(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202390378 (13) A1

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
**2023.05.17**

(22) Дата подачи заявки
**2021.07.20**

(51) Int. Cl. ***C07K 19/00*** (2006.01)
***A61K 47/68*** (2017.01)
***A61P 35/00*** (2006.01)
***A61P 37/02*** (2006.01)
***C07K 14/705*** (2006.01)
***C07K 14/725*** (2006.01)
***C07K 16/00*** (2006.01)
***C07K 16/28*** (2006.01)
***C12N 15/62*** (2006.01)
***C12N 5/10*** (2006.01)

## (54) СЛИТЫЕ БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ ПАРУ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОР И БИОЛОГИЧЕСКИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ БЕЛОК

(31) **63/054,180; 63/172,626**
(32) **2020.07.20; 2021.04.08**
(33) **US**
(86) **PCT/CA2021/051006**
(87) **WO 2022/016270 2022.01.27**

(71) Заявитель:
**ЗАЙМВОРКС БиСи ИНК. (CA)**

(72) Изобретатель:
**Диксит Сурджит Бхимарао, Волкерс Джеса, Эскобар-Кабрера Эрик, Спретер Вон Кройденштайн Томас, Вон Россум Анна (CA)**

(74) Представитель:
**Костюшенкова М.Ю., Угрюмов В.М., Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В., Строкова О.В. (RU)**

(57) В настоящем изобретении предложены слитые белки с многофункциональным биологическим дизайном для запрограммированного взаимодействия с мишенью. В определенных вариантах осуществления слитые белки, описанные в данном документе, обеспечивают одновременное взаимодействие с антигеном-мишенью и нацеливание на иммунную контрольную точку или костимулирующий рецептор. В определенных аспектах слитый белок замаскирован от проявления какого-либо внетканевого воздействия на мишень (т.е. токсичности), связанного с взаимодействием с мишенью. В определенных вариантах осуществления слитые белки обеспечивают замаскированный антигенсвязывающий домен, а также замаскированный иммуномодулирующий мишень-связывающий домен, так что запрограммированная активация одной связывающей функции также приводит к активации другой связывающей функции, в результате чего образуется биспецифическая молекула. Таким образом, в настоящем изобретении также предложены способы маскировки и зависимой от условий активации антигенсвязывающих доменов в условиях конкретной ткани-мишени, а также нацеливания и активации иммуномодулирующих мишеней без тяжелых неблагоприятных токсических эффектов.

202390378 A1

202390378 A1

# СЛИТЫЕ БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ ПАРУ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОР И БИОЛОГИЧЕСКИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ БЕЛОК

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[0001]** С разработкой моноклональных антител и других биологических препаратов в качестве лекарственных средств можно разработать высокоспецифичные и таргетные терапевтические агенты. Применение этих агентов, однако, часто затруднено тем фактом, что большинство молекулярных мишеней, которые могли бы помечать пораженную клетку, например, раковую, могут также появляться в пораженных (нормальных) клетках в организме пациента, хотя и с некоторой степенью дифференциальное выражение. В результате активные нацеленные биомолекулы при использовании в качестве терапевтических агентов могут проявлять непредусмотренную активность не там, где они должны действовать для достижения терапевтического эффекта, что может привести к потенциальной токсичности и нежелательным побочным эффектам. Это называется внеопухолевым воздействием на мишень (также известным как внетканевое воздействие на мишень) и влияет на режим дозирования, а также на баланс между эффективностью и токсичностью лекарственного средства. Внеопухолевое воздействие на мишень может привести к непреднамеренному поглощению и ускоренному клиренсу терапевтического агента нормальными клетками, что приводит к неблагоприятному фармакокинетическому профилю терапевтического средства, также называемому мишень-опосредованным распределением лекарственного средства (TMDD). Таким образом, помимо высокой специфичности в отношении молекулярной мишени, эти задачи требуют особенностей терапевтического дизайна, которые обеспечивают обусловленное и локализованное воздействие терапевтического агента на пораженную клетку/ткань, избегая при этом воздействия лекарственного средства на ту же мишень, экспрессируемую внеопухолевой тканью.

**[0002]** Нацеливание на пути иммунных контрольных точек с помощью положительных или отрицательных костимулирующих молекул может обеспечить устойчивый ответ на лечение при активном вовлечении иммунной системы пациента. К сожалению, терапевтические средства, нацеленные на пути контрольных точек, также могут находиться под влиянием проблем, связанных с токсичностью лекарственных средств, опосредованной мишенью, и клиренса. Также появляется все больше понимания того, что при совместном нацеливании более чем на одну из этих контрольных точек и/или костимулирующих путей или при сочетании этих мишеней контрольных точек с другими неиммунными мишенями

и терапевтическими средствами можно добиться более эффективной активизации иммунного ответа. Следовательно, существует большой интерес к разработке терапевтических стратегий, включающих мишени контрольных точек, но вопросы, связанные с иммуноопосредованными нежелательными явлениями (IRAE), т. е. токсичностью и клиренсом, остаются нерешенными. Дизайн, обеспечивающий зависимое от условий вовлечение терапевтического агента, может обеспечить менее токсичное и более эффективное решение для нацеливания на иммуномодулирующие молекулы.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0003]** В данном документе описан слитый белок, содержащий биологически функциональный белок, пару лиганд-рецептор, первый пептидный линкер и второй пептидный линкер; при этом биологически функциональный белок содержит по меньшей мере первый полипептид и второй полипептид; и пара лиганд-рецептор содержит внеклеточную часть рецептора суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF) и его родственный лиганд или его рецептор-связывающий фрагмент; где лиганд слит с концом первого полипептида через первый пептидный линкер; рецептор слит с тем же соответствующим концом второго полипептида через второй пептидный линкер; и первый и второй пептидные линкеры имеют достаточную длину, чтобы обеспечить связывание лиганда и рецептора. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из первого и второго пептидных линкеров содержит сайт расщепления протеазой. В определенных вариантах осуществления лиганд слит с N-концом первого полипептида через первый пептидный линкер, а рецептор слит с N-концом второго полипептида через второй пептидный линкер.

**[0004]** В определенных вариантах осуществления биологически функциональный белок содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела. В определенных вариантах осуществления биологически функциональный белок состоит из полипептидного каркаса. В определенных вариантах осуществления полипептидный каркас представляет собой димерную область Fc, где первый полипептид состоит из первого полипептида Fc, а второй полипептид состоит из второго полипептида Fc, причем первый и второй полипептиды Fc образуют димерную область Fc. В определенных вариантах осуществления биологически функциональный белок содержит полипептидный каркас.

**[0005]** В определенных вариантах осуществления полипептидный каркас содержит

димерную область Fc. В определенных вариантах осуществления димерная область Fc представляет собой гетеродимерную Fc. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один лиганд или рецептор в паре лиганд-рецептор способен связываться с иммуномодулирующей мишенью.

**[0006]** В некоторых вариантах осуществления пара лиганд-рецептор участвует в клеточном ответе, выбранном из группы, состоящей из: модуляции иммунной контрольной точки, модуляции активности иммунных клеток, модуляции сигналинга Т-клеточного рецептора, модуляции зависимой от Т-клеток цитотоксичности (TDCC), модуляции антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и модуляции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). В некоторых вариантах осуществления рецептор содержит одну или более мутаций, которые увеличивают или уменьшают аффинность связывания рецептора с его родственным лигандом по сравнению с рецептором дикого типа.

**[0007]** В некоторых вариантах осуществления лиганд содержит одну или более мутаций, которые увеличивают или уменьшают аффинность связывания лиганда с его родственным рецептором по сравнению с лигандом дикого типа. В определенных вариантах осуществления пара лиганд-рецептор выбрана из группы, состоящей из: PD1-PDL1, PD1-PDL2, CTLA4-CD80, CD28-CD80, CD28-CD86, CTLA4-CD86, PDL1-CD80, ICOS-ICOSL, NCRSRLG1-NKp30 и CD47-SIRPa. В определенных вариантах осуществления пара лиганд-рецептор представляет собой PD1-PDL1. В некоторых вариантах осуществления лиганд PDL1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления рецептор PD1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 9.

**[0008]** В определенных вариантах осуществления пара лиганд-рецептор представляет собой CTLA4-CD80. В определенных вариантах осуществления лиганд CD80 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 187 или SEQ ID NO: 189. В определенных вариантах осуществления рецептор CTLA4 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 26.

**[0009]** В определенных вариантах осуществления рецептор и лиганд слиты с соответствующими N-концами первого и второго полипептидов. В определенных вариантах осуществления один из первого или второго пептидных линкеров содержит

более одного сайта расщепления протеазой. В определенных вариантах осуществления один из пептидных линкеров, слитых с лигандом или рецептором, сконструирован таким образом, чтобы содержать один или более дополнительных сайтов расщепления протеазой, и при этом один или более сайтов расщепления протеазой в лиганде или рецепторе и сайт расщепления протеазой в первом или втором пептидном линкере расщепляются одной и той же протеазой или разными протеазами.

**[0010]** В определенных вариантах осуществления протеаза выбрана из группы, состоящей из: сериновой протеазы, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP18 (коллагеназы 4), MMP19, MMP20, MMP21, адамализина, серрализина, астацина, каспазы 1, каспазы 2, каспазы 3, каспазы 4, каспазы 5, каспазы 6, каспазы 7, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, каспазы 11, каспазы 12, каспазы 13, каспазы 14, катепсина A, катепсина B, катепсина D, катепсина E, катепсина K, катепсина S, гранзима B, гуанидинобензоатазы (GB), гепсина, эластазы, легумаина, матриптазы, матриптазы 2, меприна, нейрозины, MT-SP1, неприлизина, плазмина, PSA, PSMA, TACE, TMPRSS3, TMPRSS4, uPA, кальпаина, FAP и KLK. В определенных вариантах осуществления протеаза представляет собой uPA или матриптазу.

**[0011]** В некоторых вариантах осуществления длина пептидного линкера составляет 3-50 или 5-20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления один из первого или второго пептидных линкеров не имеет сайта расщепления протеазой. В определенных вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой линкер ($Gly_nSer$), где линкер ($Gly_nSer$) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из $(Gly_3Ser)_n(Gly_4Ser)_1$, $(Gly_3Ser)_1(Gly_4Ser)_n$, $(Gly_3Ser)_n(Gly_4Ser)_n$, и $(Gly_4Ser)_n$, где n представляет собой целое число от 1 до 5. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой линкер $(EAAAK)_n$, где n представляет собой целое число от 1 до 5. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность EAAAKEAAAK (SEQ ID. NO: 38). В определенных вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой полипролиновый линкер, необязательно PPP или PPPP. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит последовательность шарнирной области иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую до 30 процентов различий в идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью шарнирной области иммуноглобулина дикого типа. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит сайт расщепления протеазой, содержащий аминокислотную

последовательность MSGRSANA (SEQ ID NO: 28).

**[0012]** Также в данном документе описан слитый белок, содержащий область Fab и область Fc; где область Fab содержит полипептид VH и полипептид VL, которые образуют антигенсвязывающий домен, и пару лиганд-рецептор, содержащую внеклеточную часть рецептора суперсемейства иммуноглобулинов и его родственный лиганд или его рецептор-связывающий фрагмент; где лиганд слит с N-концом одного из полипептидов VH или VL через первый пептидный линкер, а рецептор слит с N-концом другого полипептида VH или VL через второй пептидный линкер; при этом первый и второй пептидные линкеры имеют достаточную длину, чтобы сделать возможным связывание лиганда и рецептора; где по меньшей мере один из первого и второго пептидных линкеров содержит сайт расщепления протеазой; и при этом пара лиганд-рецептор стерически препятствует связыванию антигенсвязывающего домена с его родственным антигеном.

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из первого и второго полипептидов содержит первый полипептид VH и первый полипептид VL, причем первые полипептиды VH и VL образуют первый антигенсвязывающий домен антитела, где лиганд слит с одним из первых полипептидов VH или VL через первый пептидный линкер, а рецептор слит с другим из первых полипептидов VH или VL через второй пептидный линкер, и где пара лиганд-рецептор стерически препятствует связыванию первого антигенсвязывающего домена с его родственным антигеном. В определенных вариантах осуществления первый и второй полипептиды дополнительно содержат димерную Fc. В определенных вариантах осуществления димерная область Fc представляет собой гетеродимерную Fc.

**[0014]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к C-концу лиганд-линкер-VL, рецептор-линкер-VL, лиганд-линкер-VH или рецептор-линкер-VH.

**[0015]** В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к C-концу лиганд-расщепляемый линкер-VL, рецептор- расщепляемый линкер -VL, лиганд- расщепляемый линкер -VH, или рецептор- расщепляемый линкер -VH.

**[0016]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к C-концу лиганд-линкер (SEQ ID NO:114)-VL, рецептор-линкер (SEQ ID NO:114)-VL, лиганд-

линкер (SEQ ID NO:14)-VH, или рецептор-линкер (SEQ ID NO:14)-VH.

**[0017]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к C-концу лиганд-линкер (SEQ ID NO:145)-VL, рецептор-линкер (SEQ ID NO:145)-VL, лиганд-линкер (SEQ ID NO:145)-VH, или рецептор-линкер (SEQ ID NO:145)-VH.

**[0018]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к C-концу лиганд-линкер (SEQ ID NO:147)-VL, рецептор-линкер (SEQ ID NO:147)-VL, лиганд-линкер (SEQ ID NO:147)-VH, или рецептор-линкер (SEQ ID NO:147)-VH.

**[0019]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к C-концу лиганд-линкер (SEQ ID NO:154)-VL, рецептор-линкер (SEQ ID NO:154)-VL, лиганд-линкер (SEQ ID NO:154)-VH, или рецептор-линкер (SEQ ID NO:154)-VH.

**[0020]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к C-концу лиганд-линкер (SEQ ID NO:203)-VL, рецептор-линкер (SEQ ID NO:203)-VL, лиганд-линкер (SEQ ID NO:203)-VH, или рецептор-линкер (SEQ ID NO:203)-VH.

