTLA-4 mAb 3 G1AA с PD-1 человека исследовали с применением анализа BIACORE®. Молекулы связывания захватывали на иммобилизованные F(ab)₂ козы Fc-специфичные антитела против иммуноглобулина человека и затем ме-

ченный His растворимый PD-1 человека в различных концентрациях (6,25-100 нМ) пропускали вдоль иммобилизованных связывающих молекул и кинетику связывания определяли с помощью анализа BIAcore® (аппроксимация кривых связывания с использованием уравнения Ленгмюра, 1:1). Рассчитанные k_a , k_d и KD от указанных исследований представлены в табл. 12 (n.d. - не поддается выявлению).

Таблица 12			
Молекула	PD-1 человека		
	k_a ($\times 10^5$)	k_d ($\times 10^{-4}$)	KD (нМ)
CTLA-4 mAb 3 G1AA	n.d.	n.d.	n.d.
PD-1 mAb 6 G4P	6,2	6,7	1,1
DART D	4,8	8,1	1,7
TRIDENT A	5,2	6,8	1,3

Все из DART A, TRIDENT A, PD-1 mAb 6 G4P являются бивалентными в отношении PD-1 и обладают сопоставимыми аффинностями связывания. Как и ожидалось, CTLA-4 mAb 3 G1AA не проявляло какого-либо поддающегося выявлению связывания с PD-1 человека.

D. Клеточные анализы CTLA-4.

Оценивали связывание DART B, DART D, TRIDENT A, антитела против CTLA-4 CTLA-4 mAb 1, CTLA-4 mAb 3 G4P и контрольного антитела hIgG с клетками CHO, экспрессирующими CTLA-4 яванского макака (супоCTLA-4) или CTLA-4 человека (huCTLA-4). Результаты этой оценки показаны на фиг. 10A-10B. Связывающие молекулы инкубировали в присутствии клеток CHO, которые экспрессировали либо CTLA-4 яванского макака (фиг. 10A), либо CTLA-4 человека (фиг. 10B). Связывание с указанными клетками выявляли с помощью вторичных антител против Fc иммуноглобулина человека. Результаты показывают, что все исследованные молекулы были способны связываться с CTLA-4 человека и яванского макака, экспрессируемым на поверхности клеток CHO. У антител против CTLA-4 наблюдались сходные профили связывания с huCTLA-4; у бивалентных биспецифичных молекул DART B и DART D наблюдалось немного более слабое связывание, а у тривалентной связывающей молекулы TRIDENT A, которая является моновалентной в отношении CTLA-4, наблюдалось более слабое связывание по сравнению с молекулами с более высокой валентностью в отношении CTLA-4. Контрольное антитело не связывалось. Сходные результаты были показаны в случае связывания с супоCTLA-4.

Оценивали связывание DART C, DART D, DART E, TRIDENT A, антител против CTLA-4 CTLA-4 mAb 1, CTLA-4 mAb 3 G1AA и антитела против PD-1 PD-1 mAb 6 G4P с клетками Jurkat, которые экспрессируют на своей поверхности huCTLA-4, но не экспрессируют PD-1. Связывание молекул DART и TRIDENT с CTLA-4 человека выявляли с помощью вторичных Ab против Fc иммуноглобулина человека (FACS-анализ). Результаты оценки показаны в табл. 13 и на фиг. 11A (DART C, DART D, DART E, CTLA-4 mAb 1, CTLA-4 mAb 3 G1AA и PD-1 mAb 6 G4P) и фиг. 11B (CTLA-4 mAb 1, CTLA-4 mAb 3 G1AA, PD-1 mAb 6 G4P и TRIDENT A). Как показано на фиг. 11A-11B, антитело PD-1 не связывалось с CTLA-4, но все исследуемые молекулы связывания CTLA-4 были способны связываться с huCTLA-4, экспрессируемым на поверхности клеток Jurkat. У антител против CTLA-4 наблюдались сходные профили связывания; у бивалентных биспецифичных молекул DART C, DART D и DART E наблюдалось более слабое связывания с клетками Jurkat, а у тривалентной связывающей молекулы TRIDENT A, которая является моновалентной в отношении CTLA-4, наблюдалось более слабое связывание по сравнению с молекулами с более высокой валентностью в отношении CTLA-4.

Таблица 13	
Молекула	EC50 (нМ)
CTLA-4 mAb 1	0,4215
PD-1 mAb 6 G4P	6,557
CTLA-4 mAb 3 G1AA	0,3728
DART E	1,269
DART C	0,7575
DART D	0,8829
TRIDENT A	4,638

Оценивали способность DART D, TRIDENT A и антител против CTLA-4 CTLA-4 mAb 1, CTLA-4 mAb 3 G1AA блокировать лиганды CTLA-4 B7-1 и B7-2. Меченные His производные B7-1 и B7-2 инкубировали в присутствии клеток CTLA-4-Jurkat. Связывание His-B7-1 и His-B7-2 выявляли с применением антител против His. Результаты этой оценки показаны на фиг. 12A (His-B7-1) и фиг. 12B (His-B7-2). Было обнаружено, что все исследуемые молекулы были способны ингибировать связывание B7-1 и B7-2 с CTLA-4, экспрессируемым на поверхности клеток Jurkat. У антител против CTLA-4 наблюдались сходные профили ингибирования; бивалентная биспецифичная молекула DART D была немного менее активным ингибитором, а тривалентная связывающая молекула TRIDENT A, которая является моновалентной в отношении CTLA-4, была менее активной по сравнению с любой из молекул, имеющих более высокую валентность в отношении CTLA-4. Контрольное антитело совсем не вызывало ингибирования. Результаты исследований с помощью твердофазного ИФА, описанных выше, предполагают, что TRIDENT A и сходные молекулы, содержащие два сайта связывания PD-1 и один сайт связывания CTLA-4, могли бы являться более активными ингибиторами в присутствии PD-1.

Анализ репортерного гена на клетках IL-2/Luc Jurkat-CTLA-4 использовали для оценки способности DART C, DART D, TRIDENT A, CTLA-4 mAb 3 G1AA и PD-1 mAb 6 G4P обращать ингибирующий сигнал контрольной точки иммунного ответа CTLA-4, как показано по повышенной экспрессии люциферазы. Клетки IL-2/Luc-Jurkat-CTLA-4, таким образом, инкубировали в присутствии таких молекул (R:S=1:0,3) в течение 30 мин при 37°C, после чего добавляли искусственные антиген-презентирующие клетки Raji и продолжали инкубировать в течение 6 часов. Искусственные антиген-презентирующие клетки активируют комплекс TCR/CD3 на репортерных клетках Jurkat. Результаты оценки показаны на фиг. 13. Все из исследованных молекул связывания CTLA-4 были способны обращать ингибирующий сигнал контрольной точки иммунного ответа CTLA-4, как определено по результатам люциферазного анализа. Молекула TRIDENT A, которая является моновалентной в отношении CTLA-4, была менее активной в этом анализе по сравнению с любой из молекул, имеющих более высокую валентность в отношении CTLA-4. Контрольное антитело совсем не вызывало ингибирования. Результаты исследования с помощью твердофазного ИФА, описанные выше, предполагают, что TRIDENT A и сходные молекулы, содержащие два сайта связывания PD-1 и один сайт связывания CTLA-4, могут являться более активными в присутствии PD-1.

Е. Клеточные анализы PD-1.

Оценивали способность DART D, TRIDENT A, PD-1 mAb 6 G4P и CTLA-4 mAb 3 G1AA связываться с клетками NSO, экспрессирующими PD-1, но не экспрессирующими CTLA-4. Связывающие молекулы инкубировали в присутствии клеток и измеряли средний коэффициент флуоресценции клеток. Результаты этой оценки представлены на фиг. 14. Как и ожидалось, антитело CTLA-4 не связывалось. Было обнаружено, что все биспецифичные связывающие молекулы были способны связываться с PD-1, экспрессируемым на поверхности клеток NSO. Все биспецифичные молекулы являются бивалентными в отношении PD-1 и связывались с клетками NSO сходным образом.

Оценивали способность DART D, TRIDENT A, PD-1 mAb 6 G4P и CTLA-4 mAb 3 G1AA блокировать связывание между PD-1, экспрессируемым на клеточной поверхности, и его лигандами PD-L1 и PD-L2. PD-L1-PE или PD-L2-PE инкубировали в присутствии указанной связывающей молекулы и оценивали ее способность связываться с клетками NSO-PD-1 путем сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Результаты этой оценки представлены на фиг. 15A (PD-L1) и фиг. 15B (PD-L2). Как и ожидалось, антитело CTLA-4 не вызывало ингибирования, а все из исследованных связывающих PD-1 молекул были способны ингибировать связывание как PD-L1 (фиг. 15A), так и PD-L2 (фиг. 15B), с PD-1, экспрессируемым на поверхности клеток NSO. Все связывающие PD-1 молекулы являются бивалентными в отношении PD-1 и имели сходные профили ингибирования.

DART D, TRIDENT A, CTLA-4 mAb 3 G1AA и PD-1 mAb 6 G4P также оценивали в репортерном анализе блокирования PD-1. Указанные связывающие молекулы инкубировали в присутствии клеток PD-L1⁺ CHO и эффекторных клеток Jurkat и способность связывающих молекул блокировать ингибирование иммунного ответа (путем блокирования взаимодействия PD-1/PD-L1) оценивали путем наблюдения степени CD3-опосредованной активации (как показано по повышенной экспрессии люциферазы в анализе на клетках NFAT-luc/PD-1 Jurkat; Promega). Результаты этой оценки представлены на фиг. 16. Все из исследованных связывающих PD-1 молекул были способны обращать ингибирующий сигнал контрольной точки иммунного ответа PD-1, как показано по повышенной экспрессии люциферазы. Все связывающие PD-1 молекулы являются бивалентными в отношении PD-1 и обладали сходной способностью ингибировать опосредованное PD-1 блокирование Т-клеточного сигнального пути. Антитело CTLA-4 совсем не вызывало ингибирования указанной системы.

Ф. Клеточные анализы CTLA-4/PD-1.

Проверяли способность DART D, TRIDENT A и антитела, представляющего собой отрицательный контроль, одновременно связываться с PD-1 и CTLA-4 в ферментационном анализе комплементации белковых фрагментов, DiscoverX. Вкратце, аликвоты клеток линии U2OS CTLA-4(1-195)-PK PD-1(1-199)-EA #9 всевали в четырех повторностях в концентрации 5,000 клеток/лунку в среде для посева DiscoverX CP5 на 384-луночные планшеты. Клеткам позволяли прикрепляться в течение 4 часов при 37°C/5% CO₂. Затем к клеткам PD-1 - CTLA-4 добавляли каждую из молекул связывания в серийных разведениях 1:3 (11 точек). Планшеты инкубировали в течение ночи (16 часов) при 37°C/5% CO₂. В лунки добавляли реагент для выявления PathHunter и затем инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте и затем планшет считывали на люминометре Envision. Результаты этой оценки представлены в табл. 14 и на фиг. 17 (клеточная линия U2OS CTLA-4 (1-195)-PK PD-1(1-199)-EA #9). Для обеих биспецифичных молекул DART D и TRIDENT A было показано сравнимое одновременное вовлечение молекул PD-1 и CTLA-4 на клетках, в которых ко-экспрессируются оба рецептора, как показано с помощью ферментационного анализа комплементации белковых фрагментов, что указывает на то, что биспецифичные молекулы согласно изобретению способны одновременно связываться с PD-1 и CTLA-4, и дополнительно указывает на то, что присоединение через PD-1 компенсирует сниженную avidность молекулы TRIDENT A в отношении CTLA-4 при экспрессии обоих рецепторов-мишеней. Это открытие согласуется с результатами исследований ингибирования с помощью твердофазного ИФА, описанными выше. Отрицательный контроль не вызвал значительного повышения сигнала на клеточной линии PD1-

CTLA4. Инкубирование в присутствии более высокой концентрации TRIDENT A приводило к сильному повышению сигнала в клеточной линии U2OS с димеризацией PD1-CTLA4 (S:B=12,7). Ответ для DART D в исследовании дозозависимого эффекта на клеточной линии PD-1 - CTLA-4 был меньшим по величине (S:B=9,2), но значения EC50 были сходными для обеих указанных молекул (EC50=20 пкМ).

Таблица 14			
	Отрицательный контроль	TRIDENT A	DART D
Наклон кривой	~15,99	1,103	0,8095
EC50 (нМ)	~6,883 × 10 ⁻¹⁰	2,123 × 10 ⁻¹¹	2,090 × 10 ⁻¹¹

Оценивали способность DART D, TRIDENT A, CTLA-4 mAb 3 G1AA, PD-1 mAb 6 G4P и комбинации CTLA-4 mAb 3 G1AA/PD-1 mAb 6 G4P (Ab Combo 1) усиливать ответ в реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ). Дендритные клетки моноцитарного происхождения создавали путем обработки CD14+ моноцитов (выделенных из МКПК с помощью набора положительной селекции Miltenyi) GM-CSF (100 нг/мл) и IL-4 (10 нг/мл) и последующего культивирования клеток в течение 7 дней. На 7 сутки клетки собирали и высевали на 96-луночные планшеты и культивировали в течение 24 ч. На 8 сутки CD4+ Т-клетки (выделенные путем отрицательной селекции с применением набора Myltenyi) высевали в концентрации 200,000 клеток на лунку, добавляли исследуемые изделия и культивировали в течение 3 дней. Затем измеряли уровень IFN-γ в супернатантах культур с применением наборов для твердофазного ИФА клеток человека DuoSet для IFN-γ (R&D Systems) в соответствии с инструкциями изготовителя. При использовании антител в комбинации каждое из данных антител добавляли в указанной концентрации таким образом, что общая концентрация добавляемого антитела удваивалась. Высвобождение IFN-γ представлено в виде графика на фиг. 18. Было обнаружено, что как биспецифичные DART D, так и молекулы TRIDENT A усиливали ответ в СКЛ в той же степени или немного больше по сравнению с комбинацией отдельных исходных антител.

Способность DART D, TRIDENT A, CTLA-4 mAb 3 G1AA, PD-1 mAb 6 G4P и комбинации CTLA-4 mAb 1/PD-1 mAb 1 (Ab Combo 1) усиливать высвобождение цитокина посредством ингибирования контрольных точек также оценивали в анализе повторной стимуляции энтеротоксином типа B Staphylococcus aureus (SEB). В целом, МКПК очищали из цельной крови здоровых доноров (например, с помощью метода центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) в соответствии с инструкциями изготовителя). Очищенные МКПК культивировали в среде RPMI с добавлением 10% термоинактивированной ЭБС и 1% пенициллина/стрептомицина в объемных флаконах T-25 в течение 2-3 дней в отсутствие или в присутствии SEB (например, Sigma-Aldrich) в концентрации 0,5 нг/мл (первичная стимуляция). В конце первого цикла SEB-стимуляции МКПК промывали два раза ФСБ и сразу высевали на 96-луночные планшеты для тканевых культур в концентрации 1-5 × 10⁵ клеток на лунку просто в среде, в среде с контрольным или исследуемым изделием, в среде с SEB в концентрации 0,5 нг/мл (вторичная стимуляция) и без антитела или в среде с SEB и контрольным IgG или исследуемым изделием и культивировали в течение дополнительных 2-3 дней. В конце вторичной стимуляции супернатанты собирали для измерения секреции цитокинов (например, с применением наборов для твердофазного ИФА клеток человека DuoSet для IFN-γ, IL-2, TNFα, IL-10 и IL-4 (R&D Systems) в соответствии с инструкциями изготовителя).

На фиг. 19A-19B показаны точечные графики распределения флуоресцирующих точек на сортере клеток с активированной флуоресценцией (FACS), отражающие экспрессию PD-1 в зависимости от экспрессии CTLA-4 такими МКПК в отсутствие (фиг. 19A) или в присутствии (фиг. 19B) SEB-стимуляции. На фиг. 19C показан эффект SEB-стимуляции на секрецию IFN-γ. МКПК стимулировали энтеротоксином типа B Staphylococcus aureus (SEB) в концентрации 0,5 нг/мл в течение 48 часов. Затем клетки собирали, промывали и заново высевали на 96-луночные планшеты, содержащие антитела в различных концентрациях со свежим SEB, на дополнительные 48 часов. Супернатант затем собирали и анализировали продукцию IFN-γ с помощью проточной цитометрии-твердофазного ИФА. Как биспецифичные DART, так белок TRIDENT показали повышенную ответную продукцию IFN-γ, которая соответствовала суммарному ответу, наблюдаемому при введении комбинации отдельных исходных mAb. Сходные результаты наблюдались в анализе SEB-стимуляции, в котором МКПК культивировали в присутствии высокой концентрации (500 нг/мл) SEB в течение 72 часов. Чтобы дополнительно исследовать влияние биспецифичной в отношении PD1 x CTLA-4 молекулы на Т-клеточный ответ, МКПК стимулировали SEB в концентрации 0,5 нг/мл в течение 48 часов, собирали, промывали и повторно высевали на 96-луночные планшеты в присутствии свежего SEB и либо DART D, TRIDENT A, CTLA-4 mAb 3 G1AA, PD-1 mAb 6 G4P, либо комбинации CTLA-4 mAb 3 G1AA / PD-1 mAb 6 G4P (Ab Combo 1) на дополнительные 48 часов и измеряли высвободившийся IL-2 (фиг. 19D). На фиг. 19A-19D показано, что введение биспецифичных в отношении PD1 x CTLA-4 молекул приводило к значительному усилению Т-клеточных ответов. При использовании антител в комбинации каждое антитело добавляли в указанной концентрации таким образом, что общая концентрация добавляемого антитела удваивалась.

Пример 6. Исследования in vivo.

А. Активность биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул на мышинной модели БТПХ.

Активность типичной биспецифичной в отношении PD1 x CTLA-4 бивалентной молекулы, DART D, оценивали на модели болезни "трансплантат против хозяина (БТПХ)" на мышах NOG с трансплантированными МКПК. План исследования представлен в табл. 15.

Таблица 15					
Группа	N/пол	Лечение	Доза (мкг/кг)	Способ/режим введения	Клеточный трансплантат (трансплантаты)
1.	7/F	DART D	500	IV/Q7D x 7	МКПК (IP, 1E7)
2.	7/F	DART D	50	IV/Q7D x 7	МКПК (IP, 1E7)
3.	7/F	DART D	5	IV/Q7D x 7	МКПК (IP, 1E7)
4.	7/F	Наполнитель	0	IV/Q7D x 7	МКПК (IP, 1E7)

Количество CD3+ T- клеток подсчитывали путем сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) на 14 день исследования, данные представлены в виде графика на фиг. 20А. За выживаемостью следили на протяжении всего исследования, данные представлены как процентная выживаемость на графике на фиг. 20В. У животного, получавшего лечение DART D в концентрации 500 мкг/кг, наблюдался повышенный рост Т-клеток и усиление БТПХ, что согласуется с усилением Т-клеточного иммунного ответа.

В. Токсикологическое и фармакокинетическое исследование биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул.

Профиль безопасности типичной биспецифичной в отношении PD1 x CTLA-4 бивалентной молекулы, DART D, и типичной биспецифичной в отношении PD1 x CTLA-4 тривалентной молекулы, TRIDENT A, оценивали в исследовании доз у яванских макаков (без соответствия требованиям GLP - Своду международных требований к лабораторным исследованиям). Дополнительно проверяли некоторые маркеры фармакодинамической активности.

В настоящем исследовании оценивали потенциальную токсичность биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул при введении путем многократных внутривенных инфузий. План исследования представлен в табл. 16.

Таблица 16				
Группа	Исследуемое изделие	Доза (мг/кг)	Дни введения дозы	Количество животных
1	Контроль	0	1, 8, 15	1 самец, 1 самка
2	DART D	50	1, 8, 15	3 самца, 3 самки
3	DART D	75	15, 22, 29	3 самца, 3 самки
4	TRIDENT A	5	1	2 самца, 1 самка

Таким образом, между введением дозы 50 мг/кг и повышением дозы до 75 мг/кг обеспечивали 2-недельный интервал. В данном исследовании оценивали следующие параметры и конечные критерии: клинические признаки, массу тела, потребление пищи, температуру тела, клинические патологические параметры (коагуляцию, клинические химические показатели и гематологические данные до введения дозы и через 23 часа после введения дозы для групп 1-3; до 22 суток для группы 4), биоаналитические и токсикокинетические параметры, данные проточной цитометрии (до введения дозы и через 23 часа после введения дозы), цитокины (через 2, 6, 22 часов после введения дозы). Антитела против лекарственного средства оценивали только для группы 4 на 8, 15 и 22 сутки. Вскрытие проводили через 48 часов после введения 3-ей дозы только для групп 1-3. Связывания и активность in vivo биспецифичных в отношении PD-1 x CTLA-4 молекул также оценивали, как описано ниже.

Все животные выживали до момента планового усыпления. Не наблюдалось нежелательных клинических явлений у животных, получавших 3 дозы вплоть до 75 мг/кг/неделя. В частности, не наблюдалось диареи. Гистопатологические изменения также были незначительными. Наблюдалось повышение уровня глобулина в лечебных группах и наблюдалось увеличение органной массы селезенки и вилочковой железы в группах 2-3 (см. табл. 17, вскрытия животных из группы 4 не проводили), что было ожидаемо при стимуляции иммунной системы. Графики зависимости концентрации в сыворотке от времени для каждой лечебной группы показаны на фиг. 21А-21С и согласуются с данными для молекул, содержащих Fc-фрагменты человека, у яванских макаков.