**[0021]** В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один лиганд или рецептор пары лиганд-рецептор способен связываться с иммуномодулирующей мишенью. В определенных вариантах осуществления пара лиганд-рецептор участвует в клеточном ответе, выбранном из группы, состоящей из: модуляции иммунной контрольной точки, модуляции активности иммунных клеток, модуляции сигналинга Т-клеточного рецептора, модуляции зависимой от Т-клеток цитотоксичности (TDCC), модуляции антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и модуляции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

**[0022]** В определенных вариантах осуществления рецептор содержит одну или более мутаций, которые увеличивают или уменьшают аффинность связывания рецептора с его родственным лигандом по сравнению с рецептором дикого типа. В определенных вариантах осуществления лиганд содержит одну или более мутаций, которые увеличивают или уменьшают аффинность связывания лиганда с его родственным рецептором по сравнению с лигандом дикого типа. В определенных вариантах осуществления пара лиганд-рецептор выбрана из группы, состоящей из: PD1-PDL1, PD1-PDL2, CTLA4-CD80, CD28-CD80, CD28-CD86, CTLA4-CD86, PDL1-CD80, ICOS-ICOSL, NCRSRLG1-NKp30 и CD47-

SIRPa. В определенных вариантах осуществления пара лиганд-рецептор представляет собой PD1-PDL1. В некоторых вариантах осуществления лиганд PDL1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления рецептор PD1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 9. В определенных вариантах осуществления пара лиганд-рецептор представляет собой CTLA4-CD80. В определенных вариантах осуществления лиганд CD80 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 25. В определенных вариантах осуществления рецептор CTLA4 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 26.

**[0023]** В некоторых вариантах осуществления рецептор и лиганд слиты с соответствующими N-концами первого и второго полипептидов. В некоторых вариантах осуществления один из первого или второго пептидных линкеров содержит более одного сайта расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления один из лиганда или рецептора сконструирован таким образом, чтобы он содержал один или более дополнительных сайтов расщепления протеазой, и при этом один или более сайтов расщепления протеазами в лиганде или рецепторе и сайт расщепления протеазами в первом или втором пептидном линкере расщепляются одной и той же протеазой или разными протеазами.

**[0024]** В определенных вариантах осуществления протеаза выбрана из группы, состоящей из: сериновой протеазы, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP18 (коллагеназы 4), MMP19, MMP20, MMP21, адамализина, серрализина, астацина, каспазы 1, каспазы 2, каспазы 3, каспазы 4, каспазы 5, каспазы 6, каспазы 7, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, каспазы 11, каспазы 12, каспазы 13, каспазы 14, катепсина A, катепсина B, катепсина D, катепсина E, катепсина K, катепсина S, гранзима B, гуанидинобензоатазы (GB), гепсина, эластазы, легумаина, матриптазы, матриптазы 2, меприна, нейрозины, MT-SP1, неприлизина, плазмина, PSA, PSMA, TACE, TMPRSS3, TMPRSS4, uPA, кальпаина, FAP и KLK. В определенных вариантах осуществления протеаза представляет собой uPA или матриптазу. В определенных вариантах осуществления длина пептидного линкера составляет 3-50 или 5-20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления один из первого или второго пептидных линкеров не имеет сайта расщепления протеазой. В определенных вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой линкер ($Gly_nSer$), где линкер ($Gly_nSer$) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы,

состоящей из $(Gly_3Ser)_n(Gly_4Ser)_1$, $(Gly_3Ser)_1(Gly_4Ser)_n$, $(Gly_3Ser)_n(Gly_4Ser)_n$, и $(Gly_4Ser)_n$, где n представляет собой целое число от 1 до 5. В определенных вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой линкер $(EAAAK)_n$, где n представляет собой целое число от 1 до 5. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер, который не имеет сайт расщепления протеазой, содержит аминокислотную последовательность EAAAKEAAAK (SEQ ID. NO: 38). В определенных вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой полипролиновый линкер, необязательно PPP или PPPP. В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой полипептидный линкер из глицина (G), пролина (P), необязательно GPPPG, GGPPPGG, GPPPPG или GGPPPGG. В определенных вариантах осуществления пептидный линкер содержит последовательность шарнирной области иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую до 30 процентов различий в идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью шарнирной области иммуноглобулина дикого типа. В определенных вариантах осуществления пептидный линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, содержит аминокислотную последовательность MSGRSANA (SEQ ID NO: 28).

**[0025]** В определенных вариантах осуществления связывание первого антигенсвязывающего домена с его родственным антигеном снижено в 10 раз или более по сравнению с исходным антигенсвязывающим доменом, который не слит с парой лиганд-рецептор. В определенных вариантах осуществления расщепление сайта расщепления протеазой в клеточной среде высвобождает один член пары лиганд-рецептор из слитого белка, тем самым позволяя антигенсвязывающему домену связываться с его родственным антигеном.

**[0026]** В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой Fab. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен связывает антиген, который экспрессируется на раковой клетке или иммунной клетке. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен связывает антиген, который экспрессируется на Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен связывается с опухолеассоциированным антигеном (TAA). В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из: кластера дифференцировки 3 (CD3), рецептора эпидермального фактора роста человека 2 (HER2), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), мезотелина

(MSLN), тканевого фактора (TF), кластера дифференцировки 19 (CD19), тирозин-протеинкиназы Met (c-Met), кластера дифференцировки 40 (CD40) и кадгерина 3 (CDH3).

**[0027]** В определенных вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела содержат второй антигенсвязывающий домен, содержащий второй полипептид VH и второй полипептид VL. В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит вторую пару лиганд-рецептор, где лиганд второй пары лиганд-рецептор слит с одним из вторых полипептидов VH или VL с помощью третьего пептидного линкера и рецептор второй пары лиганд-рецептор слит с другим из вторых полипептидов VH или VL с помощью четвертого пептидного линкера, при этом по меньшей мере один из третьего и четвертого пептидных линкеров содержит сайт расщепления протеазой, и при этом пара лиганд-рецептор стерически препятствует связыванию второго антигенсвязывающего домена с его родственным антигеном. В определенных вариантах осуществления слитый белок связывается с двумя различными антигенами. В определенных вариантах осуществления один антиген представляет собой антиген, экспрессируемый Т-клетками, а другой антиген представляет собой антиген, экспрессируемый раковыми клетками. В определенных вариантах осуществления слитый белок связывается с CD3 и HER2.

**[0028]** Также в данном документе описан слитый белок, содержащий область Fc, содержащую первый полипептид Fc и второй полипептид Fc, и пару лиганд-рецептор, содержащую внеклеточную часть рецептора суперсемейства иммуноглобулинов и его родственный лиганд или его рецептор-связывающий фрагмент; где лиганд слит с концом первого полипептида Fc через первый пептидный линкер, а рецептор слит с таким же соответствующим концом второго полипептида Fc через второй пептидный линкер; при этом первый и второй пептидные линкеры имеют достаточную длину, чтобы сделать возможным соединение лиганда и рецептора; и где по меньшей мере один из первого и второго пептидных линкеров содержит сайт расщепления протеазой.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**[0029]** Эти и другие особенности, аспекты и преимущества данного изобретения станут более понятными с учетом следующего описания и прилагаемых графических материалов, на которых:

**[0030]** На **Фиг. 1**(A) показано схематическое изображение структуры некоторых слитых белков, описанных в данном документе. Путем слияния PD-1 (клетчатая заявка) и PD-L1

(полосатая заявка) с N-концами тяжелой и легкой цепи, соответственно, паратоп Fab (серая заливка) может быть стерически заблокирован гетеродимером суперсемейства Ig, который образуется между ними. При удалении одной стороны этой маски посредством TME-специфического протеолитического расщепления (переключателя) одного из линкеров, который вводится между маскирующим доменом и Fab, часть маски может быть высвобождена, а связывание с мишенью может быть восстановлено. Кроме того, часть маски, которая остается ковалентно присоединенной к Fab, добавляет функциональности за счет связывания со своим иммуномодулирующим партнером. На Фиг. 1(B) показана схема антитела с двумя плечами Fab, замаскированными с использованием пар доменов IgSF, присоединенных на N-конце расщепляемыми или нерасщепляемыми протеазами TME линкерами. Паратопы Fab a-TAA 1 и a-TAA 2 могут быть одинаковыми или разными, а пары IgSF 1:2 и 3:4 могут быть одинаковыми или разными. На Фиг. 1(C) показана схема конструкции Fab x scFv с плечом Fab, специфичным для мишени 1, и плечом scFv, специфичным для мишени 2. Плечо Fab и связывание с мишенью 1 маскируются парой доменов IgSF, присоединенной к N-концам с использованием расщепляемых или не расщепляемых протеазой TME линкеров.

**[0031] На Фиг. 2** представлено схематическое изображение модифицированного биспецифического слитого белка CD3 x Her2 Fab x scFv Fc, описанного в данном документе. Одно плечо антителоподобной молекулы содержит анти-CD3 Fab, которая блокируется маской PD-1/PD-L1, а другое плечо содержит анти-Her2 scFv.

**[0032] На Фиг. 3** показаны хроматограммы СВЭЖХ-ЭХ и профили КЭ-ДСН в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях для репрезентативных биспецифических вариантов CD3 x Her2 Fab x scFv Fc. (A) Хроматограмма СВЭЖХ-ЭХ незамаскированного варианта 30421, (B) профили КЭ-ДСН незамаскированного варианта 30421 в невосстанавливающих (слева) и восстанавливающих (справа) условиях, (C) хроматограмма СВЭЖХ-ЭХ замаскированного, нерасщепляемого варианта 30423, (D) профили КЭ-ДСН замаскированного, нерасщепляемого варианта 30423 в невосстанавливающих (слева) и восстанавливающих (справа) условиях, (E) хроматограмма СВЭЖХ-ЭХ замаскированного, варианта с расщепляемой легкой цепью 30430, (F) профили КЭ-ДСН замаскированного варианта с расщепляемой легкой цепью 30430 в невосстанавливающих (слева) и восстанавливающих (справа) условиях, (G) хроматограмма СВЭЖХ-ЭХ замаскированного варианта с расщепляемой тяжелой цепью 30436, (H) профили КЭ-ДСН замаскированного варианта с расщепляемой тяжелой цепью 30436 в

невосстанавливающих (слева) и восстанавливающих (справа) условиях.

**[0033] На Фиг. 4** показано наложение термограмм ДСК для немодифицированного (30421) и замаскированный PD-1:PD-L1 вариантов (30430, 30436) исследуемой системы CD3 x Her2 Fab x scFv Fc.

**[0034]** На **Фиг. 5** показаны профили КЭ-ДСН в восстанавливающих условиях репрезентативных вариантов без (-uPa) и с обработкой uPa (+uPa) в течение 24 ч при 37 °C при соотношении 1:50 uPa:вариант. Показаны профили для незамаскированного (30421), замаскированного, но нерасщепляемого (30423) и замаскированного расщепляемого вариантов (30430, 30436, 31934).

**[0035] На Фиг. 6** показаны результаты нативного связывания вариантов, нацеленных на CD3, с клетками Jurkat, как определено с помощью ELISA. Результаты показаны для незамаскированного варианта (30421), конструкций с присоединенным фрагментом только PD-L1 или PD-1 (31929, 31931) и вариантов с полной нерасщепляемой маской (30423) или с полной маской и расщепляемым фрагментом PD-L1 или PD-1 (30430, 30436). Для образцов вариантов 30423, 30430, 30436 были протестированы необработанные (-uPa) и обработанные uPa (+uPa) образцы.

**[0036] На Фиг. 7** показано уничтожение опухолевых клеток JIMT-1 пан-Т-клетками, как определено в анализе TDCC после обработки сконструированными вариантами, связывающими Т-клетки и опухолевые клетки. Результаты показаны для незамаскированного варианта (30421), варианта только с фрагментом PD-1, присоединенного к тяжелой цепи (31929), и вариантов с полной нерасщепляемой маской (30423) или с полной маской и расщепляемым фрагментом PD-L1 на легкой цепи (30430). Для варианта 30430 были протестированы необработанные (-uPa) и обработанные uPa (+uPa) образцы. Нерелевантное антитело к RSV (22277) использовали в качестве отрицательного контроля.

**[0037] На Фиг. 8** показаны результаты исследования нативного связывания с помощью проточной цитометрии выбранных вариантов, нацеленных на CD3, с клетками CHO-S, трансфицированными (A) PD-L1, и (B) трансфицированными PD-1. Результаты показаны для незамаскированного варианта (30421), конструкций с присоединенным фрагментом только PD-L1 или PD-1 (31929, 31931) и вариантов с полной нерасщепляемой маской

(30423, 30426) или с полной маской и расщепляемым фрагментом PD-L1 или PD-1 (30430, 30436). Fc-гибрид фрагмента PD-1 с созревшей аффинностью также включено (31829). Для образцов вариантов 30423, 30426, 30430, 30436 были протестированы необработанные (-uPa) и обработанные uPa (+uPa) образцы.

**[0038] На Фиг. 9** показана схема анализ репортерного гена гибрида PD-1/PD-L1, в котором исследуется перекрестное связывание Т-клеток и клеток JIMT-1 и блокаду взаимодействия контрольной точки PD-1:PD-L1 (A), а также анализ того же самого (B). Результаты показаны для незамаскированного варианта (30421) и такого же незамаскированного варианта в комбинации с избытком антитела к PD-L1 (30421 + 150 нМ анти-PD-L1). Также исследовали конструкцию только с фрагментом PD-1, присоединенным к тяжелой цепи (31929), и варианты с полной расщепляемой маской (30423) или с полной маской и расщепляемым фрагментом PD-L1 на легкой цепи (30430). Для варианта 30430 тестировали необработанные (-uPa) и обработанные uPa (+uPa) образцы. Нерелевантное антитело к RSV (22277) использовали в качестве отрицательного контроля. Измерения проводились трижды, и показаны планки погрешностей, отражающие стандартное отклонение.