Таблица 17				
Группа	Исследуемое изделие	Доза (мг/кг)	Масса селезенки:масса тела	Масса вилочковой железы:масса тела
1	Контроль	0	0,080 (среднее, n=2)	0,035 (среднее, n=2)
2	DART D	50	0,239 (среднее, n=6)	0,088 (среднее, n=6)
3	DART D	75	0,225 (среднее, n=6)	0,084 (среднее, n=6)

Сообщалось, что повышение абсолютного содержания лимфоцитов (АСЛ) после лечения антителом против CTLA-4 ипилимумабом, по-видимому, коррелирует с клиническим благоприятным эффектом и общей выживаемостью (см. например, Ku, G. Y., et al. (2010) "Single-Institution Experience With Ipilimumab

In Advanced Melanoma Patients In The Compassionate Use Setting: Lymphocyte Count After 2 Doses Correlates With Survival' Cancer 116(7): 1767-1775), что указывает на то, что АСЛ может быть полезным фармакодинамическим (ФД) конечным критерием оценки. АСЛ проверяли в каждой из описанных выше групп до лечения и после проведения лечения на 2, 8, 9, 15 и 16 сутки. Занятость сайтов связывания DART D или TRIDENT A на PD-1+ Т-клетках определяли путем измерения средней интенсивности обнаруженной флуоресценции (СИФ) антител против иммуноглобулина человека IgG4, связанных с Alexa 488+, в популяциях CD4+/PD-1+ и CD8+/PD-1+ Т-клеток при двух условиях для каждого образца крови обезьяны. При первом условии использовали значения СИФ, полученные в присутствии избытка DART D или TRIDENT A для определения максимальной интенсивности связывания DART D или TRIDENT A на PD-1+ клетках в пределах каждой клеточной популяции. При втором условии использовали значения СИФ, полученные в присутствии избытка отрицательного контроля, для определения интенсивности связывания PD-1+ клеток в пределах каждой клеточной популяции у получавшего лечение DART D или TRIDENT A животного на момент сбора образцов. Различие между двумя условиями использовали для расчета % занятости сайтов связывания DART D или TRIDENT A на подтипах PD-1+ Т-клеток у получавших лечение DART D или TRIDENT A животных, как следует далее:

$$\% \text{ Занятость сайтов связывания DART D или TRIDENT A на субпопуляции PD-1+ Т-клеток} = \left[\frac{\left(\frac{\text{СИФ выявленного Anti-HuIgG4+ в присутствии избытка AEX1367}}{\text{СИФ выявленного Anti-HuIgG4+ в присутствии избытка DART D или TRIDENT A}} \right)}{\left(\frac{\text{СИФ выявленного Anti-HuIgG4+ в присутствии избытка AEX1367}}{\text{СИФ выявленного Anti-HuIgG4+ в присутствии избытка DART D или TRIDENT A}} \right)} \right] \times 100$$

Абсолютное содержание и процентное изменение, нормированное к 1 суткам, представлены на графике на фиг. 22А (в тысячах клеток /мкл (тыс./мкл)) и на фиг. 22В (процентное изменение АСЛ, нормированное к 1 суткам (D1)). В каждой из лечебных групп, получавших DART D, сразу после лечения сначала наблюдалось снижение АСЛ с последующим повышением АСЛ до уровня, значительно превышающего исходный уровень. Сходная тенденция наблюдалась в лечебной группе TRIDENT A, которая получала только одну более низкую дозу.

Кроме того, пролиферацию CD4+ Т-клеток и занятость PD-1 на Т-клетках проверяли для описанных выше групп 1-3. Вкратце, CD3+/PD-1+ Т-клетки анализировали с помощью FACS для оценки процента клеток, связанных DART D. В 96-луночный планшет с глубокими лунками добавляли сорок микролитров молекул отрицательного контроля (респираторно-синцитиальный вирус (RSV) x флуоресцеин-IgG4/kFc DART) или исследуемого изделия (DART D или TRIDENT A) в концентрации 35 мкг/мл. Затем в каждую лунку добавляли по 100 микролитров хорошо перемешанной антикоагулированной цельной крови, тщательно перемешивали при помощи пипетки и инкубировали в темноте в течение 45-75 минут при температуре окружающей среды. Затем в каждую лунку добавляли 100 микролитров лизирующего раствора 1x BD FACS и перемешивали при помощи пипетки; затем планшет инкубировали в темноте в течение дополнительных 10-20 минут при температуре окружающей среды. Планшет затем центрифугировали при 400 × g в течение 5 минут и супернатант выливали. В каждую лунку добавляли 100 микролитров FACS-буфера и перемешивали для осуществления этапа отмывки. Планшет затем центрифугировали при 400 × g в течение 5 минут и супернатант выливали. Клеточный осадок ресуспендировали в двадцати микролитрах смеси антител панели 1 и инкубировали в течение 30-60 минут при температуре окружающей среды. Планшет промывали, как в предыдущих этапах отмывки. В конце инкубирования планшет снова промывали и клеточный осадок окончательно ресуспендировали в 300 микролитрах FACS-буфера и образцы анализировали с помощью клеточного анализатора BD FACSCanto II. Результаты показаны на фиг. 23А-23В.

Как показано на фиг. 23А (для DART D, вводимого в концентрации 50 мг/кг) и фиг. 23В (для DART D, вводимого в концентрации 75 мг/кг), занятость PD-1 (т.е. связывание DART D) была максимальной на протяжении лечения для группы 2 и 3. Пролиферацию CD4+ Т-клеток оценивали с помощью FACS на основе ко-экспрессии Ki-67 (клеточного маркера пролиферации).

20 микролитров смеси антител А (содержащей антитела, которые связываются с маркерами клеточной поверхности: CD45, CD3, CD4 и CD8) добавляли в 96-луночный планшет с глубокими лунками. Затем в каждую лунку добавляли по пятьдесят микролитров хорошо смешанной антикоагулированной цельной крови, тщательно перемешивали с помощью пипетки и инкубировали в темноте в течение от 15 до 45 минут при температуре окружающей среды. Затем в каждую лунку добавляли по 500 микролитров лизирующего раствора 1x BD FACS L и перемешивали при помощи пипетки; затем планшет инкубировали в темноте в течение дополнительных 10-20 минут при температуре окружающей среды. Планшет центрифугировали при 1200 об./мин в течение 5 минут и супернатант выливали. Затем в каждую лунку добавляли по 500 микролитров FACS-буфера и перемешивали для осуществления этапа отмывки. Планшет затем центрифугировали при 1200 об./мин в течение 5 минут и супернатант выливали. Клеточный осадок ресуспендировали в смеси антител В (содержащей антитела, которые связываются с внутриклеточным маркером Ki-67) или ресуспендировали в композиции изотипов антител (содержащей контрольные изотипы в качестве внутриклеточного маркера) и инкубировали в темноте в течение от 15 до 45 минут. После промывки клеточный осадок ресуспендировали в 300 микролитрах FACS-буфера и образцы анализировали с помощью клеточного анализатора BD FACSCanto II.

По данным анализа с помощью панели внутриклеточной окраски Т-клеток процент CD4+ и CD8+ клеток определяли как фракцию от общих окрашенных на CD45+ лейкоцитов. Считали количество Ki 67+ клеток во фракции окрашенных на CD4+ клеток и процент CD4+/Ki 67+ Т-клеток (пролиферативных CD4 Т-клеток) определяли как фракцию от общих CD4+ клеток. Аналогично, процент CD8+/Ki 67+ Т-клеток (пролиферативных CD8 Т-клеток) определяли как фракцию от общих CD8+ клеток. Результаты анализа показаны на фиг. 24А-24В.

Как показано на фиг. 24А-24В, пролиферация CD4+ Т-клеток значительно усиливалась при лечении в лечебных группах 2 и 3 на протяжении лечения. Результаты настоящего исследования указывают, что введение яванским макакам биспецифичной в отношении PD1 x CTLA-4 молекулы хорошо переносится в концентрации вплоть до 75 мг/кг, что значительно превышает дозу 5 мг/кг, при которой были описаны нежелательные явления у яванских макаков, получавших лечение ипилимумабом. Молекулы имели благоприятный фармакокинетический профиль, и наблюдался ряд маркеров фармакодинамической активности, включая повышение количества лимфоцитов, повышение уровня глобулина, повышение массы органов селезенки и вилочковой железы, повышение пролиферации Т-клеток (как количества Т-клеток, так и экспрессии Ki-67) и максимальную занятость PD-1 на Т-клетках.

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящей заявке, включены в настоящую заявку посредством ссылки в той же степени, как если бы было конкретно и отдельно указано, что каждая отдельная публикация или патентная заявка полностью включена посредством ссылки. Следует понимать, что в то время как настоящее изобретение было описано в связи с конкретными вариантами реализации, возможны дополнительные модификации. Предполагается, что любые вариации, способы применения или адаптации согласно изобретению, которые в целом соответствуют идеям настоящего изобретения, включены в настоящую заявку. Настоящая заявка включает такие отступления от изобретения как находящиеся в пределах известной или обычной практики в области техники, к которой относится настоящее изобретение, и как применимые к основным признакам, изложенным выше в настоящей заявке.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> MacroGenics, Inc.
Johnson, Leslie S.
Chichili, Gurunadh Reddy
Shah, Kalpana
La Motte-Mohs, Ross
Moore, Paul A.
Bonvini, Ezio
Koenig, Scott

<120> Биспецифичные молекулы, обладающие иммунореактивностью в отношении PD-1 и CTLA-4, и способы их применения

<130> 1301.0134PCT

<150> US62/266,944

<151> 2015-12-14

<160> 110

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1

<211> 217

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(217)

<223> Домен CH2-CH3 примера IgG1 человека

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Хаа представляет собой ЛИЗИН (K) или отсутствует

<400> 1

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
 210 215

<210> 2
 <211> 216
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(216)
 <223> Домен CH2-CH3 примера IgG2 человека

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (216)..(216)
 <223> Хаа представляет собой лизин (K) или отсутствует

<400> 2

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 35 40 45

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
 65 70 75 80

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 85 90 95

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
 100 105 110

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140

Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160

043373

Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
165 170 175

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
180 185 190

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
195 200 205

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 3
<211> 217
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(217)
<223> Домен CH2-CH3 примера IgG3 человека

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Хаа представляет собой ЛИЗИН (K) или отсутствует

<400> 3

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
 210 215

<210> 4
 <211> 217
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(217)
 <223> Домен CH2-CH3 примера IgG4 человека

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (217)..(217)
 <223> Хаа представляет собой лизин (K) или отсутствует

<400> 4

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

043373

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
210 215

<210> 5

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Промежуточный спейсерный пептид (линкер 1)

<400> 5

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 6

<211> 5

<212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Цистеин-содержащий спейсерный пептид (линкер 2)
 <400> 6

Gly Gly Cys Gly Gly
 1 5

<210> 7
 <211> 4
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Альтернативный спейсерный пептид (линкер 2)
 <400> 7

Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 8
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Альтернативный спейсерный пептид (линкер 2)
 <400> 8

Leu Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5

<210> 9
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Альтернативный спейсерный пептид (линкер 2)
 <400> 9

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5 10

<210> 10
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<223> Альтернативный спейсерный пептид (линкер 2)

<400> 10

Ala Ser Thr Lys Gly
1 5

<210> 11

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Альтернативный спейсерный пептид (линкер 2)

<400> 11

Leu Glu Pro Lys Ser Ser
1 5

<210> 12

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Альтернативный спейсерный пептид (линкер 2)

<400> 12

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 13

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Способствующий образованию гетеродимера домен

<400> 13

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 14

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(6)

<223> Способствующий образованию гетеродимера домен шарнирного участка

IgG человека

<400> 14

Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 15

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(6)

<223> Способствующий образованию гетеродимера домен шарнирного участка IgG человека

<400> 15

Ala Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 16

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(6)

<223> Способствующий образованию гетеродимера домен легкой цепи каппа иммуноглобулина человека

<400> 16

Gly Phe Asn Gly Glu Cys
1 5

<210> 17

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(6)

<223> Способствующий образованию гетеродимера домен легкой цепи каппа иммуноглобулина человека

<400> 17

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 18
 <211> 28
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Способствующий образованию гетеродимера домен E-coil
 <400> 18

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
 20 25

<210> 19
 <211> 28
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Способствующий образованию гетеродимера домен K-coil
 <400> 19

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 20 25

<210> 20
 <211> 28
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Цистеин-содержащий способствующий образованию гетеродимера домен E-coil
 <400> 20

Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
 20 25

<210> 21
 <211> 28
 <212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Цистеин-содержащий способствующий образованию гетеродимера домен K-coil

<400> 21

Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 22

<211> 46

<212> БЕЛОК

<213> Streptococcus dysgalactiae

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(46)

<223> Альбумин-связывающий домен 3 (ABD3) белка G штамма Streptococcus G148

<400> 22

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 23

<211> 46

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Деиммунизированный вариант альбумин-связывающего домена 3 (ABD3) белка G штамма Streptococcus G148

<400> 23

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

<210> 24

<211> 46

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Деиммунизированный вариант альбумин-связывающего домена 3 (ABD3)
 белка

G штамма Streptococcus G148

<400> 24

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ala Ala Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
 20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

<210> 25

<211> 46

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Деиммунизированный вариант альбумин-связывающего домена 3 (ABD3)
 белка

G штамма Streptococcus G148

<400> 25

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Ser Asn Ala Lys Ser Val Glu
 20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45

<210> 26

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Промежуточный спейсерный линкер

<400> 26

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 27

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Промежуточный спейсерный линкер

<400> 27

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 28

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Промежуточный спейсерный линкер

<400> 28

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 29

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Промежуточный спейсерный линкер

<400> 29

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu
1 5

<210> 30

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Промежуточный спейсерный линкер

<400> 30

Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

1 5 10 15

<210> 31
 <211> 13
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Промежуточный спейсерный линкер

<400> 31

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 32
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Промежуточный спейсерный линкер

<400> 32

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(15)
 <223> Пример шарнирного участка IgG1

<400> 33

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

<210> 34
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(12)
 <223> Пример шарнирного участка IgG2

<400> 34

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 35
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(12)
 <223> Пример шарнирного участка IgG4

<400> 35

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
 1 5 10

<210> 36
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант шарнирного участка IgG4, содержащий стабилизирующую замену S228P

<400> 36

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 37
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Промежуточный спейсерный пептид

<400> 37

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 38
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(107)

<223> Пример CL-домена каппа IgG человека

<400> 38

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 39

<211> 104

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(104)

<223> Пример CL-домена лямбда IgG человека

<400> 39

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

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
50 55 60

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100

<210> 40
<211> 98
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(98)
<223> Домен CH1 IgG1 человека

<400> 40

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val

<210> 41
<211> 98
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(98)
 <223> Домен CH1 IgG2 человека

<400> 41

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val

<210> 42
 <211> 98
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(98)
 <223> Домен CH1 IgG4 человека

<400> 42

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

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

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val

<210> 43
<211> 217
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Домены CH2-CH3 IgG1, содержащие замены L234A и L235A
(по Кэбату)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Хаа представляет собой ЛИЗИН (K) или отсутствует

<400> 43

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 44

<211> 217

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Содержащие "выступ" домены CH2-CH3 IgG1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa представляет собой ЛИЗИН (K) или отсутствует

<400> 44

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

043373

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 45
<211> 217
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Содержащие "впадину" домены CH2-CH3 IgG1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (217)..(217)
<223> Xaa представляет собой лизин (K) или отсутствует

<400> 45

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 46

<211> 288

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(288)
 <223> PD-1 человека, включая сигнальную последовательность (последовательность в NCBI NP_005009.2)

<220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)..(20)
 <223> Сигнальная последовательность

<400> 46

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
 20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
 35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
 65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
 85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
 100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
 115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
 130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
 145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
 165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
 180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 47

<211> 113

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(113)

<223> VL-домен антитела против PD-1 человека PD-1 mAb 1 (ниволумаб)

<400> 47

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

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Ser

<210> 48

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(107)

<223> VL-домен антитела против PD-1 человека PD-1 mAb 1 (ниволумаб)

<400> 48

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
 85 90 95

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

<210> 49

<211> 120

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL-домен гуманизированного антитела против PD-1 человека PD-1
 mAb 2
 (пембролизумаб)

<400> 49

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

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

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

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 50

<211> 111

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL-домен гуманизированного антитела против PD-1 человека PD-1
 mAb 2
 (пембролизумаб)

<400> 50

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95
 Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

 <210> 51
 <211> 121
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(121)
 <223> VH-домен мышиного антитела против PD-1 человека PD-1 mAb 3
 (EH12.2H7)

 <400> 51

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

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

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

 Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Thr Gly Phe Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

 Ala Arg Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 52
 <211> 111
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(111)
 <223> VH-домен мышинного антитела против PD-1 человека PD-1 mAb 3
 (EH12.2H7)

<400> 52

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Phe Gly Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95

Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 53
 <211> 117
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VH-домен гуманизированного антитела против PD-1 человека PD-1
 mAb 4
 (пидилизумаб)

<400> 53

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

043373

20

25

30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 54

<211> 106

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH-домен гуманизированного антитела против PD-1 человека PD-1
mAb 4

(пидилизумаб)

<400> 54

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

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

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

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr

85

90

95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 55

<211> 116

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH-домен гуманизированного антитела против PD-1 человека (PD-1 mAb 5)

<400> 55

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 56

<211> 112

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VL-домен гуманизированного антитела против PD-1 человека (PD-1 mAb 5)

<400> 56

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 57

<211> 119

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH-домен гуманизированного антитела против PD-1 человека (PD-1 mAb 6)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (48)..(48)

<223> Хаа представляет собой изолейцин (I) или аланин (A)

<400> 57

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 58
<211> 111
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> VL-домен гуманизированного антитела против PD-1 человека (PD-1 mAb 6)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(26)
<223> Хаа представляет собой аспарагин (N) или серин (S)

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58)..(58)
<223> Хаа представляет собой глутамин (Q) или аргинин (R)

<400> 58

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Xaa Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Xaa Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

043373

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 59

<211> 119

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH-домен гуманизированного антитела против PD-1 человека (PD-1 mAb 7)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Хаа представляет собой валин (V) или аланин (A)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (35)..(35)

<223> Хаа представляет собой серин (S) или глицин (G)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (48)..(48)

<223> Хаа представляет собой валин (V) или треонин (T)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (86)..(86)

<223> Хаа представляет собой лейцин (L) или аланин (A)

<400> 59

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Val Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Xaa
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

043373

Leu Gln Met Asn Ser Xaa Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210>	60
<211>	107
<212>	БЕЛОК
<213>	Искусственная последовательность

<220>
<223> VL-домен гуманизированного антитела против PD-1 человека (PD-1 mAb 7)

```
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> Хаа представляет собой серин (S) или аспарагин (N)
```

```
<220>
<221>  MISC_FEATURE
<222>  (50)..(50)
<223>  Хаа представляет собой аспарагин (N) или аспарат (D)
```

<400> 60

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Xaa Tyr
20 25 30

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

Tyr Xaa Ala Lys Thr Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp
85 90 95

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

<210> 61
 <211> 117
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> VH-домен гуманизированного антитела против PD-1 человека (PD-1 mAb 8)

<400> 61

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

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

Leu Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 62
 <211> 107
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> VL-домен гуманизированного антитела против PD-1 человека (PD-1 mAb 8)

<400> 62

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

043373

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

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

Tyr Asp Ala Lys Thr Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp
85 90 95

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

<210> 63

<211> 496

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Первая или третья полипептидные цепи PD-1 x LAG-3 DART A

<400> 63

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 115 120 125
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 130 135 140
 Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 145 150 155 160
 Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp
 165 170 175
 Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser
 180 185 190
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 195 200 205
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp
 210 215 220
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
 245 250 255
 Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Ser Lys Tyr
 260 265 270
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 275 280 285
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr
 290 295 300
 Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 305 310 315 320
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 325 330 335
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 340 345 350

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
355 360 365

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
370 375 380

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
385 390 395 400

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
405 410 415

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
420 425 430

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
435 440 445

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
450 455 460

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
465 470 475 480

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
485 490 495

<210> 64

<211> 271

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вторая или четвертая полипептидные цепи PD-1 x LAG-3 DART A

<400> 64

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

043373

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
130 135 140

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val
165 170 175

Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp
180 185 190

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe
210 215 220

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys
225 230 235 240

Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
245 250 255

Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

<210> 65

<211> 118

<212> BEJOK

<213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(118)
 <223> VH-домен mAb 4-4-20

<400> 65

Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Pro Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp
 50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val Glu Asp Met Gly Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 66
 <211> 112
 <212> БЕЛОК
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(112)
 <223> VL-домен mAb 4-4-20

<400> 66

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 67

<211> 273

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Первая полипептидная цепь универсальной биспецифичной адапторной молекулы

UBA-1

<400> 67

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
 115 120 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
 130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
 145 150 155 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser
 165 170 175

Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser
 210 215 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala
 245 250 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
 260 265 270

Lys

<210> 68

<211> 272

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вторая полипептидная цепь универсальной биспецифичной адапторной молекулы

UBA-1

<400> 68

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly
 115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Pro Met Lys Leu Ser Cys Val Ala
 130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser
 145 150 155 160

Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr
 165 170 175

Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu
 195 200 205

Arg Val Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly
 210 215 220

Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
 245 250 255

Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

<210> 69

<211> 503

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$

<223> Первая и третья полипептидная цепь универсальной биспецифичной адапторной молекулы
UBA-2

<400> 69

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
115 120 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser
165 170 175

Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val
 180 185 190

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
 195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser
 210 215 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala
 245 250 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
 260 265 270

Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 275 280 285

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 290 295 300

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 305 310 315 320

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 325 330 335

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 340 345 350

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 355 360 365

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 370 375 380

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 385 390 395 400

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 405 410 415

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 420 425 430

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 435 440 445

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 450 455 460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 465 470 475 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 485 490 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 70

<211> 503

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Первая полипептидная цепь универсальной биспецифичной адапторной молекулы

UBA-3

<400> 70

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
115 120 125

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala
130 135 140

Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
145 150 155 160

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser
165 170 175

Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser
210 215 220

Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala
245 250 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
260 265 270

Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
275 280 285

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
290 295 300

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
305 310 315 320

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
325 330 335

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 340 345 350

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 355 360 365

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 370 375 380

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 385 390 395 400

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 405 410 415

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 420 425 430

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 435 440 445

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 450 455 460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 465 470 475 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 485 490 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 71

<211> 227

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Третья полипептидная цепь универсальной биспецифичной адапторной молекулы

UBA-3

<400> 71

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 72

<211> 449

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Третья полипептидная цепь универсальной биспецифичной адапторной молекулы

UBA-4

<400> 72

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
355 360 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 73

<211> 218

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Четвертая полипептидная цепь универсальной биспецифичной адап-
торной молекулы
UBA-4

<400> 73

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 74

<211> 575

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Третья полипептидная цепь универсальной биспецифичной адапторной молекулы