**[0039] На Фиг. 10** представлено изображение, представляющее модифицированный моноспецифический двухвалентный слитый белок, направленный против опухоль-ассоциированных антигенов (TAA). Паратоп Fab стерически блокируется маской PD-1/PD-L1.

**[0040] На Фиг. 11** показаны хроматограммы СВЭЖХ-ЭХ (A-J) и профили ДСН-ПААГ в невосстанавливающих условиях (K) или профили КЭ-ДСН в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях (L) замаскированных слитых белков, направленных против EGFR, MSLN, TF, CD19, cMet, CDH3. Для всех слитых белков показаны данные для нерасщепляемых вариантов (31722, 31728, 31736, 31732, 28647, 28662), а для EGFR, MSLN, TF и CD19 также включены образцы расщепляемых вариантов (31723, 31729, 31737, 31733).

**[0041] На Фиг. 12** показаны профили ДСН-ПААГ-электрофореза в восстанавливающих условиях для репрезентативных слитых белков, направленных против (A) EGFR, (B) MSLN, (C) TF, (D) CD19. Исследуются необработанные (-uPa) и обработанные uPa (+uPa) образцы. Для каждой системы показаны данные для uPa-нерасщепляемого варианта (31722, 31728, 31736, 31732) и варианта с последовательностью расщепления u-Pa между VL и фрагментом PD-L1 (31723, 31729, 31737, 31733).

**[0042] На Фиг. 13** показаны результаты исследования нативного связывания с помощью проточной цитометрии для выбранных слитых белков, направленных против различных антигенов, со следующими линиями клеток, экспрессирующими этот антиген: (A) EGFR на MDA-MB-468, (B) MSLN на OVCAR3, (C) TF на MDA-MB-231, (D) CD19 на Raji, (E) cMet на EBC1, (F) CDH3 на JIMT1. Для всех систем показаны данные для нерасщепляемых вариантов (31722, 31728, 31736, 31732, 28647, 28662), а для EGFR, MSLN, TF и CD19 также включены образцы расщепляемых вариантов (31723, 31729, 31737, 31733) и протестированы без (-uPa) и с обработкой uPa (+uPa). Для всех систем также включен немодифицированный контроль (32474, 16427, 16417, 6323, 4372, 17606, 17214), а также нерелевантный контроль для cMet и CDH3 (22277). Там, где это возможно (EGFR, MSLN, TF), данные ППР включены для сравнения.

**[0043]** На **Фиг. 14** показаны результаты исследования ингибирования роста клеток NCI-H292, обработанных вариантами, нацеленными на EGFR. Данные показаны для незамаскированных (32474) и замаскированных PD-1:PD-L вариантов. Замаскированные варианты включают нерасщепляемую форму (31722), а также форму с расщепляемым фрагментом PD-L1 на легкой цепи (31723). Также включен нерелевантный контроль (22277). Для всех вариантов образцы тестируют с (-uPa) и без (+uPa) обработкой. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение для трех измерений.

**[0044] На Фиг. 15** представлено схематическое изображение модифицированного биспецифического варианта CD3 x Her2 Fab x scFv Fc, который был исследован в этой работе. Одно плечо слитого белка содержит анти-CD3 Fab, который блокируется маской CD80/CTLA4, тогда как другое плечо содержит анти-Her2 scFv.

**[0045] На Фиг. 16** показана хроматограмма СВЭЖХ-ЭХ и профили КЭ-ДСН в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях для варианта 30444. (A) Хроматограмма СВЭЖХ-ЭХ замаскированного варианта 30444 с расщепляемой легкой цепью, (B) профили КЭ-ДСН в невосстанавливающих (слева) и восстанавливающих (справа) условиях для замаскированного варианта 30444 с расщепляемой легкой цепью, (C) профили КЭ-ДСН в невосстанавливающих (слева) и восстанавливающих (справа) условиях для замаскированного варианта 30444 с расщепляемой легкой цепью, (D-F) хроматограммы СВЭЖХ-ЭХ замаскированного варианта с расщепляемой легкой цепью 33525, 33526, 33527

после очистки белком А.

**[0046] На Фиг. 17** показаны профили КЭ-ДСН в восстанавливающих условиях для варианта 30444 без обработки (-uPa) и с обработкой uPa (+uPa).

**[0047] На Фиг. 18** показаны результаты нативного связывания вариантов, нацеленных на CD3, с клетками Jurkat, как определено с помощью ELISA. Результаты показаны для незамаскированного варианта (30421), варианта с полной маской на основе PD-1/PD-L1 расщепляемым фрагментом PD-L1 (30430) и варианта с полной маской на основе CD80/CTLA4 и расщепляемого фрагмента CTLA4 (30444). Для образцов вариантов 30430 и 30444 тестировали необработанные (-uPa) и обработанные uPa (+uPa) образцы.

**[0048] На Фиг. 19** показана схема IgV иммуномодулирующей пары (например, PD-1:PD-L1), слитых посредством шарнира с гетеродимерной Fc IgG. Расщепление одного из двух линкеров ассоциированной с TME протеазой, например, uPa, высвобождает один фрагмент (например, PD-L1) и оставляет фрагмент с желаемой функцией (например, PD-1), все еще присоединенный к Fc и доступный для связывания с его партнером на клетках. В случае PD-1 он способен связывать PD-L1 на клетках-мишенях и ингибировать функцию контрольной точки.

**[0049] На Фиг. 20** показаны (A-C) хроматограммы СВЭЖХ-ЭХ и (D) профили КЭ-ДСН в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях для вариантов, нацеленных на CD40. (E) КЭ-ДСН в восстанавливающих условиях, (F) данные связывания по проточной цитометрии и (G) результаты анализа RGA CD40 также показаны для тех же вариантов без (-uPa) и с (+uPa) обработкой uPa. Исследуемые соединения включают вариант без маски (32477), вариант с нерасщепляемой маской на основе PD-1/PD-L1 (32478) и вариант с маской на основе PD-1/PD-L1, в которой фрагмент PD-L1 может быть удален расщеплением с помощью uPa (32479). В функциональное исследование с помощью анализа RGA (G) также включены нативный партнер по связыванию CD40 CD40L и нерелевантный контроль (v22277). Данные для анализа RGA CD40 обобщены в таблице в (H).

**[0050] На Фиг. 21** (A) PD1 и PDL1 состоят из доменов иммуноглобулина, которые образуют комплекс. На изображении связывающий Fab состыкован с комплексом PD1-PDL1 на паратопном конце. Связывание PD1 и PDL1 с цепями VH и VL с помощью

соответствующего линкера может блокировать связывание антигена. (B) Структуры других иллюстративных иммуномодулирующих пар, которые могут служить масками: PD-1/PD-L1 (PDB:4ZQK), PD-1/PD-L2 (PDB: 3BP5), CTLA4/CD86 (PDB:1I85), NCRSRLG1/NKp30 (PDB: 3PV6), SIRPa/CD47 (PDB:4KJY), CTLA4/CD80 (PDB: 1I8L).

**[0051] На Фиг. 22** показаны результаты нативного связывания вариантов, нацеленных на CD3, с пан-Т-клетками, как определено с помощью проточной цитометрии. Результаты показаны для незамаскированного варианта (30421), одноцепочечного антитела к CD3 (18560), конструкции с присоединенным только фрагментом PD-1 (31929) и вариантов с полной нерасщепляемой маской (30423) или с полной маской и расщепляемым фрагментом PD-L1 (30430, 30436). Для образцов вариантов 30423, 30430 были протестированы необработанные (-uPa) и обработанные uPa (+uPa) образцы. Также показаны данные для нерелевантного контроля (22277).

**[0052] На Фиг. 23 А и В** показано уничтожение опухолевых клеток HCC1954, JIMT-1, HCC827 и MCF-7 пан-Т-клетками, как определено в двух повторах анализа TDCC после обработки сконструированными вариантами, связывающими Т-клетки и опухолевые клетки. Результаты показаны для незамаскированного варианта (30421), а также для комбинации незамаскированного варианта с насыщающими количествами антитела к PD-L1 (30421 + 120 нМ атезолизумаба), варианта, в котором только фрагмент PD-1 присоединен к тяжелой цепи, (31929) и вариантов с полной расщепляемой маской (30423) или с полной маской и расщепляемым фрагментом PD-L1 на легкой цепи (30430). Для вариантов 30430 и 30423 тестировали необработанные (-uPa) и обработанные uPa (+uPa) образцы. Нерелевантное антитело к RSV (22277) использовали в качестве отрицательного контроля.

**[0053]** На **Фиг. 24** показано высвобождение IFNγ пан-Т-клетками, определенное в двух повторах анализа TDCC с раковыми клетками HCC1954, JIMT-1, HCC827 и MCF-7 после обработки сконструированными вариантами, связывающими Т-клетки и опухолевые клетки. Результаты показаны для незамаскированного варианта (30421), а также для комбинации незамаскированного варианта с насыщающими количествами антитела к PD-L1 (30421 + 120 нМ атезолизумаба), варианта, в котором только фрагмент PD-1 присоединен к тяжелой цепи, (31929) и вариантов с полной расщепляемой маской (30423) или с полной маской и расщепляемым фрагментом PD-L1 на легкой цепи (30430). Для вариантов 30430 и 30423 тестировали необработанные (-uPa) и обработанные uPa (+uPa)

образцы. Нерелевантное антитело к RSV (22277) использовали в качестве отрицательного контроля.

**[0054] На Фиг. 25** показано количество рецепторов Her2 и PD-L1 на клетку для набора линий раковых клеток, используемых в анализах TDCC и RGA, как определено с помощью проточной цитометрии.

**[0055]** На **Фиг. 26 A-D** показаны результаты анализа репортерного гена гибрида PD-1/PD-L1, в котором исследуются перекрестное связывание Т-клеток четырех различных линий раковых клеток (HCC1954, JIMT-1, HCC827, MCF-7) и блокаду взаимодействия контрольной точки PD-1:PD-L1. Результаты показаны для незамаскированного варианта (30421), а также для комбинации незамаскированного варианта с насыщающими количествами антитела к PD-L1 (30421 + 150 нМ атезолизумаба), варианта, в котором только фрагмент PD-1 присоединен к тяжелой цепи, (31929) и вариантов с полной расщепляемой маской (30423) или с полной маской и расщепляемым фрагментом PD-L1 на легкой цепи (30430). Для варианта 30430 тестировали необработанные (-uPa) и обработанные uPa (+uPa) образцы. Нерелевантное антитело к RSV (22277) использовали в качестве отрицательного контроля.

**[0056]** На **Фиг. 27** представлено изображение, представляющее модифицированный моноспецифический двухвалентный слитый белок, нацеленный на EGFR (a-EGFR). Паратоп Fab стерически блокируется маской SIRPα/CD47.

**[0057]** На **Фиг. 28** показаны (A) хроматограмма СВЭЖХ-ЭХ и (B) профили КЭ-ДСН в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях для полностью замаскированного SIRPα/CD47 расщепляемого варианта, нацеленного на EGFR (34164). (C) КЭ-ДСН в восстанавливающих условиях также показано для того же варианта без (-uPa) и с (+uPa) обработкой uPa.

**[0058]** На **Фиг. 29** показаны результаты анализа нативного связывания с помощью многопараметрического анализа на EGFR-положительных клетках H292. Исследуемые соединения включают незамаскированный, нацеленный на EGFR контроль (v32474), нацеленный на EGFR, замаскированный SIRPα/CD47, полностью расщепляемый вариант (34164) без (-uPa) и с (+uPa) обработкой uPa и нерелевантный контроль (v22277).

**[0059] На Фиг. 30** показаны (A) данные из одной точки титрования (1 нМ) в эксперименте по связыванию с помощью проточной цитометрии с клетками Her2+/PD-L1+ JIMT-1, а также (B) данные из эксперимента по образованию мостиков между человеческими пан-Т-клетками и клетками Her2+/PD-L1+ JIMT-1. Данные показаны для триспецифического варианта, в котором только фрагмент PD-1 присоединен к тяжелой цепи (v31929), а также для биспецифических вариантов в том же формате, но неспособных связываться ни с PD-L1, ни с Her2 (v32497 и v33551, соответственно). Данные для нерелевантного контроля (v22277) включены в анализ образования мостиков (B).

**[0060] На Фиг. 31** показан механизм рекрутирования Т-клеток и активации замаскированного PD-1:PD-L1 варианта CD3 x Her2 Fab x scFv Fc. (A) Терапевтическое антитело направляется в микроокружение опухоли (TME) посредством связывания с TAA. (B) Фрагмент PD-L1 маски высвобождается посредством расщепления специфической для TME протеазы. (C) Активированное терапевтическое средство взаимодействует и активирует Т-клетку для уничтожения опухолевых клеток через незамаскированный паратоп анти-CD3 и ингибирует активность контрольной точки путем связывания с PD-L1 на опухолевой клетке.

**[0061] На Фиг. 32** показаны результаты нативного связывания вариантов, нацеленных на CD3, с пан-Т-клетками, как определено с помощью проточной цитометрии. Результаты показаны для незамаскированного варианта (30421), конструкции с присоединенным только фрагментом PD-1 (31929) и варианта с нефункциональным доменом PD-1, присоединенным к тяжелой цепи (32497). Также показаны данные для нерелевантного контроля (22277).

**[0062] На Фиг. 33** показано уничтожение опухолевых клеток JIMT-1 пан-Т-клетками, как определено в анализе TDCC после обработки сконструированными вариантами, связывающими Т-клетки и опухолевые клетки. Результаты показаны для незамаскированного варианта (30421), варианта только с фрагментом PD-1, присоединенным к тяжелой цепи (31929), и варианта с нефункциональным доменом PD-1, присоединенным к тяжелой цепи (32497).

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### Определения

**[0063]** Термины, используемые в формуле изобретения и описании, кратко определены в

данном документе и более подробно ниже.