UBA-5

<400> 74

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val
 115 120 125

Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val
 130 135 140

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met
145 150 155 160

Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val
165 170 175

Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp
180 185 190

Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
195 200 205

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
210 215 220

Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
245 250 255

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
260 265 270

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
275 280 285

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
290 295 300

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
305 310 315 320

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
325 330 335

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
340 345 350

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
355 360 365

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
370 375 380

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
385 390 395 400

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
405 410 415

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
420 425 430

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
435 440 445

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
450 455 460

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
465 470 475 480

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
485 490 495

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
500 505 510

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
515 520 525

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
530 535 540

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
545 550 555 560

His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
565 570 575

<210> 75

<211> 223

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(223)

<223> CTLA-4 человека, включая сигнальную последовательность (последо-

вательность в NCBI
NP_005205.2)

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(34)

<223> Сигнальная последовательность

<400> 75

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
1 5 10 15

Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
20 25 30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
35 40 45

Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
50 55 60

Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
85 90 95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
 210 215 220

<210> 76
 <211> 118
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(118)
 <223> VH-домен антитела против CTLA-4 человека CTLA-4 mAb 1 (ипилиму-
 маб)

<400> 76

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 77
 <211> 108
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(108)

<223> VL-домен антитела против CTLA-4 человека CTLA-4 mAb 1 (ипилиму-
маб)

<400> 77

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

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

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

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

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

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

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

<210> 78

<211> 125

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(125)

<223> VH-домен антитела против CTLA-4 человека CTLA-4 mAb 2
(тремелидумаб)

<400> 78

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

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

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

043373

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 79
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> VL-домен антитела против CTLA-4 человека CTLA-4 mAb 2
(тремелимумаб)

<400> 79

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 80
 <211> 217
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Домены CH2-CH3 Fc-фрагмента IgG1, содержащие замены M252Y, S254T и T256E

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (217)..(217)
 <223> Хаа представляет собой лизин (K) или отсутствует

 <400> 80

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

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

165 170 175
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
 210 215
 <210> 81
 <211> 217
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Домены CH2-CH3 Fc-фрагмента IgG4, содержащие замены M252Y,
 S254T и T256E
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (217)..(217)
 <223> Xaa представляет собой лизин (K) или отсутствует
 <400> 81
 Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
 210 215

<210> 82

<211> 217

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Содержащий "выступ" вариант доменов CH2-CH3 Fc-фрагмента IgG1, содержащий замены M252Y, S254T и T256E

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa представляет собой ЛИЗИН (K) или отсутствует

<400> 82

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

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 83

<211> 217

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Содержащий "впадину" вариант доменов CH2-CH3 Fc-фрагмента IgG1, содержащий замены M252Y, S254T и T256E

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Xaa представляет собой лизин (K) или отсутствует

<400> 83

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

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
210 215

<210> 84

<211> 217

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Содержащий "выступ" вариант доменов CH2-CH3 Fc-фрагмента IgG4, содержащий замены M252Y, S254T и T256E

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (217)..(217)

<223> Хаа представляет собой лизин (K) или отсутствует

<400> 84

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

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

043373

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa
210 215

<210> 86

<211> 119

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> VH-домен гуманизированного антитела против PD-1 человека (PD-1 mAb 6 I VH)

<400> 86

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

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

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

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 87
 <211> 111
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> VL-домен гуманизированного антитела против PD-1 человека (PD-1 mAb 6 SQ VL)

 <400> 87

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 88
 <211> 445
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Тяжелая цепь антитела против PD-1 человека PD-1 mAb 6 G4P

 <400> 88

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

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

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

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445

<210> 89

<211> 218

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Легкая цепь антитела против PD-1 человека PD-1 mAb 6 G4P

<400> 89

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr

043373

20

25

30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 90

<211> 118

<212> BEJOK

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(118)

<223> VH-домен антитела против CTLA-4 человека CTLA-4 mAb 3

<400> 90

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 91

<211> 108

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(108)

<223> VL-домен антитела против CTLA-4 человека CTLA-4 mAb 3

<400> 91

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

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

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

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

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

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

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

<210> 92

<211> 448

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(448)

<223> Тяжелая цепь антитела против CTLA-4 человека mAb 3 G1AA

<400> 92

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 93

<211> 444

<212> БЕЛОК

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(444)

<223> Тяжелая цепь антитела против CTLA-4 человека mAb 3 G4P

<400> 93

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

043373

100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
160		
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys		
210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
240		
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
320		
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		

043373

340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 94
<211> 215
<212> БЕЛОК
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(215)
<223> Легкая цепь антител против CTLA-4 человека mAb 3 G1AA и mAb 3 G4P

<400> 94

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 95

<211> 497

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Первая или третья полипептидные цепи DART B

<400> 95

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

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

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

Ile Tyr Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

043373

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

043373

290		295		300
Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu				
305		310		315 320
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His				
		325		330 335
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg				
		340		345 350
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys				
		355		360 365
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu				
		370		375 380
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr				
		385		390 395 400
Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu				
		405		410 415
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp				
		420		425 430 435
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val				
		440		445 450
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp				
		455		460 465
Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His				
		470		475 480
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu				
		485		490 495

Gly

<210> 96
 <211> 271
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вторая или четвертая полипептидные цепи DART B

<400> 96

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 130 135 140

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
 145 150 155 160

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn
 165 170 175

Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 195 200 205

Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe
 210 215 220

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys
225 230 235 240

Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
245 250 255

Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

<210> 97

<211> 497

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Первая или третья полипептидные цепи DART C

<400> 97

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

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

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

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

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

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
115 120 125

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
130 135 140

Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly

043373

145					150					155					160
Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Leu
				165					170					175	
Asp	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr
			180					185					190		
Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala
		195					200					205			
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	Pro	Phe	Ala	Tyr
	210					215					220				
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly
225					230				235						240
Gly	Glu	Val	Ala	Ala	Cys	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu
				245					250					255	
Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Ser	Lys
			260					265					270		
Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly
		275					280					285			
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile
	290					295					300				
Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu
305					310					315					320
Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
				325					330					335	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
			340					345					350		
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
		355					360					365			
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu
	370					375					380				
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr

385					390					395					400
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
				405					410					415	
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
			420					425					430		
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
		435					440					445			
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp
	450					455					460				
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
465					470					475					480
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu
				485					490					495	
Gly															
<210> 98															
<211> 271															
<212> БЕЛОК															
<213> Искусственная последовательность															
<220>															
<223> Вторая или четвертая полипептидные цепи DART C															
<400> 98															
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr
			20					25					30		
Gly	Met	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
		35					40					45			
Lys	Leu	Leu	Ile	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
	50					55					60				
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
65					70					75					80

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
130 135 140

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
145 150 155 160

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn
165 170 175

Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp
180 185 190

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
195 200 205

Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe
210 215 220

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys
225 230 235 240

Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
245 250 255

Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

<210> 99

<211> 499

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Первая или третья полипептидные цепи DART D

<400> 99

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

043373

1		5		10		15										
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr	
			20					25					30			
Gly	Met	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	
		35					40					45				
Lys	Leu	Leu	Ile	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
	50					55					60					
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
65					70					75					80	
Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys	
				85					90					95		
Glu	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	
			100					105					110			
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	
		115					120					125				
Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	
	130					135					140					
Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	
145					150					155					160	
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Thr	Phe	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	
				165					170					175		
Lys	His	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	
			180					185					190			
Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	
		195					200					205				
Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Thr	Gly	Trp	Leu	Gly	Pro	Phe	
	210					215					220					
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	
225					230					235					240	
Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Ala	Ala	Cys	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	

			245					250					255					
Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu			
			260						265						270			
Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu			
			275						280						285			
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu			
			290						295						300			
Tyr	Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser			
305						310						315						320
Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu			
				325						330						335		
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr			
			340						345						350			
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn			
			355						360						365			
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser			
			370						375						380			
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln			
385						390						395						400
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val			
				405						410						415		
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val			
			420						425						430			
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro			
			435						440						445			
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr			
			450						455						460			
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val			
									470						475			
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu			

485

490

495

Ser Leu Gly

<210> 100

<211> 269

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вторая или четвертая полипептидные цепи DART D

<400> 100

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

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

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

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

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

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
 115 120 125

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
 130 135 140

Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly
 145 150 155 160

Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu
 165 170 175

Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr
180 185 190

Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
195 200 205

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr
210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly
225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys
245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265

<210> 101

<211> 503

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Первая или третья полипептидные цепи DART F

<400> 101

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly

043373

100	105	110
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly		
115	120	125
Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser		
130	135	140
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro		
145	150	155
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn		
	165	170
Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp		
	180	185
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu		
	195	200
Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe		
	210	215
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys		
225	230	235
Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu		
	245	250
Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Leu		
	260	265
Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
	275	280
Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
	290	295
Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
305	310	315
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
	325	330
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		

043373

340

345

350

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
355 360 365

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
370 375 380

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
385 390 395 400

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
405 410 415

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
420 425 430

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
435 440 445

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
450 455 460

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
465 470 475 480

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
485 490 495

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
500

<210> 102

<211> 567

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Первая или третья полипептидные цепи DART E

<400> 102

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

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

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

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 275 280 285

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 290 295 300

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
 305 310 315 320

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 325 330 335

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 340 345 350

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 355 360 365

Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 370 375 380

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 385 390 395 400

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 405 410 415

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 420 425 430

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 435 440 445

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 450 455 460

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 465 470 475 480

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 485 490 495

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 500 505 510

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
515 520 525

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
530 535 540

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
545 550 555 560

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
565

<210> 103

<211> 350

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вторая или четвертая полипептидные цепи DART E

<400> 103

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

043373

130		135		140
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro				
145		150		155
				160
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn				
		165		170
				175
Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp				
		180		185
				190
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu				
		195		200
				205
Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe				
		210		215
				220
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly				
		225		230
				235
				240
Gly Ser Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro				
		245		250
				255
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu				
		260		265
				270
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn				
		275		280
				285
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser				
		290		295
				300
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala				
		305		310
				315
				320
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly				
		325		330
				335
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys				
		340		345
				350

<210> 104

<211> 500

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Первая полипептидная цепь TRIDENT A

<400> 104

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 130 135 140

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
 145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu
 165 170 175

Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp
 180 185 190

Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
 195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro
 210 215 220

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
225 230 235 240

Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
245 250 255

Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
260 265 270

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
275 280 285

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
290 295 300

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
305 310 315 320

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
325 330 335

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
340 345 350

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
355 360 365

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
370 375 380

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
385 390 395 400

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
405 410 415

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
420 425 430

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
435 440 445

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
450 455 460

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 465 470 475 480

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 485 490 495

Leu Ser Leu Gly
 500

<210> 105

<211> 272

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вторая полипептидная цепь TRIDENT A

<400> 105

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 130 135 140

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro

145	150										155					160				
Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu					
				165					170					175						
Thr	Trp	Leu	Asp	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Asp					
			180					185					190							
Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu					
		195					200					205								
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	Pro					
	210					215					220									
Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly					
225					230					235					240					
Cys	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Cys	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu					
				245					250					255						
Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu					
			260					265					270							
<210>	106																			
<211>	444																			
<212>	БЕЛОК																			
<213>	Искусственная последовательность																			
<220>																				
<223>	Третья полипептидная цепь TRIDENT A																			
<400>	106																			
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg					
1				5					10					15						
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr					
			20					25					30							
Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val					
		35				40						45								
Thr	Phe	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	His	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val					
	50					55					60									
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr					
65					70					75					80					

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

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

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440

<210> 107

<211> 215

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Четвертая полипептидная цепь TRIDENT A