**[0064]** «Слитый белок» относится к белку, который содержит более одной полипептидной области или домена, связанных друг с другом, например, пептидными связями. Соответственно, термин «слитый», используемый в данном документе, относится к полипептидным последовательностям, связанным друг с другом посредством пептидной связи. Примеры включают антитела или каркасы, слитые с иммуномодулирующими парами лиганд/рецептор. Слитые белки, описанные в данном документе, иногда называют «вариантами» или «конструкциями».

**[0065]** «Биологически функциональный белок» в широком смысле относится к полипептиду или белку, обладающему биологической функцией, например, к антителу, например, к димерной Fc.

**[0066]** «Пары лиганд-рецептор» относятся к полипептиду рецептора и полипептиду лиганда, которые специфически связываются друг с другом. Примеры включают PD-1-PD-L1, CTLA4-CD80 или CD28-CD80.

**[0067]** «Связывающий рецептор фрагмент», относится к любому полипептиду, который специфически связывается с рецептором пары лиганд-рецептор. Связывающий рецептор фрагмент может быть природным или не встречающимся в природе.

**[0068]** «Иммуномодулирующая» молекула относится к молекуле, обладающей способностью прямо или косвенно модулировать иммунный ответ, например, усиливать или подавлять иммунный ответ и/или активность иммунных клеток.

**[0069]** «Пептидный линкер» относится к пептиду, который соединяется или связывается с другими пептидами или полипептидами.

**[0070]** Термины «область Fc», «Fc» и «домен Fc» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области.

**[0071]** «Биспецифический» относится к биологически функциональному белку, который может специфически связываться с двумя различными эпитопами.

**[0072]** «Полиспецифический» относится к биологически функциональному белку, который может специфически связываться с двумя или более различными молекулами-мишенями или эпитопами.

**[0073]** «Маскированный» относится к полипептидному домену, например, к антигенсвязывающему домену антитела, связывание которого с последовательностью-мишенью стерически затруднено, или к лиганду, связывание которого с его родственным партнером по связыванию стерически затруднено, например, с его рецептором.

**[0074]** «Активированный протеазой» или «расщепленный протеазой» или «расщепленный» относится к слитому белку, содержащему сайт расщепления протеазой после того, как он был расщеплен протеазой.

**[0075]** «Сайт расщепления протеазой» относится к аминокислотной последовательности в слитом белке, которая содержит последовательность, распознаваемую протеазой, и расщепляется протеазой.

**[0076]** «Иммунная контрольная точка» относится к регуляторному пути иммунной системы, который регулирует активацию иммунной системы.

**[0077]** «Специфически связывается» (и его грамматические варианты), когда речь идет о связывании конкретного антигена, эпитопа, лиганда или рецептора, означает связывание, которое заметно отличается от неспецифического взаимодействия.

**[0078]** Как более подробно описано ниже, «млекопитающее» включает как людей, так и отличных от человека животных и включает, но не ограничивается ими, людей, отличных от людей приматов, собак, кошек, мышей, крупный рогатый скот, лошадей и свиней.

**[0079]** Следует отметить, что используемые в описании изобретения и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает иное.

**[0080]** Сокращения, используемые в этой заявке, включают следующее: PD-1 (белок программируемой гибели клеток 1); PDL-1 (лиганд 1 белка программируемой гибели

клеток); CD3 (кластер дифференцировки 3); CTLA4 (цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4 или кластер дифференцировки 152); CD80 (кластер дифференцировки 80); CD28 (кластер дифференцировки 28); CD86 (кластер дифференцировки 86); ICOS (индуцибельный костимулятор Т-клеток); ICOSL (лиганд индуцируемого Т-клеточного костимулятора); CD47 (кластер дифференцировки 47); SIRPA (сигнальный регуляторный белок альфа), HHLA2 (белок 2, ассоциированный с длинными концевыми повторами человеческого эндогенного ретровируса H), NKp30 (рецептор 3 естественных клеток-киллеров), NCR3LG1 (лиганд 1 цитотоксического рецептора 3 естественных клеток-киллеров), HHLA2 (белок 2, ассоциированный с LTR HERV-H), VISTA (V-домен Ig, супрессор активации Т-клеток), VTCN1 (ингибитор 1 активации Т-клеток, содержащий иммуноглобулиноподобный домен), CD276 (кластер дифференцировки 276), рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (HER2 ), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), мезотелин (MSLN), тканевой фактор (TF), кластер дифференцировки 19 (CD19), тирозин-протеинкиназа Met (c-Met) и кадгерин 3 (CDH3).

**[0081]** Как используется в данном документе, термин «около» относится к приблизительно +/-10% вариации от данного значения. Следует понимать, что такое изменение всегда включается в любое данное значение, предоставленное в данном документе, независимо от того, упоминается ли оно конкретно.

**[0082]** Как используется в данном документе, термины «включающий», «имеющий», «охватывающий» и «содержащий» и их грамматические вариации являются включающими или неограничивающими, и не исключают дополнительные неперечисленные элементы и/или этапы способов. Термин «по существу состоящий», при использовании в данном документе в связи с композицией, применением или способом, отмечает возможно присутствующие дополнительные элементы и/или этапы способа, но такие дополнения фактически не влияют на стиль, которым излагаются композиция, способ или применяемые функции. Термин «состоящий из», при использовании в данном документе в связи с композицией, применением или способом, исключает наличие дополнительных элементов и/или этапов способа. Композиция, применение или способ, описанные в данном документе как включающие определенные элементы и/или стадии, в некоторых вариантах осуществления, также могут по существу состоять из таких элементов и/или стадий, а в других вариантах реализации состоят из таких элементов и/или стадий, независимо от конкретного упоминания в этих вариантах осуществления.

**[0083]** Предполагается, что любой способ осуществления, обсуждаемый в данном документе, может быть реализован в отношении любого другого способа, применения или композиции, описанных в данном документе, и наоборот.

**[0084]** Следует также понимать, что положительное прочтение признака в одном вариант осуществления служит основанием для исключения этого признака в еще одном варианте осуществления. В частности, если перечень вариаций представлен для данного варианта реализации или пункта формулы, следует понимать, что один или более вариантов могут быть удалены из этого перечня, а сокращенный перечень может образовывать альтернативный вариант осуществления, независимо от того, отмечается ли конкретно такой альтернативный вариант осуществления или нет.

**[0085]** Различные аминокислотные последовательности и последовательности клонов, упомянутые в данном документе, находятся в таблице АА.

**Слитые белки**

**[0086]** В данном документе описаны слитые белки, содержащие биологически функциональный белок, например, антитело или полипептидный каркас, слитый с парой лиганд-рецептор. В слитых белках по настоящему изобретению биологически функциональный белок содержит по меньшей мере первый полипептид и второй полипептид, и лиганд слит с концом одного из полипептидов через первый пептидный линкер, а рецептор слит с тем же самым соответствующим концом другого полипептида через второй пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из первого и второго пептидных линкеров содержит сайт расщепления для протеазы, которая естественным образом встречается в целевом клеточном окружении, например, в микроокружении опухоли. Также описаны способы применения описанных в данном документе слитых белков.

**[0087]** Слитые белки в соответствии с настоящим изобретением маскируются для снижения любого внетканевого (например, внеопухолевого) воздействия на мишень (т.е. токсичности), связанного с взаимодействием с мишенью. Расщепление пептидного(-ых) линкера(-ов), содержащего сайт расщепления протеазой в целевом клеточном окружении, приводит к демаскировке слитого белка. В некоторых вариантах осуществления слитые белки по настоящему изобретению содержат полипептидный каркас, слитый с парой

лиганд-рецептор. В этом контексте слитый белок маскируется тем, что каждый из лиганда и рецептора в паре лиганд-рецептор не может вступать в контакт с нативным родственным рецептором или лигандом из-за их ассоциации друг с другом. Расщепление пептидного(-ых) линкера(-ов), содержащего сайт расщепления протеазой, в целевом клеточном окружении приводит к демаскировке слитого белка путем высвобождения одного члена пары лиганд-рецептор из слитого белка, тем самым позволяя другому члену пары лиганд-рецептор связать своего родственного партнера. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена биологическая конструкция для запрограммированного нацеливания на контрольную точку или костимулирующий рецептор.

**[0088]** В некоторых вариантах осуществления слитые белки по настоящему изобретению содержат антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающий домен, слитый с парой лиганд-рецептор. В этом контексте слитый белок маскируется тем, что пара лиганд-рецептор стерически препятствует связыванию антигенсвязывающего домена с его родственным антигеном. Слитый белок дополнительно маскируется тем, что каждый из лиганда и рецептора в паре лиганд-рецептор препятствует взаимодействию с нативным родственным рецептором или лигандом из-за их ассоциации друг с другом. Расщепление пептидного(-ых) линкера(-ов), содержащего сайт расщепления протеазой, в целевом клеточном окружении приводит к демаскировке слитого белка путем высвобождения одного члена пары лиганд-рецептор из слитого белка, тем самым позволяя как другому члену пары лиганд-рецептор связать своего родственного партнера, так и антигенсвязывающему домену связать его родственный антиген. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена многофункциональная биологическая конструкция для запрограммированного взаимодействия с антигеном-мишенью и одновременного нацеливания на контрольную точку или костимулирующий рецептор. В определенных аспектах конструкция слитых белков, описанных в данном документе, снижает мишень-опосредованное распределение лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления слитые белки содержат замаскированный антигенсвязывающий домен, например, биологически функциональный белок, а также замаскированный иммуномодулирующий мишень-связывающий домен, например, пару лиганд-рецептор, так что запрограммированная активация одной связывающей функции приводит к активации других связывающих функций, в результате чего образуется бифункциональная молекула. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены способы маскировки и условной активации

антигенсвязывающих доменов в конкретной ткани-мишени, а также нацеливания и активации иммуномодулирующих мишеней с уменьшением нежелательных токсических эффектов.

## Пары лиганд-рецептор

**[0089]** В данном документе описаны слитые белки, каждый из которых содержит пару лиганд-рецептор. В некоторых аспектах пара лиганд-рецептор представляет собой иммуномодулирующую пару доменов лиганд-рецептор, принадлежащих к суперсемейству иммуноглобулинов (IgSF) (Natarajan, Kannan; Mage, Michael G; and Margulies, David H (April 2015) Immunoglobulin Superfamily. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester., A F Williams 1, A N Barclay (1988) The Immunoglobulin Superfamily--Domains for Cell Surface Recognition Annu Rev Immunol 6:381-405).

**[0090]** Суперсемейство иммуноглобулинов (IgSF) классифицирует, как правило, встречающийся домен в белках, основанный на основной иммуноглобулиновой складке (Ig). Эта Ig складка состоит из бета-сэндвича, состоящего в общей сложности из 7 антипараллельных бета-цепей, которые расположены в виде двух бета-листов из 3 и 4 цепей (Фиг. 34A). Два бета-сэндвича связаны между собой дисульфидным мостиком между цепями B и F. Структурным мотивом, обычно идентифицируемым в Ig складках, является мотив «греческий ключ». Общими подгруппами IgSF являются домены IgV, IgC1 и IgC2. Члены идентифицируются на основе общих структурных особенностей и расположения бета-цепей. В то время как домены IgC содержат 7 бета-цепей, расположенных в виде двух слоев из 3 и 4 цепей (Фиг. 34B), домены IgV содержат 9 бета-цепей, расположенных в двух листах из 4 и 5 цепей (Фиг. 34C, D). IgC1 и IgC2 отличаются структурным расположением цепей. Домены IgSF могут быть обнаружены в большом количестве биологически важных белков, включая антигенные рецепторы, иммуноглобулины и иммуномодулирующие рецепторы. Экспонированные на поверхности остатки основного бета-сэндвича, а также петли, соединяющие бета-цепи, могут служить поверхностями взаимодействия для распознавания антигена, других структурных доменов в третичной/четвертичной сборке или в паре рецептор/лиганд. Поскольку сайт распознавания антигена иммуноглобулинов (пара VH-VL в антителе, таком как IgG1) содержит димер двух доменов IgV, димер доменов IgSF или IgV структурно совместим и образует стерическую маску для этого сайта распознавания антигена, если ковалентно присоединен к N-концу антитела (Фиг. 21).

**[0091]** В определенных вариантах осуществления пара лиганд-рецептор является

иммуномодулирующей, например, представляет собой иммунную контрольную точку, вызывает модуляцию эффекторной функции иммунных клеток, модуляцию сигналинг Т-клеточного рецептора, модулирует взаимодействия между антигенпрезентирующими клетками и эффекторными клетками или их комбинациями. В определенных вариантах осуществления пара лиганд-рецептор содержит внеклеточную часть рецептора IgSF и его родственный лиганд или его рецептор-связывающий фрагмент. Рецептор-связывающий фрагмент относится к любому полипептиду, который специфически связывается с рецептором пары лиганд-рецептор и может встречаться в природе или не встречаться в природе. «Природный / встречающийся в природе» в контексте данного документа и применительно к объекту относится к тому факту, что объект можно найти в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, присутствующая в организме, которая может быть выделена из природного источника и которая не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории, является встречающейся в природе. В определенных вариантах осуществления пары лиганд-рецептор могут представлять собой два взаимодействующих белковых домена, принадлежащих к надсемейству иммуноглобулиновых доменов. В контексте данного документа термин «не встречающийся в природе / неприродный» относится к сконструированной полипептидной последовательности со структурным сходством с IgSF, такой как мутант встречающегося в природе белка.

**[0092]** В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к применению иммуномодулирующей пары доменов лиганд-рецептор, принадлежащих IgSF, в качестве маски антитела или фрагмента антитела, что препятствует связыванию антигена-мишени. Примеры иммуномодулирующих пар доменов лиганд-рецептор, принадлежащих к суперсемейству иммуноглобулинов, включают, но не ограничиваются ими, пары семейств B7/CD28 (такие как PD1-PDL1, PD1-PDL2, CTLA4-CD80, CD28-CD80, CD28-CD86, CTLA4-CD86, PDL1-CD80, and ICOS-ICOSL, NCR3LG1-NKp30, HHLA2-CD28H и CD47-SIRPα. CD80 (также известный как B7-1), CD86 (B7-2), PDL1 (B7-H1), ICOSL (B7-H2), PDL2 (B7-DC), CD276 (B7-H3), VTCN1 (B7-H4), VISTA (B7-H5), NCR3LG1 (B7-H6), HHLA2 (B7-H7) относятся к семейству B7.Белки семейства B7 обычно считаются лигандами и образуют пары с членами семейства CD28, которое включает CD28, CTLA4, CD28H, NKp30, PD1 и ICOS. (S.M.West and X.A.Deng. Considering B7-CD28 as a family through sequence and structure. Exp Biol Med (Maywood) 2019; 244(17): 1577-1583; doi: 10.1177/1535370219855970).

**[0093]** В определенных вариантах осуществления пара лиганд-рецептор содержит член семейства IgSF B7/CD28. В определенных вариантах осуществления лиганд и рецептор содержат внеклеточную часть полипептида суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). В определенных вариантах осуществления лиганд и рецептор содержат внеклеточные части полипептида вариабельного домена (IgV) иммуноглобулина IgSF. В определенных вариантах осуществления лиганд является членом семейства IgSF B7, а рецептор является членом семейства IgSF CD28.

**[0094]** В некоторых вариантах осуществления пара лиганд-рецептор содержит костимулирующий рецептор лейкоцитов. Примеры костимулирующих рецепторов лейкоцитов, принадлежащих к семейству B7/CD28, включают ICOS (также известный как CD278) и CD28. Примеры пар костимулирующий лиганд-рецептор включают CD80:CD28, CD86:CD28 и ICOS:ICOSL (лиганд ICOS). Примеры коингибирующих пар лиганд-рецептор включают PD1-PDL1, PD1-PDL2, CTLA4-CD80, CTLA4-CD86, PDL1-CD80 и CD47-SIRPα. При связывании с N-концом Fab наши результаты, описанные в данном документе, демонстрируют, что они блокируют доступ к CDR и, следовательно, блокируют связывание с антигенами (Фиг. 21A).

**[0095]** Другие члены этого большого IgSF могут использоваться аналогичным образом и выполнять иммуномодулирующую функцию. На Фиг. 21B показано представление известных структур известных членов B7-CD28. Размер и ориентация доменов других пар очень схожи с размерами и ориентацией доменов PD-1 и PD-L1, и, следовательно, их можно использовать для связывания или функциональной блокады, аналогичной паре рецептор-лиганд PD-1/PD-L1.

**[0096]** Концепция функциональной маски не ограничивается членами семейства B7. Например, на Фиг. 21B показано представление структуры SIRPα/CD47, еще одной пары лиганд-рецептор с доменами, принадлежащими IgSF, которая демонстрирует хорошую пространственную совместимость, чтобы располагаться на N-конце Fab и блокировать связывание. Ряд терапевтических кандидатов рассматривают для применения антагонистов этой оси с целью усиления фагоцитоза раковых клеток, что делает их хорошими кандидатами для функциональных масок. (Murata Y, Saito Y, Kotani T, Matozaki T. (2018) CD47-signal regulatory protein α signaling system and its application to cancer immunotherapy. Cancer Sci. 2018 Aug;109(8):2349-2357).

**[0097]** В некоторых вариантах осуществления аффинность доменов лиганд-рецептор в паре лиганд-рецептор слитого белка изменена по сравнению с лигандом и рецептором дикого типа. В некоторых вариантах осуществления один или оба домена лиганд-рецептор в маскирующей паре сконструированы таким образом, чтобы лиганд и рецептор содержали последовательности, отличные от лиганда или рецептора дикого типа. В определенных вариантах осуществления лиганд содержит одну или более мутаций, которые повышают аффинность связывания лиганда с его родственным рецептором. В некоторых вариантах осуществления относительная аффинность связывания лиганда пары лиганд-рецептор по сравнению с лигандом дикого типа превышает в 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000 или 100000 раз аффинность лиганда дикого типа по отношению к его встречающемуся в природе родственному рецептору.

**[0098]** В некоторых вариантах осуществления рецептор содержит одну или более мутаций, которые повышают аффинность связывания рецептора с его родственным лигандом. В некоторых вариантах осуществления относительная аффинность связывания рецептора пары лиганд-рецептор по сравнению с рецептором дикого типа превышает 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, или 100000 раз аффинность рецептора дикого типа по отношению к его встречающемуся в природе родственному лиганду.

**[0099]** В некоторых вариантах осуществления лиганд содержит одну или более мутаций, которые снижают аффинность связывания лиганда с его родственным рецептором. В некоторых вариантах осуществления относительная аффинность связывания лиганда пары лиганд-рецептор по сравнению с лигандом дикого типа более чем в 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, в 500, 1000, 5000, 10000, 50000 или 100000 раз ниже, чем у лиганда дикого типа к его встречающемуся в природе родственному рецептору.

**[00100]** В определенных вариантах осуществления рецептор содержит одну или более мутаций, которые снижают аффинность связывания рецептора с его родственным лигандом. В определенных вариантах осуществления относительная аффинность связывания рецептора пары лиганд-рецептор по сравнению с рецептором дикого типа более чем в 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или 100000 раз меньше, чем у рецептора дикого типа по отношению к его встречающемуся в природе родственному лиганду.

**[00101]** Пара лиганд-рецептор может представлять собой, например, домены IgV PD-L1

(Uniprot ID Q9NZQ7, 33-146) и PD-1 (Uniprot ID Q15116, 18-132). В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой PD-L1 и имеет, например, аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 10. В определенных вариантах осуществления PD-L1 имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 8. В определенных вариантах осуществления PD-L1 имеет аминокислотную последовательность, имеющую около 80%, около 85%, около 90%, или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 8. В определенных вариантах осуществления PD-L1 имеет аминокислотную последовательность, имеющую 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 8. Можно использовать любой вариант PD-L1, например, высокоаффинные варианты, известные в данной области техники, например, варианты, представленные в Z. Laing et al., High-affinity human PD-L1 variants attenuate the suppression of T cell activation; Oncotarget 8, 88360-88375 (2017) или WO2018/170021A1. В некоторых вариантах осуществления рецептор представляет собой высокоаффинный вариант PD-L1. В некоторых вариантах осуществления рецептор представляет собой высокоаффинный вариант PD-L1, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 10, или аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 10.

**[00102]** В определенных вариантах осуществления рецептор представляет собой PD-1 и имеет, например, аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 7 или 11. В определенных вариантах осуществления PD-1 имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 7 или 11. В некоторых вариантах осуществления PD-1 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 7 или 11. В некоторых вариантах осуществления PD-1 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 96 %, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 7 или 11. Можно использовать любой вариант PD-1, например, высокоаффинные варианты, известные в данной области техники, например, те, которые представлены в R. L. Maute *et al.*, Engineering high-affinity PD-1 variants for optimized immunotherapy and immuno-PET imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E6506-6514 (2015), WO2016/022994A2 or E. Lazar-Molnar et al., Structure-guided development of a high affinity human Programmed Cell Death-1: Implications for tumor immunotherapy EBIOMedicine 17. 30-44 (2017) и WO2019/241758A1.

**[00103]** В определенных вариантах осуществления рецептор представляет собой высокоаффинный вариант PD-1. В определенных вариантах осуществления рецептор

представляет собой высокоаффинный вариант PD-1, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 9, или аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 9.

**[00104]** В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой CD80 и имеет, например, аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 25. В определенных вариантах осуществления CD80 имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления CD80 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления CD80 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления CD80 имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 187 или SEQ ID NO: 189. В некоторых вариантах осуществления CD80 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 187 или SEQ ID NO: 189. В некоторых вариантах осуществления CD80 имеет мутации, повышающие его аффинность к своему рецептору или снижающие его склонность к образованию гомодимеров во время приготовления. В определенных вариантах осуществления CD80 имеет аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 25, с одним из следующих наборов мутаций: (a) H18Y, A26E, E35D, M47S, I61S и D90G; (b) E35D, M47S, N48K, I61S, K89N; (c) E35D, D46V, M47S, I61S, D90G, K93E; или (d) H18Y, A26E, E35D, M47S, I61S, V68M, A71G, D90G.

**[00105]** В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой PD-L2 и имеет, например, аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 250. В определенных вариантах осуществления PD-L2 имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 250. В определенных вариантах осуществления PD-L2 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 250. В определенных вариантах осуществления PD-L2 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 250.

**[00106]** В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой CD86 и

имеет, например, аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 248. В определенных вариантах осуществления CD86 имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 248. В определенных вариантах осуществления CD86 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 248. В определенных вариантах осуществления CD86 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 248.

**[00107]** В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой ICOSL и имеет, например, аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 256. В некоторых вариантах осуществления ICOSL имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 256. В определенных вариантах осуществления ICOSL имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 256. В определенных вариантах осуществления ICOSL имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 256.

**[00108]** В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой CD276 и имеет, например, аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 258. В определенных вариантах осуществления CD276 имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 258. В определенных вариантах осуществления CD276 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 258. В определенных вариантах осуществления CD276 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 258.

**[00109]** В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой VTCN1 и имеет, например, аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 259. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VTCN1, которая по существу идентична SEQ ID NO: 259. В определенных вариантах осуществления VTCN1 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 259. В

определенных вариантах осуществления VTCN1 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 259.

**[00110]** В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой VISTA и имеет, например, аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 260. В определенных вариантах осуществления VISTA имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 260. В определенных вариантах осуществления VISTA имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 260. В определенных вариантах осуществления VISTA имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 260.

**[00111]** В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой HHLA2 и имеет, например, аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 262. В определенных вариантах осуществления HHLA2 имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 262. В определенных вариантах осуществления HHLA2 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 262. В определенных вариантах осуществления HHLA2 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 262.

**[00112]** В определенных вариантах осуществления лиганд представляет собой SIRPα и имеет, например, аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 255. В определенных вариантах осуществления SIRPα имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 255. В определенных вариантах осуществления SIRPα имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 255. В некоторых вариантах осуществления SIRPα имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 255.

**[00113]** В некоторых вариантах осуществления рецептор представляет собой CTLA4 и имеет, например, аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 26.

В определенных вариантах осуществления CTLA4 имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 26. В определенных вариантах осуществления CTLA4 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 26. В определенных вариантах осуществления CTLA4 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 26.

**[00114]** В некоторых вариантах осуществления рецептор представляет собой CD28 и имеет, например, аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 253. В определенных вариантах осуществления CD28 имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 253. В определенных вариантах осуществления CD28 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 253. В определенных вариантах осуществления CD28 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 253.

**[00115]** В определенных вариантах осуществления рецептор представляет собой CD28H и имеет, например, аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 263. В определенных вариантах осуществления CD28H имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 263. В определенных вариантах осуществления CD28H имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 263. В определенных вариантах осуществления CD28H имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 263.

**[00116]** В определенных вариантах осуществления рецептор представляет собой NKp30 и имеет, например, аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 264. В определенных вариантах осуществления NKp30 имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 264. В определенных вариантах осуществления NKp30 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 264. В определенных вариантах осуществления NKp30 имеет аминокислотную

последовательность, которая имеет около 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 264.

**[00117]** В некоторых вариантах осуществления рецептор представляет собой ICOS и имеет, например, аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 257. В определенных вариантах осуществления ICOS имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 257. В определенных вариантах осуществления ICOS имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 257. В определенных вариантах осуществления ICOS имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 257.

**[00118]** В определенных вариантах осуществления лиганд и/или рецептор IgSF имеет структуру, подобную вариабельному домену иммуноглобулина (IgV). Аминокислотные последовательности некоторых иллюстративных встречающихся в природе рецепторов домена IgV и лигандов, описанных в данном документе, показаны в таблице CC.

**[00119]** В определенных вариантах осуществления сконструированные не встречающиеся в природе, но связывающиеся лиганды и/или рецепторы пар лиганд-рецептор содержат иммуноглобулиновый домен по меньшей мере с одним из доменов, имеющих аффинность к встречающемуся в природе иммуномодулирующему рецептору.

**[00120]** В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующие пары лиганд-рецептор выбирают для функционирования в качестве антагонистов или агонистов родственной им пары-мишени. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующие пары лиганд-рецептор выбирают для функционирования в качестве антагониста или агониста родственной им пары-мишени в опухолевой среде. В определенных вариантах осуществления один или оба лиганда или рецептора пары лиганд-рецептор предназначены для выполнения функциональной роли после активации расщеплением протеазой.

**Форматы слитых белков**

**[00121]** Слитые белки, описанные в данном документе, могут иметь несколько различных форматов. Можно считать, что слитые белки имеют модульную архитектуру, которая включает по меньшей мере пару лиганд-рецептор, где каждый из лиганда и

рецептора слит с биологически функциональным белком через пептидные линкеры. Биологически функциональный белок, в свою очередь, содержит по меньшей мере первый и второй полипептиды. Например, либо N-конец, либо C-конец лиганда или рецептора пары лиганд-рецептор можно слить с первым и вторым полипептидами биологически функционального белка, например, через пептидный линкер. Лиганд слит с первым полипептидом, а рецептор слит с тем же соответствующим концом второго полипептида. Термин «тот же соответствующий конец» при описании пары лиганд-рецептор, слитой с полипептидами, относится к лиганду и рецептору, каждый из которых слит либо с N-концами первого и второго полипептида, либо с C-концами первого и второго полипептида. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления лиганд слит с N-концом первого полипептида через первый пептидный линкер, а рецептор слит с N-концом второго полипептида через второй пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления лиганд слит с C-концом первого полипептида через первый пептидный линкер, а рецептор слит с C-концом второго полипептида через второй пептидный линкер. Лиганд и рецептор могут быть слиты через их C-концы или их N-концы. И лиганд, и рецептор могут быть слиты через их N- или C-концы, или один из лиганда или рецептора может быть слит через его N-конец, в то время как другой лиганд или рецептор слит через его C-конец.