<400> 107

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

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

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65						70						75						80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro			
				85					90					95				
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala			
			100				105				110							
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser			
		115					120					125						
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu			
		130				135						140						
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser			
145					150					155					160			
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu			
					165				170						175			
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val			
			180						185						190			
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys			
		195						200					205					
Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys												
		210				215												

<400> 108

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

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

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

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala
 115 120 125

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 130 135 140

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro
 145 150 155 160

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu
 165 170 175

Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp
 180 185 190

Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
 195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro
 210 215 220

Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
 245 250 255

Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
 260 265 270

Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 275 280 285

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 290 295 300

Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 305 310 315 320

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 325 330 335

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 340 345 350

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 355 360 365

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 370 375 380

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 385 390 395 400

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 405 410 415

Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 420 425 430

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 435 440 445

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 450 455 460

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 465 470 475 480

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 485 490 495

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 109
 <211> 448
 <212> БЕЛОР

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Третья полипептидная цепь TRIDENT B

<400> 109

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Thr Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

043373

210		215		220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser				
225		230		240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg				
		245		255
Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro				
		260		270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala				
		275		285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val				
		290		300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr				
305		310		320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr				
		325		335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu				
		340		350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys				
		355		365
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser				
		370		380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp				
385		390		400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser				
		405		415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala				
		420		430
Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys				
		435		445

<210> 110

<211> 469
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Третья полипептидная цепь TRIDENT C

<400> 110

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

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

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

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

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

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly
 100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val
 115 120 125

Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser
 130 135 140

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met His Trp Val
 145 150 155 160

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Thr Phe Ile Ser Tyr
 165 170 175

Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 180 185 190

Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 195 200 205

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Gly Trp
 210 215 220

Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 225 230 235 240

Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255

Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 340 345 350

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Arg
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Leu Gly
 465

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифичная молекула, содержащая:

(А) один или более сайтов связывания эпитопа, способных иммунноспецифично связываться с эпитопом PD-1, содержащих VH-домен PD-1 mAb 6-I VH (SEQ ID NO: 86) и VL-домен PD-1 mAb 6-SQ (SEQ ID NO: 87); и

(В) один или более сайтов связывания эпитопа, способных иммунноспецифично связываться с эпитопом CTLA-4, содержащих VH-домен CTLA-4 mAb 3 (SEQ ID NO: 90) и VL-домен CTLA-4 mAb 3 (SEQ ID NO: 91).

2. Биспецифичная молекула по п.1, характеризующаяся тем, что указанная молекула содержит Fc-фрагмент.

3. Биспецифичная молекула по п.2, характеризующаяся тем, что указанный Fc-фрагмент представляет собой вариант Fc-фрагмента, который содержит:

одну или более модификаций аминокислот, снижающих аффинность варианта Fc-фрагмента в отношении FcγR, или

одну или более модификаций аминокислот, которые увеличивают время полужизни варианта Fc-фрагмента в сыворотке крови, или

одну или более модификаций аминокислот, снижающих аффинность варианта Fc-фрагмента в отношении FcγR и одну или более модификаций аминокислот, которые увеличивают время полужизни варианта Fc-фрагмента в сыворотке крови.

4. Биспецифичная молекула по п.3, характеризующаяся тем, что указанные модификации, которые снижают аффинность варианта Fc-фрагмента в отношении FcγR, включают замену L234A; L235A или L234A и L235A, где указанная нумерация соответствует индексу ЕС по Кэбату.

5. Биспецифичная молекула по п.3 или 4, характеризующаяся тем, что указанные модификации, которые увеличивают время полужизни варианта Fc-фрагмента в сыворотке крови, включают замену M252Y; M252Y и S254T; M252Y и T256E; M252Y, S254T и T256E или K288D и H435K, где указанная нумерация соответствует индексу ЕС по Кэбату.

6. Биспецифичная молекула по любому из пп.1-5, содержащая две полипептидные цепи, содержащие SEQ ID NO: 99, и две полипептидные цепи, содержащие SEQ ID NO: 100.

7. Биспецифичная молекула по любому из пп.1-5, содержащая одну полипептидную цепь, содержащую SEQ ID NO: 104, одну полипептидную цепь, содержащую SEQ ID NO: 105, одну полипептидную цепь, содержащую SEQ ID NO: 106, и одну полипептидную цепь, содержащую SEQ ID NO: 107.

8. Биспецифичная молекула по любому из пп.1-5, содержащая две полипептидные цепи, содержащие SEQ ID NO: 101, и две полипептидные цепи, содержащие SEQ ID NO: 100.

9. Биспецифичная молекула по любому из пп.1-5, содержащая одну полипептидную цепь, содержащую SEQ ID NO: 108, одну полипептидную цепь, содержащую SEQ ID NO: 105, одну полипептидную цепь, содержащую SEQ ID NO: 109, и одну полипептидную цепь, содержащую SEQ ID NO: 107.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифичную молекулу по любому из пп.1-9 и фармацевтически приемлемый носитель.

11. Фармацевтическая композиция по п.10, причем указанная фармацевтическая композиция содержит эффективное количество указанной биспецифичной молекулы.

12. Применение фармацевтической композиции по п.10 или 11 в изготовлении медикамента, подходящего для стимуляции опосредованного иммунной системой ответа.

13. Применение фармацевтической композиции по п.10 или 11 в изготовлении медикамента, подходящего для лечения заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы.

14. Применение биспецифической молекулы по любому из пп.1-9 в изготовлении медикамента, пригодного для стимуляции опосредованного иммунной системой ответа.

15. Применение биспецифической молекулы по любому из пп.1-9 в изготовлении медикамента, пригодного для лечения заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы.

16. Применение фармацевтической композиции по п.10 или 11 для стимуляции опосредованного иммунной системой ответа.

17. Применение фармацевтической композиции по п.10 или 11 для лечения заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы.

18. Применение биспецифичной молекулы по любому из пп.1-9 для стимуляции опосредованного иммунной системой ответа.

19. Применение биспецифичной молекулы по любому из пп.1-9 для лечения заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы.

20. Применение по любому из пп.13, 15, 17 и 19, характеризующееся тем, что указанное заболевание или состояние представляет собой рак или инфекцию.

21. Применение по п.20, характеризующееся тем, что указанный рак характеризуется присутствием раковой клетки, выбранной из группы, состоящей из клетки опухоли надпочечника, ассоциированного со СПИДом рака, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитарной опухоли, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, метастатической опухоли головного мозга, рака молочной железы, опухоли каротидного тельца, рака шейки матки, хондросаркомы, хордомы, хромофобной почечно-клеточной карциномы, светлоклеточной карциномы, рака толстой кишки, рака толстой и прямой кишки, кожной доброкачественной фиброзной гистиоцитомы, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эпендимомы, саркомы Юинга, внескелетной мукоидной хондросаркомы, несовершенного костного фиброгенеза, фиброзной дисплазии кости, рака желчного пузыря или рака желчного протока, рака желудка, гестационной трофобластической болезни, эмбрионально-клеточной опухоли, рака головы и шеи, гепатоклеточной карциномы, опухоли островковых клеток поджелудочной железы, саркомы Капоши, рака почки, лейкоза, липомы/доброкачественной липоматозной опухоли, липосаркомы/злокачественной липоматозной опухоли, рака печени, лимфомы, рака легких, медуллобластомы, меланомы, менингиомы, множественной эндокринной неоплазии, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринных опухолей, рака яичников, рака поджелудочной железы, папиллярной тиреокарциномы, опухоли парашитовидной железы, педиатрического рака, опухоли оболочек периферических нервов, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, рака предстательной железы, задней увеальной меланомы, редкого гематологического расстройства, метастатического рака почки, рабдоидной опухоли, рабдомиосаркомы, саркомы, рака кожи, саркомы мягких тканей, плоскоклеточного рака, рака желудка, синовиальной саркомы, рака яичка, рака вилочковой железы, тимомы, метастатического рака щитовидной железы и рака матки.

22. Применение по п.20, характеризующееся тем, что указанный рак характеризуется присутствием раковой клетки, выбранной из группы, состоящей из клетки рака толстой и прямой кишки, рака легких, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака предстательной железы, саркомы и тимомы.

23. Применение по п.20, характеризующееся тем, что указанный рак характеризуется присутствием раковой клетки, выбранной из группы, состоящей из клетки рака толстой и прямой кишки, гепатоклеточной карциномы, глиомы, рака почки, рака молочной железы, множественной миеломы, рака мочевого пузыря, нейробластомы, саркомы, неходжкинской лимфомы, немелкоклеточного рака легких, рака яичников, рака поджелудочной железы и рака прямой кишки.

24. Применение по п.20, характеризующееся тем, что указанный рак характеризуется присутствием раковой клетки, выбранной из группы, состоящей из клетки рака толстой и прямой кишки, рака желудка, меланомы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака легкого, фибросаркомы, мантийноклеточной лимфомы человека и лимфомы Беркитта Raji.

25. Применение по п.20, характеризующееся тем, что указанная инфекция характеризуется присутствием бактериального, грибкового, вирусного или протозойного патогена.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифичную молекулу по любому из пп.1-9 и профилактический агент или терапевтический агент.

27. Фармацевтическая композиция по п.26, характеризующаяся тем, что указанный профилактический агент содержит опухоль-специфическое антитело.

28. Набор для стимуляции опосредованного иммунной системой ответа, содержащий биспецифичную молекулу по любому из пп.1-9 и профилактический агент или терапевтический агент.

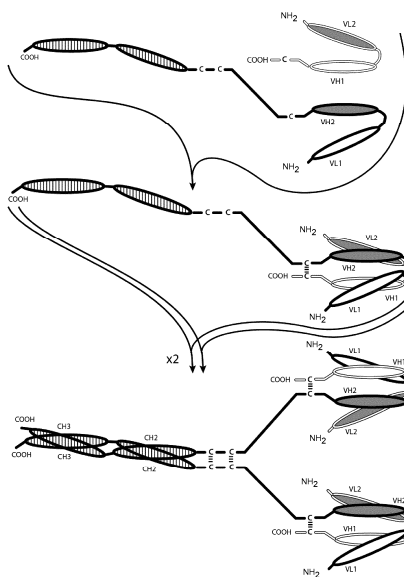
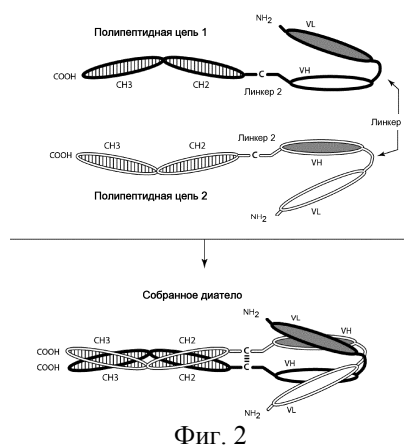
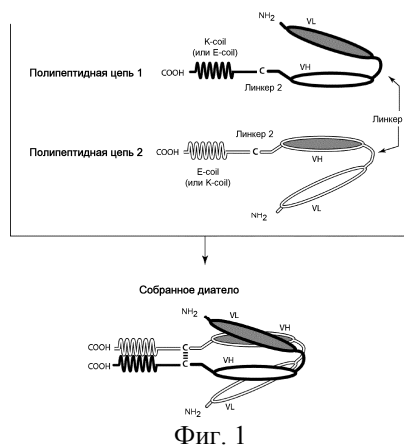
29. Набор для лечения заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы у субъекта, содержащий биспецифичную молекулу по любому из пп.1-9 и профилактический агент или терапевтический агент.