**[00122]** В некоторых вариантах осуществления N-конец лиганда слит с N-концом первого полипептида через первый пептидный линкер, а N-конец рецептора слит с N-концом второго полипептида через второй пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления C-конец лиганда слит с C-концом первого полипептида через первый пептидный линкер, а C-конец рецептора слит со вторым полипептидом через второй пептидный линкер.

**[00123]** В некоторых вариантах осуществления лиганд слит с концом первого полипептида биологически функционального белка через первый пептидный линкер, который содержит сайт расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления рецептор слит с концом второго полипептида биологически функционального белка через второй пептидный линкер, который содержит сайт расщепления протеазой. В некоторых вариантах осуществления лиганд слит с концом первого полипептида биологически функционального белка через первый пептидный линкер, который содержит сайт расщепления протеазой, а рецептор слит с концом второго полипептида биологически функционального белка через второй пептидный линкер, который содержит сайт расщепления протеазой. Когда и первый, и второй пептидные линкеры содержат сайты

расщепления протеазами, сайты расщепления протеазами могут расщепляться одной и той же протеазой или они могут расщепляться разными протеазами.

**[00124]** В определенных вариантах осуществления лиганд слит с концом первого полипептида биологически функционального белка через первый пептидный линкер, который содержит сайт расщепления протеазой, и лиганд сконструирован так, чтобы включать внутренний сайт расщепления протеазой, который может быть таким же или отличаться от сайта расщепления в первом пептидном линкере. В определенных вариантах осуществления рецептор слит с концом второго полипептида биологически функционального белка через второй пептидный линкер, который содержит сайт расщепления протеазой, и рецептор сконструирован так, чтобы включать внутренний сайт расщепления протеазой, который может быть таким же или отличаться от сайта расщепления в первом пептидном линкере. Включение сайтов расщепления протеазой как в пептидный линкер, так и в член пары лиганд-рецептор, который соединен с биологически функциональным белком с помощью линкера, позволяет расщеплять и инактивировать этот член пары лиганд-рецептор в целевом клеточном окружении, в то время как член пары лиганд-рецептор, который все еще слит с биологически активным белком, демаскируется (т.е. условно активируется).

**[00125]** В определенных вариантах осуществления слитый белок конъюгирован с другим терапевтическим и/или диагностическим компонентом, например, химиотерапевтическим агентом или радиоизотопом.

**Биологически функциональные белки**

**[00126]** Биологически функциональный белок может функционировать как каркас и/или содержать связывающий домен. Примеры полипептидных каркасов включают области Fc иммуноглобулина, альбумин, аналоги и производные альбумина, токсины, цитокины, хемокины, факторы роста и пары белков, такие как домены «лейциновая молния». В определенных вариантах осуществления биологически функциональный белок содержит метку, лекарственное средство или их комбинации. Можно использовать любую известную в данной области техники метку, подходящую для обнаружения описанных в данном документе слитых белков. Биологически функциональный белок может включать любое лекарственное средство, токсин или химическое вещество, известное в данной области техники, которое способно конъюгировать с белком и обеспечивать достижение желаемого биологического результата.

**[00127]** В определенных вариантах осуществления биологически функциональные белки слитых белков, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере один антигенсвязывающий домен. Связывающие домены могут представлять собой, например, связывающие домены на основе иммуноглобулина или миметики антител, не основанные на иммуноглобулине, или другие полипептиды или малые молекулы, способные специфически связываться со своей мишенью, например, природный или сконструированный лиганд. Форматы миметиков антител, не основанные на иммуноглобулинах, включают, например, антикалины, финомеры, аффимеры, альфатела, дарпины и авимеры.

**[00128]** Слитые белки, описанные в данном документе, включают биологически функциональный белок. Примеры биологически функциональных белков включают, но не ограничиваются ими, антитела, например, полипептиды с антигенсвязывающими доменами, и полипептидные каркасы, например, димерную Fc. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды биологически функциональных белков представляют собой полипептиды, содержащие вариабельные и/или константные домены антител или другие домены, придающие слитому белку функцию связывания антигена или каркасную функцию.

***Антитела***

**[00129]** В определенных вариантах осуществления биологически функциональный белок представляет собой антитело или иммуноглобулин. Антитела в соответствии с настоящим изобретением могут принимать различные форматы, как описано в данном документе, включая фрагменты антител. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления биологически функциональный белок представляет собой фрагмент антитела. Термины «антитело» и «иммуноглобулин» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полипептида, кодируемого геном или генами иммуноглобулина, или модифицированной версии гена иммуноглобулина, при этом полипептид специфически связывается с антигеном.

**[00130]** Специфическое связывание можно измерить, например, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), метода поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (с использованием, например, прибора BIAcore) (Liljeblad *et al.*, 2000, *Glyco J,* 17:323-329), или традиционного анализа связывания (Heeley, 2002, *Endocr Res*, 28:217-229). В некоторых вариантах осуществления специфическое связывание

определяется как степень связывания с несвязанным белком, составляющая менее 10% от степени связывания с целевым антигеном, измеренной, например, методом ППР. В некоторых вариантах осуществления специфическое связывание антитела или фрагмента антитела с конкретным антигеном или эпитопом определяется константой диссоциации ($K_D$) $\leq$1 мкМ, например, $\leq$100 нМ, $\leq$10 нМ, $\leq$1 нМ, $\leq$0,1 нМ, $\leq$0,01 нМ, или $\leq$ 0,001 нМ. В некоторых вариантах осуществления специфическое связывание антитела или фрагмента антитела с конкретным антигеном или эпитопом определяется константой диссоциации ($K_D$) $10^{-6}$ М или менее, например, $10^{-7}$ М или менее, или $10^{-8}$ М или менее. В некоторых вариантах осуществления специфическое связывание антитела или фрагмента антитела с конкретным антигеном или эпитопом определяется константой диссоциации ($K_D$) от $10^{-6}$ М до $10^{-13}$ М, например, от $10^{-7}$ М до $10^{-13}$ М, от $10^{-8}$ М до $10^{-13}$ М или от $10^{-9}$ М до $10^{-13}$ М.

**[00131]** Традиционная структурная единица иммуноглобулина, как правило, состоит из двух пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну «легкую» цепь (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда. «Класс» иммуноглобулина относится к типу константного домена, которым обладает его тяжелая цепь. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются альфа ($\alpha$), дельта ($\delta$), эпсилон ($\varepsilon$), гамма ($\gamma$) и мю ($\mu$), соответственно.

**[00132]** В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, основаны на иммуноглобулине класса IgG, например, иммуноглобулине IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, основаны на иммуноглобулине IgG1, IgG2 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, основаны на иммуноглобулине IgG1. В контексте настоящего изобретения, когда антитело основано на определенном изотипе иммуноглобулина, это означает, что антитело содержит всю или часть константной области указанного изотипа иммуноглобулина. Следует понимать, что антитело также может содержать гибриды изотипов и/или подклассов, в некоторых вариантах осуществления.

**[00133]** N-концевой домен каждой полипептидной цепи иммуноглобулина определяет вариабельную область длиной от около 100 до 110 или более аминокислот, которая в

первую очередь отвечает за распознавание антигена. Термины «вариабельная область легкой цепи (VL)» и «вариабельная область тяжелой цепи (VH)» относятся к этим доменам в легкой и тяжелой цепи, соответственно.

**[00134]** Соответственно, можно видеть, что иммуноглобулины содержат разные домены в тяжелой и легкой цепях. Такие домены могут быть перекрывающимися и включать домен Fc (или область Fc), домен CH1, домен CH2, домен CH3, шарнирный домен, константный домен тяжелой цепи (CH1-шарнир-Fc или CH1-шарнир-CH2- CH3), вариабельный домен тяжелой цепи (VH), вариабельный домен легкой цепи (VL) и константный домен легкой цепи (CL). «Домен Fc» включает домены CH2 и CH3 и, необязательно, шарнирный домен (или шарнирную область).

**[00135]** В каждом из доменов VH и VL иммуноглобулина есть три петли, которые имеют гипервариабельность в последовательности и образуют антигенсвязывающий сайт. Каждая из этих петель называется «гипервариабельной областью» или «HVR». Термины «гипервариабельная область (HVR)» и «определяющая комплементарность область (CDR)» используются в данном документе взаимозаменяемо в отношении частей вариабельной области, которые образуют антигенсвязывающий домен. За исключением CDR1 в VH, CDR обычно содержат аминокислотные остатки, образующие гипервариабельные петли. Домены VH и VL состоят из относительно инвариантных участков, называемых каркасными областями (FR), длиной от около 15 до 30 аминокислот, разделенных более короткими CDR, каждая из которых обычно имеет длину от около 5 до 15 аминокислот, хотя иногда может быть длиннее или короче. Три CDR и четыре FR, составляющие каждый домен VH и VL, расположены от N-конца к C-концу следующим образом: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

**[00136]** Широко используется ряд различных определений областей CDR, включая определения, описанные Kabat *et al.* (1983, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, NIH Publication No. 369-847, Bethesda, MD), Chothia *et al.* (1987, *J Mol Biol*, 196:901-917), а также определения по IMGT, AbM и Contact. Эти различные определения включают перекрывающиеся или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. В качестве примера определения CDR согласно Kabat, Chothia, IMGT, AbM и Contact представлены в таблице 1 ниже. Соответственно, как будет очевидно специалисту в данной области техники, точная нумерация и размещение CDR могут отличаться в зависимости от используемой системы нумерации. Однако следует понимать, что описание

в данном документе вариабельного домена тяжелой цепи (VH) включает описание ассоциированных (присущих) CDR тяжелой цепи (HCDR), как определено любой из известных систем нумерации. Аналогично, описание в данном документе вариабельного домена легкой цепи (VL) включает описание ассоциированных (присущих) CDR тяжелой цепи (HCDR), как определено любой из известных систем нумерации.

**Таблица 1: Общие определения CDR[1]**

| **Определение** | **Тяжелая цепь** | | | **Легкая цепь** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **CDR1[2]** | **CDR2** | **CDR3** | **CDR1** | **CDR2** | **CDR3** |
| Kabat | H31-H35B | H50-H65 | H95-H102 | L24-L34 | L50-L56 | L89-L97 |
| Chothia | H26-H32, H33 или H34 | H52-H56 | H95-H102 | L24-L34 | L50-L56 | L89-L97 |
| IMGT | H26-H33, H34, H35, H35A или H35B | H51-H57 | H93-102 | L27-L32 | L50-L52 | L89-L97 |
| AbM | H26-H35B | H50-H58 | H95-H102 | L24-L34 | L50-L56 | L89-L97 |
| Контакт | H30-H35B | H47-H58 | H95-H101 | L30-L36 | L46-L55 | L89-L96 |

[1]Для HCDR2, HCDR3 и CDR легкой цепи может использоваться система нумерации Kabat или Chothia для всех определений, кроме Contact, в которой используется нумерация Chothia

[2] Использование нумерации Kabat. Положение в схеме нумерации Kabat, которая разграничивает конец петли CDR-H1 по Chothia и IMGT, варьируется в зависимости от длины петли из-за размещения вставок за пределами этих определений CDR в положениях 35A и 35B в Kabat. Петля CDR-H1 по IMGT и Chothia может быть однозначно определена с использованием нумерации Chothia. Определения CDR-H1 с использованием нумерации

Chothia: H31-H35 по Kabat, H26-H32 по Chothia, H26-H35 по AbM, H26-H33 по IMGT, H30-H35 по Contact.

**[00137]** Специалист в данной области техники поймет, что может вводиться ограниченное количество аминокислотных замен в последовательности CDR или в последовательности VH или VL известных антител без того, чтобы антитело теряло свою способность связывать свою мишень. Аминокислотные замены-кандидаты могут быть идентифицированы с помощью компьютерного моделирования или с помощью таких методов, как аланиновое сканирование, как описано выше, при этом полученные варианты тестируются на связывающую активность стандартными методами. Например, в некоторых вариантах осуществления EGFR-связывающий домен, содержащийся в слитом белке, содержит набор CDR (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи), которые имеют 90% или более, 95% или более, 98% или более, 99% или более или 100% идентичности последовательностей с набором CDR цетуксимаба или панитумумаба, где связывающий домен сохраняет способность связывать EGFR. В определенных вариантах осуществления EGFR-связывающий домен, содержащийся в слитом белке, содержит вариант этих последовательностей CDR, содержащий от 1 до 10 аминокислотных замен среди трех CDR (т. е. CDR могут быть модифицированы путем включения до 10 аминокислотных замен, при этом может быть модифицирована любая комбинация CDR), например от 1 до 7 аминокислотных замен, от 1 до 5 аминокислотных замен, от 1 до 4 аминокислотных замен, от 1 до 3 аминокислотных замен, от 1 до 2 аминокислотных замен или 1 аминокислотная замена среди CDR, причем вариант сохраняет способность связывать EGFR. Как правило, такие аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены, такие как указанные в столбце 1 или столбце 2 таблицы 4 ниже.

**[00138]** В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере один домен иммуноглобулина из иммуноглобулина млекопитающего, такого как иммуноглобулин быка, иммуноглобулин человека, иммуноглобулин верблюда, иммуноглобулин крысы или иммуноглобулин мыши. В некоторых вариантах осуществления биологически функциональный белок может представлять собой химерное антитело и содержать два или более доменов иммуноглобулина, в которых по меньшей мере один домен происходит из первого иммуноглобулина млекопитающего, например, иммуноглобулина человека, и по меньшей мере второй домен происходит из второго иммуноглобулина млекопитающих, например,

иммуноглобулин мыши или крысы. В некоторых вариантах осуществления биологически функциональный белок содержит по меньшей мере один константный домен иммуноглобулина из иммуноглобулина человека.