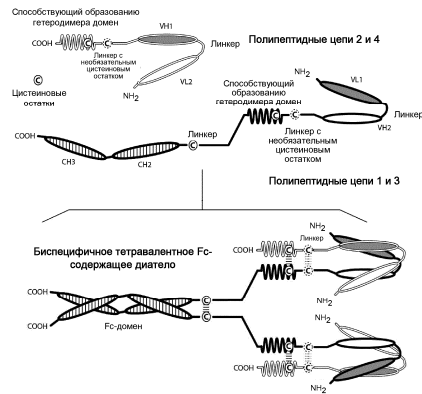
30. Набор по п.28 или 29, характеризующийся тем, что указанный профилактический агент или терапевтический агент содержит опухоль-специфическое антитело.

31. Набор по любому из пп.28-30, характеризующийся тем, что указанная биспецифичная молекула находится в первом контейнере, а указанный профилактический агент или терапевтический агент находится во втором контейнере.

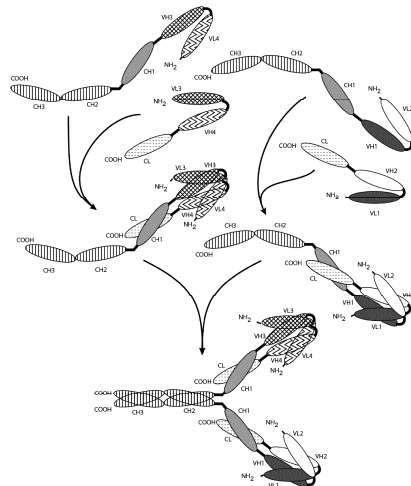
32. Набор по любому из пп.28-30, характеризующийся тем, что указанная биспецифичная молекула и указанный профилактический агент или терапевтический агент находятся в одном контейнере.

33. Способ лечения заболевания или состояния, связанного с супрессией иммунной системы, у субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п.10.

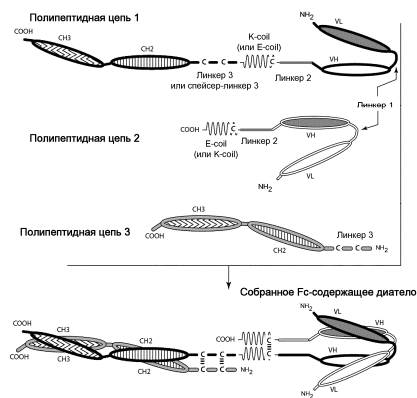




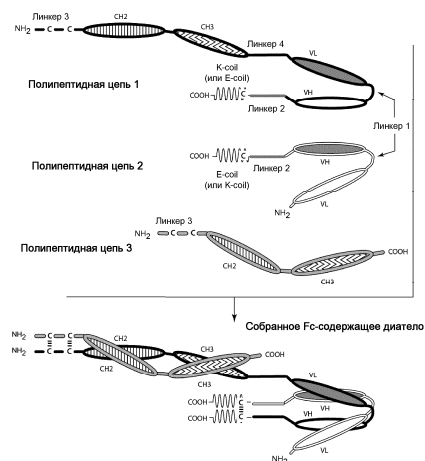
Фиг. 3В



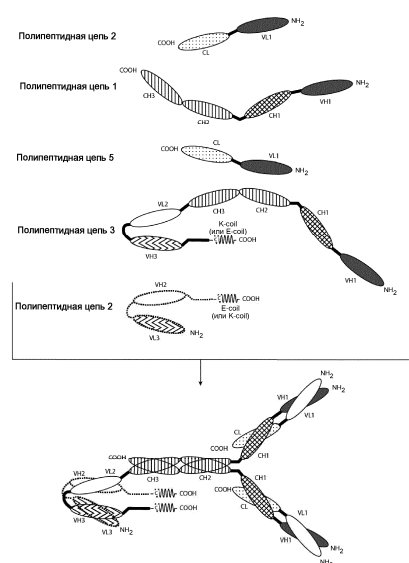
ФИГ. 3С



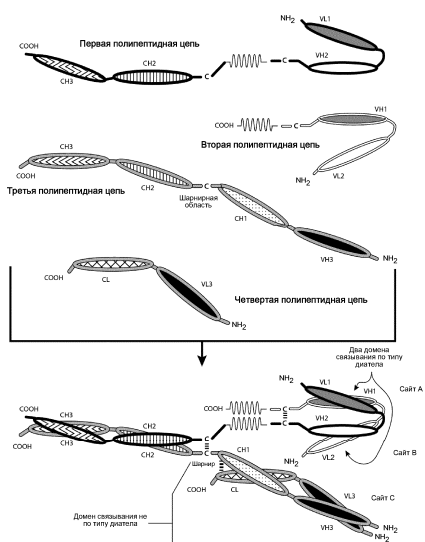
Фиг. 4А



Фиг. 4В

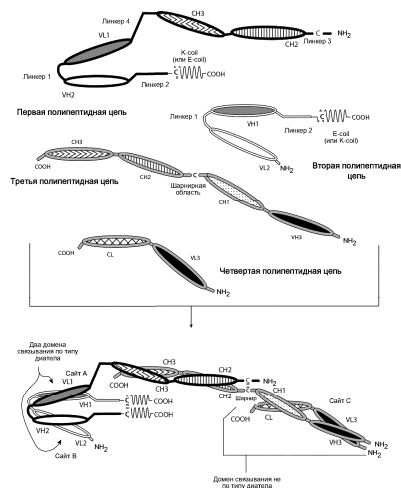


Фиг. 5

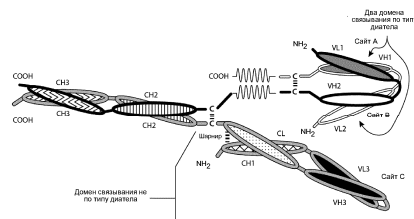


Фиг. 6А

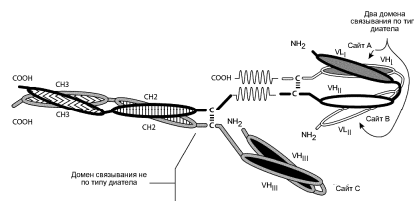
043373



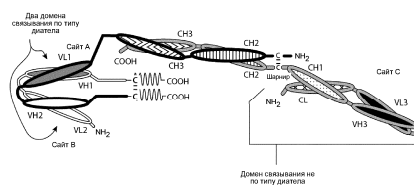
ФИГ. 6В



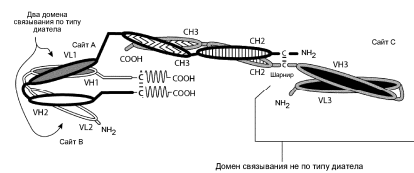
ФИГ. 6С



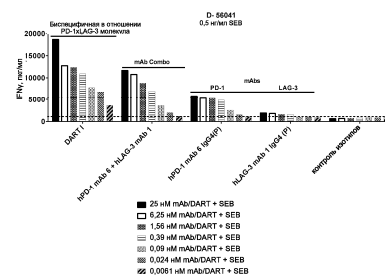
ФИГ. 6D



ФИГ. 6Е

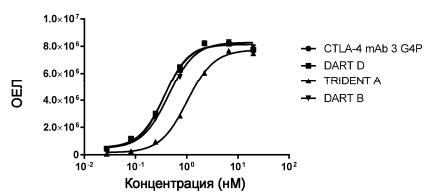


Фиг. 6F



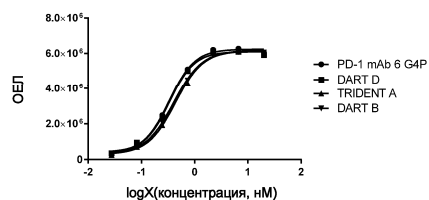
ФИГ. 7

Связывание с иммобилизованным CTLA-4



Фиг. 8А

Связывание с иммобилизованным PD-1



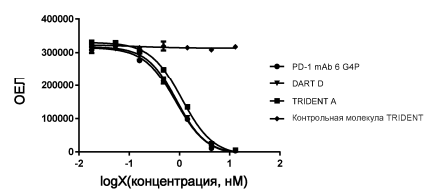
Фиг. 8В

Покрывтие shPD-1-His (1 мкг/мл),
детектирование Fc-γ-специфических антител козы
против иммуноглобулина человека (1:10000)

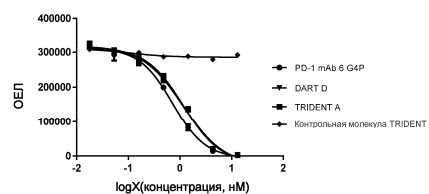
Фиг. 8С

Покрывтие shCTLA-4-Avi-His (1 мкг/мл),
детектирование Fc-γ-специфических антител против
иммуноглобулина человека (1:10000)

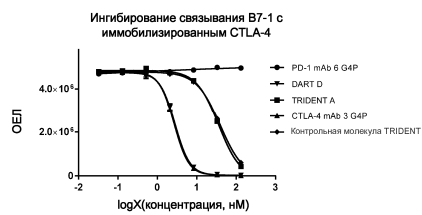
Фиг. 8D

Ингибирование связывания PD-L1 с
иммобилизованным PD-1

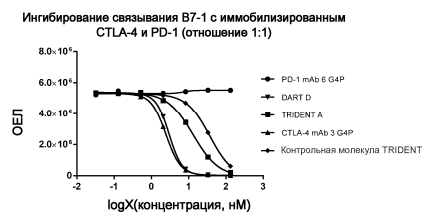
Фиг. 9А

Ингибирование связывания PD-L1 с
иммобилизованным PD-1 и CTLA-4 (отношение 1:1)

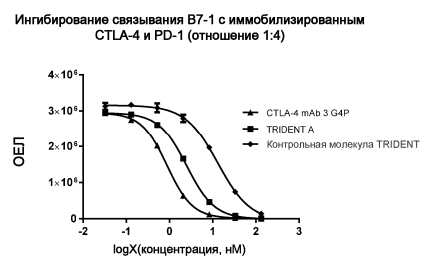
Фиг. 9В



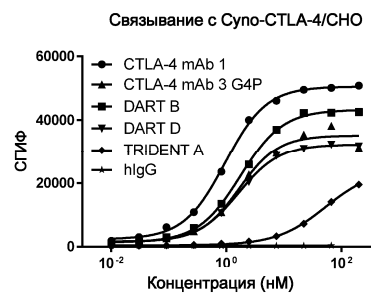
Фиг. 9С



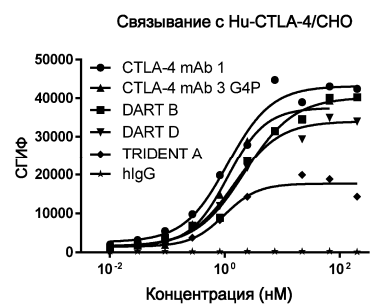
Фиг. 9D



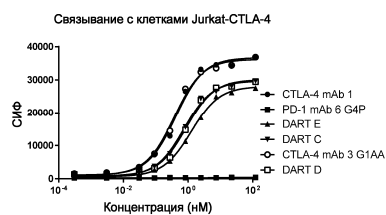
Фиг. 9Е



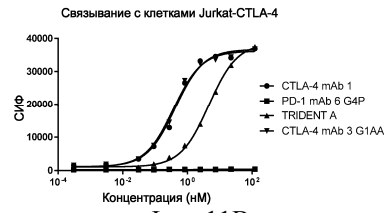
Фиг. 10А



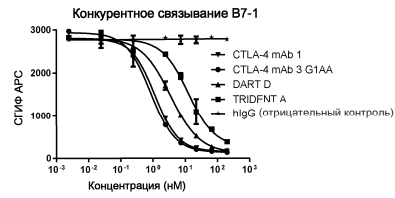
Фиг. 10В



Фиг. 11А

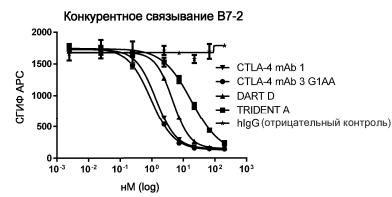


Фиг. 11В



B7-1: 10 нг/мл

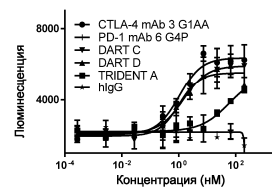
Фиг. 12А



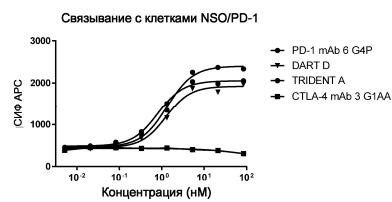
B7-2: 116,8 нг/мл

Фиг. 12В

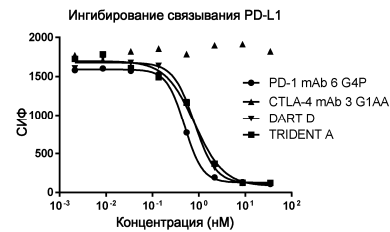
Репортерный анализ блокирования на клетках Jurkat-CTLA-4



Фиг. 13

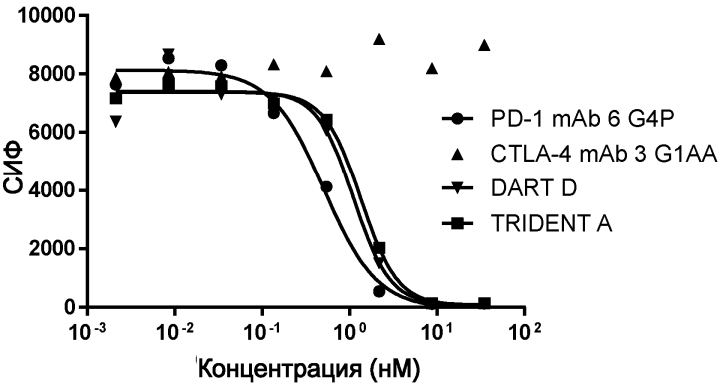


Фиг. 14



Фиг. 15А

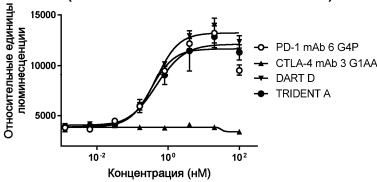
Ингибирование связывания PD-L2



Фиг. 15В

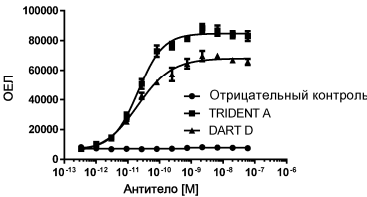
Опосредованная CD3 активация

(анализ на клетках NFAT-luc2/PD-1 Jurkat)



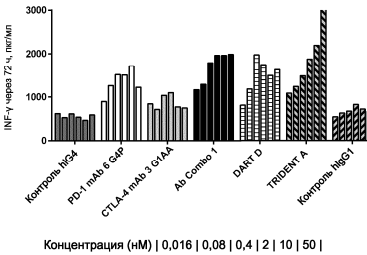
Фиг. 16

Клетки линии U2OS PD-1 (1-199)/CTLA-4, клон # 9
16 ч, 37°C

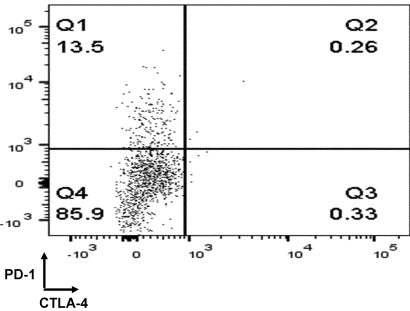


Фиг. 17

D21298 APC + D38774 CD4+ T-клетки

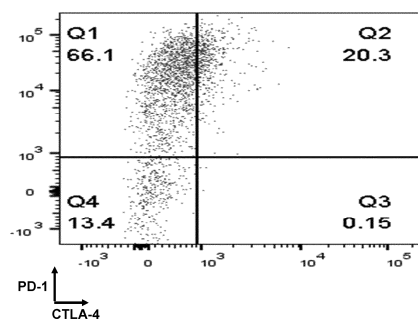


Фиг. 18

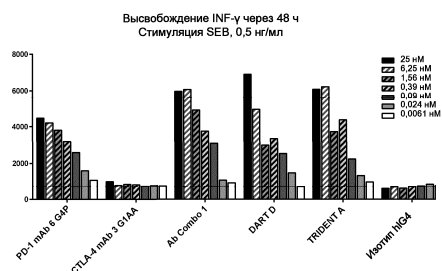


Фиг. 19А

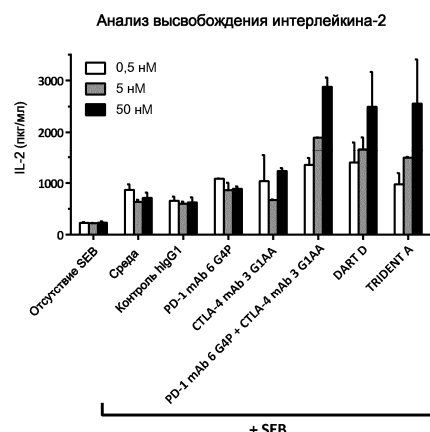
043373



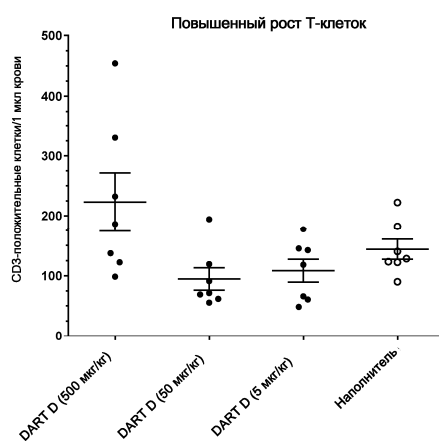
Фиг. 19В



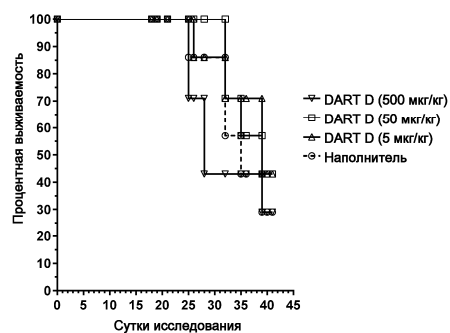
Фиг. 19С



Фиг. 19D

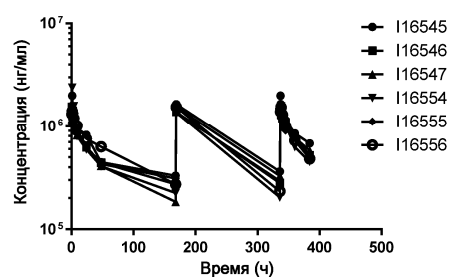


Фиг. 20А



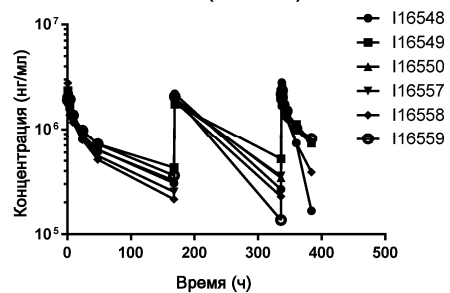
Фиг. 20B

DART D (50 мкг/кг)



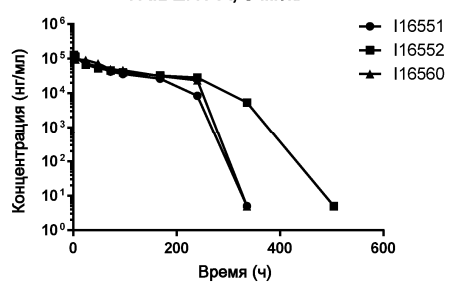
Фиг. 21A

DART D (75 мкг/кг)



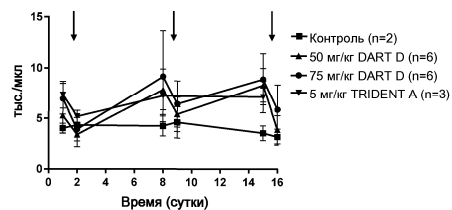
Фиг. 21B

TRIDENT A, 5 мг/кг

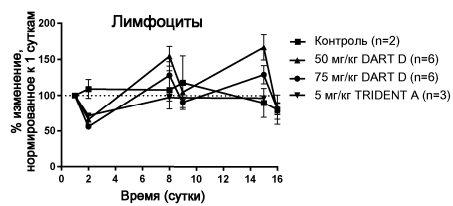


Фиг. 21C

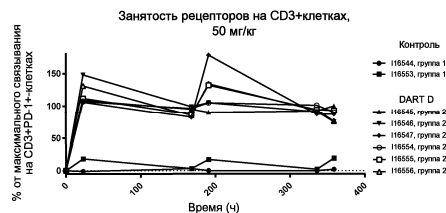
Лимфоциты



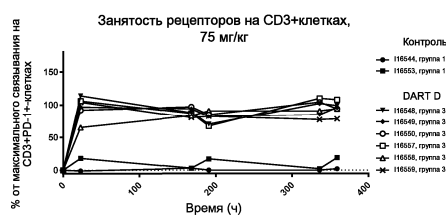
Фиг. 22A



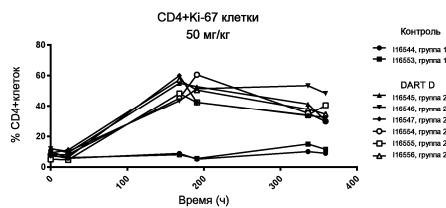
Фиг. 22В



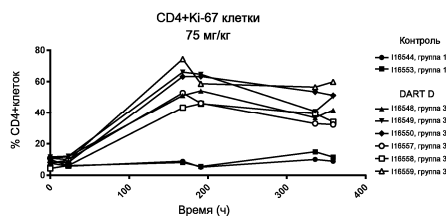
Фиг. 23А



Фиг. 23В



Фиг. 24А



Фиг. 24В