**[00139]** Специалисту в данной области техники будет понятно, что эти домены можно комбинировать различными способами, чтобы получить антитело, имеющее различные форматы, включая полиспецифические антитела различных форматов. Эти форматы основаны в целом на форматах антител, известных в данной области техники (см., например, обзор от Brinkmann & Kontermann, 2017, *MABS*, 9(2):182-212, and Müller & Kontermann, "*Bispecific Antibodies*" in Handbook of Therapeutic Antibodies, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. (2014)).

**[00140]** Антитела описанных в данном документе биологически функциональных белков могут иметь различную валентность. В определенных вариантах осуществления биологически функциональный белок содержит один антигенсвязывающий домен. В определенных вариантах осуществления биологически функциональный белок содержит два или более антигенсвязывающих доменов. В некоторых вариантах осуществления биологически функциональный белок содержит антитело с различной валентностью и специфичностью. В контексте данного документа термин «биспецифическое антитело» содержит два связывающих домена. В определенных вариантах осуществления каждый из двух связывающих доменов имеет уникальную специфичность связывания. В контексте данного документа термин «полиспецифическое антитело» содержит два или более связывающих домена. В определенных вариантах осуществления каждый из двух или более связывающих доменов имеет уникальную специфичность связывания. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из двух или более связывающих доменов обладают уникальной специфичностью связывания. Например, антитело может быть двухвалентным и биспецифическим или может быть двухвалентным и иметь одну специфичность. Альтернативно, антитело может быть трехвалентным и биспецифическим, то есть антитело содержит три связывающих домена. Антитело также может быть биспецифическим и четырехвалентным, то есть антитело содержит четыре связывающих домена. Возможны и другие валентности.

**[00141]** Когда антитело содержит два связывающих домена, которые связываются с одной и той же молекулой-мишенью, связывающие домены могут связываться с одним и тем же эпитопом на молекуле-мишени или они могут связываться с разными эпитопами на

молекуле-мишени. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит два связывающих домена, которые связываются с разными эпитопами на молекуле-мишени. Термин «бипаратопный» можно использовать для обозначения антитела, которое содержит два связывающих домена, которые связываются с разными эпитопами на одной и той же молекуле-мишени (антигене). Бипаратопное антитело может связываться с одной молекулой антигена через два разных эпитопа или может связываться с двумя отдельными молекулами антигена, с каждой посредством отличающегося эпитопа.

**[00142]** В определенных вариантах осуществления антитело является бипаратопическим и биспецифическим в том смысле, что оно содержит первый связывающий домен и второй связывающий домен, каждый из которых связывается с разным эпитопом на первой молекуле-мишени, и третий связывающий домен, который связывается со второй молекулой-мишенью. Альтернативно, биспецифическое бипаратопическое антитело может содержать первый связывающий домен и второй связывающий домен, каждый из которых связывается с разным эпитопом на первой молекуле-мишени, и третий связывающий домен и четвертый связывающий домен, каждый из которых связывается с разным эпитопом на второй молекуле-мишени.

**[00143]** В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит каркас, и связывающие домены функционально связаны с каркасом. «Функционально связанные», как используется в данном документе, означает, что описанные компоненты находятся во взаимосвязи, позволяющих каждому из них функционировать предусмотренным образом.Связывающие домены могут быть прямо или косвенно связаны с каркасом. Под непрямой связью подразумевается, что данный связывающий домен связан с каркасом через другой компонент, например, линкер или один из других связывающих доменов. Различные форматы слитых белков, которые содержат каркас, более подробно описаны ниже.

**Форматы антигенсвязывающего домена**

**[00144]** В некоторых вариантах осуществления слитые белки, описанные в данном документе, включают антитело, имеющее по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, который представляет собой фрагмент антитела, такой как Fab, Fab', одноцепочечный Fab (scFab), одноцепочечный Fv (scFv) или однодоменное антитело (sdAb).

**[00145]** «Fab» или «фрагмент Fab» содержит константный домен (CL) легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи вместе с вариабельными доменами VL и VH на легкой и тяжелой цепях, соответственно, которые содержат CDR. Фрагмент Fab' или Fab' отличается от фрагмента Fab добавлением нескольких аминокислотных остатков на C-конце домена CH1 тяжелой цепи, включая один или более остатков цистеина из шарнирной области.

**[00146]** Фрагмент Fab может содержать две отдельные полипептидные цепи (легкую цепь и тяжелую цепь) или может представлять собой одноцепочечный Fab. Одноцепочечный Fab представляет собой молекулу Fab, в которой Fab легкой цепи и Fab тяжелой цепи соединены пептидным линкером с образованием одной пептидной цепи. Как правило, C-конец легкой цепи Fab соединен с N-концом тяжелой цепи Fab в одноцепочечной молекуле Fab, однако возможны и другие форматы.

**[00147]** Обозначение «ScFv» включает вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) антитела в единой полипептидной цепи. scFv может необязательно содержать полипептидный линкер между доменами VH и VL, который может способствовать формированию scFv желаемой структуры для связывания антигена. scFv может включать VL, соединенную от его C-конца к N-концу VH с помощью линкера, т.е. VL-линкер-VH, или, альтернативно, scFv может содержать VH, соединенную своим C-концом с N-концом VL линкером, т.е. VH-линкер-VL. В качестве обзора scFv см. Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,* vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269–315 (1994).

**[00148]** Термин «sdAb» относится к единичному домену иммуноглобулина. sdAb может быть, например, верблюжьего происхождения. У верблюжьих антител отсутствуют легкие цепи и их антигенсвязывающие сайты состоят из одного домена, называемого VHH. sdAb содержит три CDR/гипервариабельные петли, которые образуют антигенсвязывающий сайт: CDR1, CDR2 и CDR3. sdAb являются достаточно стабильными и легкими для экспрессии, например, как гибрид с Fc-цепью антитела (см., например, Harmsen & De Haard, 2007, *Appl. Microbiol Biotechnol.* 77(1):13-22).

**[00149]** В некоторых вариантах осуществления один или более связывающих доменов, содержащихся в антителе, могут быть природным или сконструированным лигандом для рецептора-мишени или функциональным фрагментом такого лиганда, т.е. фрагментом,

способным специфически связываться с рецептором-мишенью.

**[00150]** Антигенсвязывающие домены могут быть в виде комбинаций отдельных scFv, Fab, sdAb. Например, когда связывающие домены находятся в форме scFv, могут быть сконструированы такие форматы, как тандемный scFv ($(scFv)_2$ или taFv) или тройное тело (3 scFv), в которых scFv соединены друг с другом гибким линкером. scFv также можно использовать для конструирования форматов диатела, триатела и тетратела (тандемные диатела или TandAb), которые содержат 2, 3 и 4 scFv, соответственно, соединенных коротким линкером. Ограниченная длина линкера (как правило, длиной около 5 аминокислот) приводит к димеризации scFv по типу «голова к хвосту». В любом из предшествующих форматов scFv можно дополнительно стабилизировать включением междоменной дисульфидной связи. Например, дисульфидную связь можно вводить между VL и VH, посредством введения дополнительного цистеинового остатка в каждую цепь (например, в положение 44 в VH и 100 в VL) (см., например, Fitzgerald *et al.,* 1997, *Protein Engineering*, 10:1221-1225), или дисульфидную связь можно вводить между двумя VH для получения антигенсвязывающего домена, имеющего формат DART, (см., например, Johnson *et al.,* 2010, *J Mol. Biol.*, 399:436-449).

**[00151]** Аналогичным образом, для биологически функционального белка можно использовать форматы, содержащие два или более sdAb, такие как VH или VHH, соединенные друг с другом посредством подходящего линкера. Другие примеры форматов антител, в которых отсутствует каркас, включают форматы, основанные на фрагментах Fab, например, форматы $Fab_2$, $F(ab')_2$ и $F(ab')_3$, в которых фрагменты Fab соединены через линкер или шарнирную область IgG.

**[00152]** Комбинации антигенсвязывающих доменов в различных формах также можно использовать для создания альтернативных форматов. Например, scFv или sdAb могут быть слиты с С-концом любой или обеих легкой и тяжелой цепи из фрагмента Fab, что приводит к образованию двухвалентного (Fab-scFv) или (Fab-sdAb) или трехвалентного (Fab-$(scFv)_2$ или Fab-$(sdAb)_2$). Точно так же один или два scFv или sdAb могут быть слиты в шарнирной области фрагмента F(ab') с образованием трех- или четырехвалентного $F(ab')_2$-scFv/sdAb. Связывающие домены могут быть в одной форме или комбинации форм, описанных выше (например, scFv, Fab и/или sdAb, или связывающие домены на основе лиганда).

**[00153]** В некоторых конкретных вариантах осуществления биологически

функциональный белок содержит биспецифическое антитело, которое связывает антиген иммунных клеток, например, CD3, и опухоль-ассоциированных антиген (TAA), например, HER2. В определенных более конкретных вариантах осуществления биологически функциональный белок содержит биспецифическое антитело в формате Fab-scFv, где Fab связывает антиген иммунной клетки, а scFv связывает TAA. В определенных более конкретных вариантах осуществления биологически функциональный белок содержит биспецифическое антитело в формате Fab-scFv, где Fab связывает CD3, а scFv связывает HER2. В определенных вариантах осуществления биологически функциональный белок содержит биспецифическое антитело в формате Fab-Fab, где один Fab связывает CD3, а другой Fab связывает HER2.

**[00154]** В определенных вариантах осуществления биологически функциональный белок содержит два или более антигенсвязывающих доменов, функционально связанных с гетеродимерной Fc. В этом контексте биологически функциональный белок может быть двухвалентным, трехвалентным или четырехвалентным. Неограничивающие примеры форматов описаны ниже. Другие конфигурации известны в данной области техники (см., например, Spiess *et al.,* 2015, *Mol Immunol.,* 67:95-106).

**[00155]** Примеры конфигураций биологически функционального белка, содержащего два связывающих домена, функционально связанных с гетеродимерной Fc, то есть двухвалентным антителом, включают, но не ограничиваются ими: a) формат мкАт, в котором первый связывающий домен представляет собой Fab, функционально связанный с N-концом первого полипептида Fc гетеродимерной Fc, а второй связывающий домен представляет собой Fab, который функционально связан с N-концом второго полипептида Fc; b) гибридный формат, в котором первый связывающий домен представляет собой scFv, который функционально связан с N-концом одного полипептида Fc гетеродимерной Fc, а второй связывающий домен представляет собой Fab, который функционально связан с N-концом другого полипептида Fc и c) двойной формат scFv, в котором первый связывающий домен представляет собой scFv, который функционально связан с N-концом первого полипептида Fc гетеродимерной Fc, а второй связывающий домен представляет собой scFv, который функционально связан с N-концом второго полипептида Fc.

**[00156]** Другие примеры включают антитела, содержащие один связывающий домен (либо первый, либо второй) в виде Fab или scFv, функционально связанного с N-концом первого полипептида Fc, и другой связывающий домен в виде Fab или scFv, функционально

связанный с С-концом второго полипептида Fc.

**[00157]** Примеры конфигураций полиспецифического антитела, содержащего три связывающих домена, функционально связанных с гетеродимерной Fc (т.е. трехвалентным антителом), включают, но не ограничиваются ими:

**[00158]** A) формат мкАт-Fv, в котором первый связывающий домен представляет собой Fab, функционально связанный с N-концом первого полипептида Fc гетеродимерной Fc, а второй связывающий домен представляет собой Fab, функционально связанный с N-концом второго полипептида Fc, при этом третий связывающий домен состоит из домена VH, присоединенного к С-концу одного полипептида Fc, и домена VL, присоединенного к С-концу другого полипептида Fc;

**[00159]** B) формат мкАт-scFv, в котором первый связывающий домен представляет собой Fab, функционально связанный с N-концом первого полипептида Fc гетеродимерной Fc, второй связывающий домен представляет собой Fab, функционально связанный с N-концом второго полипептида Fc, а третий связывающий домен представляет собой scFv, функционально связанный с С-концом либо первого, либо второго полипептида Fc;

**[00160]** C) формат scFv-мкАт, в котором первый связывающий домен представляет собой Fab, функционально связанный с N-концом первого полипептида Fc гетеродимерной Fc, второй связывающий домен представляет собой Fab, функционально связанный с N-концом второго полипептида Fc, и третий связывающий домен представляет собой scFv, функционально связанный с N-концом либо первого, либо второго связывающего домена;

**[00161]** D) формат центральный scFv, в котором первый связывающий домен представляет собой scFv, который функционально связан с N-концом одного полипептида Fc гетеродимерной Fc, второй связывающий домен представляет собой Fab, который функционально связан с N-концом другого полипептида Fc, а третий связывающий домен представляет собой Fab, функционально связанный с первым связывающим доменом (scFv);

**[00162]** E) формат Fab-гибрид, в котором первый связывающий домен представляет собой scFv, функционально связанный с N-концом одного полипептида Fc гетеродимерной Fc, второй связывающий домен представляет собой Fab, функционально связанный с N-

концом другого полипептида Fc, и третий связывающий домен представляет собой Fab, который функционально связан с N-концом первого или второго связывающего домена;

**[00163]** F) формат scFv-гибрид, в котором первый связывающий домен представляет собой scFv, функционально связанный с N-концом одного полипептида Fc гетеродимерной Fc, второй связывающий домен представляет собой Fab, функционально связанный с N-концом другого полипептида Fc, и третий связывающий домен представляет собой scFv, который функционально связан с N-концом первого или второго связывающего домена;

**[00164]** G) формат scFv-гибрид, в котором первый связывающий домен представляет собой scFv, функционально связанный с N-концом одного полипептида Fc гетеродимерной Fc, второй связывающий домен представляет собой Fab, функционально связанный с N-концом другого полипептида Fc, и третий связывающий домен представляет собой scFv, который функционально связан с N-концом первого или второго связывающего домена;

**[00165]** H) формат гибрид-Fab, в котором первый связывающий домен представляет собой scFv, который функционально связан с N-концом одного полипептида Fc гетеродимерной Fc, второй связывающий домен представляет собой Fab, который функционально связан с N-концом другого полипептида Fc, а третий связывающий домен представляет собой Fab, который функционально связан с C-концом либо первого, либо второго полипептида Fc; и

**[00166]** I) формат Fab-мкАт, в котором первый связывающий домен представляет собой Fab, который функционально связан с N-концом первого полипептида Fc гетеродимерной Fc, второй связывающий домен представляет собой Fab, который функционально связан с N-концом второго полипептида Fc и третий связывающий домен представляет собой Fab, функционально связанный с N-концом либо первого, либо второго связывающего домена.

**[00167]** Иллюстративные конфигурации полиспецифического антитела, содержащего четыре связывающих домена, функционально связанных с гетеродимерной Fc, т.е. четырехвалентным антителом, включают, но не ограничиваются ими: i) формат центральный-scFv2, в котором первый связывающий домен представляет собой scFv, который функционально связан с N-концом одного полипептида Fc гетеродимерной Fc, второй связывающий домен представляет собой scFv, который функционально связан с N-концом другого полипептида Fc, третий связывающий домен представляет собой Fab,

который функционально связан с одним из scFv, и четвертый связывающий домен представляет собой Fab, который функционально связан с другим scFv, и ii) формат двойного вариабельного домена, в котором первый связывающий домен представляет собой Fab, который функционально связан с N-концом одного полипептида Fc гетеродимерной Fc, второй связывающий домен представляет собой Fab, который функционально связан с N-концом другого полипептида Fc, третий связывающий домен представляет собой scFv, который функционально связан с одним из Fab, а четвертый связывающий домен представляет собой scFv, который функционально связан с другим Fab.

**[00168]** Антитела к биологически функциональным белкам, описанным в данном документе, могут содержать метку, лекарственное средство или их комбинации. Можно использовать любую известную в данной области техники метку, подходящую для обнаружения описанных в данном документе слитых белков. Конъюгаты антитело-лекарственное средство более подробно описаны ниже.

**[00169]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие домены антител биологически функционального белка, описанного в данном документе, связываются с одним и тем же антигеном в одной и той же клетке. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие домены связываются с более чем одним антигеном в одной и той же клетке. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие домены связываются с более чем одним антигеном, при этом по меньшей мере один антиген находится на отличной от другого антигена клетке. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен(-ы) антитела связывается с опухолевой клеткой или иммунной клеткой. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие домены антитела связываются с опухолевой клеткой и иммунной клеткой.

***Химерные, гуманизированные и вариантные антитела***

**[00170]** В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть получены из иммуноглобулинов разных видов, например, антитело может быть химерным антителом или гуманизированным антителом. «Химерное антитело» относится к антителу, которое обычно содержит по меньшей мере один вариабельный домен из антитела грызуна (обычно мышиного антитела) и по меньшей мере один константный домен из человеческого антитела. «Гуманизированное антитело» представляет собой тип химерного антитела,

которое содержит минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого антитела.

**[00171]** Человеческий константный домен химерного антитела необязательно должен быть того же изотипа, что и нечеловеческий константный домен, который он заменяет. Химерные антитела обсуждаются, например, в публикации Morrison *et al*., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-55, и патенте США № 4816567. Как правило, гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены остатками из гипервариабельной области не относящегося к человеку вида (донорное антитело), такого как мышь, крыса, кролик или примат, не являющийся человеком, имеющий желаемую специфичность и аффинность к антигену-мишени. Этот метод создания гуманизированных антител часто называют «трансплантация CDR». «Химерное антитело» и «гуманизированное антитело» в целом относятся к антителам, которые объединяют области или домены иммуноглобулина более чем одного вида.

**[00172]** В некоторых случаях вносятся дополнительные модификации для дополнительного улучшения характеристик антител. Например, остатки каркасной области (FR) человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими нечеловеческими остатками, или гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном, ни в донорном антителе. Как правило, вариабельный домен в гуманизированном антителе будет включать все или по существу все гипервариабельные области нечеловеческого иммуноглобулина и все или по существу все FR из последовательности человеческого иммуноглобулина. Более подробно гуманизированные антитела описаны, например, в Jones, *et al*., 1986, *Nature,* 321:522-525; Riechmann, *et al*., 1988, *Nature,* 332:323-329 и Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.,* 2:593-596.

**[00173]** В данной области техники известен ряд подходов к выбору наиболее подходящих человеческих каркасов для трансплантации нечеловеческих CDR. В более ранних подходах использовалось ограниченное подмножество хорошо изученных человеческих антител, независимо от идентичности последовательности с нечеловеческим антителом, обеспечивающим CDR (подход «фиксированных каркасов»). В более поздних подходах использовали вариабельные области с высокой идентичностью аминокислотной последовательности с вариабельными областями нечеловеческого антитела,

обеспечивающего CDR (подход «гомологического соответствия» или «наилучшего соответствия»). Альтернативный подход заключается в выборе фрагментов каркасных последовательностей в пределах каждой вариабельной области легкой или тяжелой цепи из нескольких различных антител человека. Трансплантация CDR может в некоторых случаях привести к частичной или полной потере аффинности трансплантированной молекулы к антигену-мишени. В таких случаях аффинность может быть восстановлена путем обратной мутации некоторых остатков человеческого происхождения в соответствующие нечеловеческие. Способы получения гуманизированных антител с помощью этих подходов хорошо известны в данной области техники (см., например, Tsurushita & Vasquez, 2004, *Humanization of Monoclonal Antibodies*, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA); Jones *et al.*, 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature*, 332:323-329; Presta *et al.,* 1997, *Cancer Res,* 57(20):4593-4599).

**[00174]** В качестве альтернативы или в дополнение к этим традиционным подходам можно использовать более современные технологии для дальнейшего снижения иммуногенности гуманизированного антитела с трансплантированным CDR. Например, каркасы, основанные на последовательностях зародышевой линии человека или консенсусных последовательностях, могут быть использованы в качестве акцепторных каркасов человека, а не каркасов человека с соматической мутацией(-ями). Другой метод, направленный на снижение потенциальной иммуногенности нечеловеческих CDR, заключается в трансплантации только определяющих специфичность остатков (SDR). В этом подходе только минимальное количество остатков CDR, необходимых для антигенсвязывающей активности («SDR»), трансплантируют в каркас зародышевой линии человека. Этот метод улучшает «человечность» (то есть сходство с последовательностью зародышевой линии человека) гуманизированного антитела и, таким образом, помогает снизить риск иммуногенности вариабельной области. Эти методы описаны в различных публикациях (см., например, Almagro & Fransson, 2008, *Front Biosci,* 13:1619-1633; Tan, *et al.*, 2002, *J Immunol,* 169:1119-1125; Hwang, *et al.*, 2005, *Methods,* 36:35-42; Pelat, *et al.*, 2008, *J Mol Biol,* 384:1400-1407; Tamura, *et al.*, 2000, *J Immunol*, 164:1432-1441; Gonzales, *et al.*, 2004, *Mol Immunol,* 1:863-872, и Kashmiri, *et al.*, 2005, *Methods*, 36:25-34).

**[00175]** В определенных вариантах осуществления антитело содержит гуманизированные последовательности антител, например, один или более гуманизированных вариабельных доменов. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело.

**[00176]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, содержащийся в слитом белке, представляет собой замещенный вариант известного антитела, который содержит одну или более аминокислотных замен в CDR исходного антитела. В некоторых вариантах осуществления вариант замены имеет модификации (например, улучшения) определенных биологических свойств по сравнению с исходным антителом. Например, вариант замены может иметь повышенную аффинность к белку-мишени или может иметь пониженную иммуногенность. В некоторых вариантах осуществления вариант замены по существу сохраняет определенные биологические свойства исходного антитела.

**[00177]** Горячие точки CDR представляют собой остатки, кодируемые кодонами, которые подвергаются мутациям с высокой частотой в процессе соматического созревания (см., например, Chowdhury, 2008, *Methods Mol. Biol.*, 207:179-196). Было описано созревание аффинности путем конструирования и повторного выбора из вторичных библиотек (см., например, Hoogenboom *et al.* in *Methods in Molecular Biology*, 178:1-37, O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, N.J. (2001)).

**[00178]** Способы созревания аффинности хорошо известны в данной области техники. Например, разнообразие может быть введено в вариабельные гены, выбранные для созревания, с помощью различных методов, включая, например, ПЦР сниженной точности, перетасовку цепей или олигонуклеотид-направленный мутагенез. Затем создается вторичная библиотека, и эта библиотека подвергается скринингу для выявления любых вариантов антител с желаемой аффинностью. Другой способ для внесения разнообразия включает подходы, направленные на CDR, в которых несколько остатков CDR (например, 2, 3, 4 или более остатков одновременно) рандомизируют. CDR3 одной или обеих тяжелой или легкой цепи часто является мишенью для подходов, направленных на CDR. Остатки CDR, участвующие в связывании антигена, могут быть идентифицированы, например, с использованием аланин-сканирующего мутагенеза (см., например, Cunningham and Wells, 1989, *Science*, 244:1081-1085) или путем компьютерного моделирования с использованием кристаллической структуры комплекса антиген-антитело для определения точек контакта между антителом и антигеном.

**[00179]** В некоторых вариантах осуществления вариант замены включает одну или более замен в одной или более CDR при условии, что замены существенно не снижают

способность связывающего домена связывать свой антиген-мишень. Например, вариант замены может содержать одну или более консервативных замен, как описано в данном документе, в одной или более CDR, которые существенно не снижают аффинность связывания. В некоторых вариантах осуществления вариант замены включает одну или более аминокислотных замен в CDR, которые не затрагивают аминокислоты, контактирующие с антигеном. В некоторых вариантах осуществления вариант замены включает вариант последовательности VH или VL, в которой каждая CDR либо не изменена, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

***Варианты гликозилирования***

**[00180]** В некоторых вариантах осуществления слитые белки, описанные в данном документе, содержат биологически функциональный белок на основе Fc IgG, в котором было модифицировано нативное гликозилирование. Как известно в данной области техники, гликозилирование Fc можно модифицировать для увеличения или уменьшения эффекторной функции.

**[00181]** Например, мутация консервативного остатка аспарагина в положении 297 на аланин, глутамин, лизин или гистидин (т.е. N297A, Q, K или H) приводит к агликозилированному Fc, у которого отсутствуют все эффекторные функции (Bolt *et al.*, 1993, *Eur. J. Immunol.,* 23:403-411; Tao & Morrison, 1989, *J. Immunol.,* 143:2595-2601).

**[00182]** И наоборот, было показано, что удаление фукозы из олигосахаридов, связанных с N297 тяжелой цепи, усиливает ADCC, основываясь на улучшенном связывании с FcγRIIIa (см., например, Shields *et al.*, 2002, *J Biol Chem.,* 277:26733-26740, and Niwa *et al.,* 2005, *J. Immunol. Methods,* 306:151-160). Такие антитела с низким содержанием фукозы могут быть получены, например, в клетках яичника китайского хомячка (CHO) с нокаутом, в которых отсутствует фукозилтрансфераза (FUT8) (Yamane-Ohnuki *et al.*, 2004, *Biotechnol. Bioeng.*, 87:614-622), в вариантной линии клеток CHO, Lec 13, которая обладает пониженной способностью присоединять фукозу к N297-связанным углеводам (международная публикация № WO 03/035835), или в других клетках, которые продуцируют афукозилированные антитела (см., например, Li *et al.*, 2006, *Nat Biotechnol*, 24:210-215; Shields *et al.,* 2002, *ibid*, и Shinkawa *et al.*, 2003, *J. Biol. Chem.*, 278:3466-3473). Кроме того, в международной публикации № WO 2009/135181 описано добавление аналогов фукозы в культуральную среду во время продукции антитела для ингибирования включения фукозы в углевод на антитела.

**[00183]** Другие способы получения антител с небольшим количеством фукозы или без нее в сайте гликозилирования Fc (N297) хорошо известны в данной области техники. Например, технология GlymaX® (ProBioGen AG) (см. von Horsten *et al.*, 2010, *Glycobiology*, 20(12):1607-1618 и патент США № 8409572).

**[00184]** Другие варианты гликозилирования включают варианты с разделенными пополам олигосахаридами, например, варианты, в которых биантеннальный олигосахарид, присоединенный к области Fc антитела, разделен пополам N-ацетилглюкозамином (GlcNAc). Такие варианты гликозилирования могут иметь пониженное фукозилирование и/или улучшенную функцию ADCC. См., например, международную публикацию № WO 2003/011878, патент США № 6602684 и публикацию заявки на патент США № US 2005/0123546. Полезные варианты гликозилирования также включают варианты, имеющие по меньшей мере один остаток галактозы в олигосахариде, присоединенном к области Fc, которые могут иметь улучшенную функцию CDC (см., например, международные публикации № WO 1997/030087, WO 1998/58964 и WO 1999/22764).

***Полипептидные каркасы***

**[00185]** В определенных вариантах осуществления биологически функциональный белок из слитых белков, описанных в данном документе, представляет собой полипептидный каркас, который может функционировать, например, для стабилизации или продления периода полужизни *in vivo* пары лиганд-рецептор.

**[00186]** В определенных вариантах осуществления биологически функциональный белок состоит из димерной области Fc. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептид биологически функционального белка состоят из димерной Fc, где первый полипептид состоит из первого полипептида Fc, а второй полипептид состоит из второго полипептида Fc, причем первый и второй полипептиды Fc образуют димерную область Fc. В определенных вариантах осуществления димерная область Fc представляет собой гетеродимерную Fc. Гетеродимерные области Fc описаны в данном документе более подробно.

В определенных вариантах осуществления полипептидные каркасы состоят из первого и второго полипептидов. В некоторых вариантах осуществления лиганд пары лиганд-рецептор слит через пептидный линкер с первым полипептидом, а рецептор слит через пептидный линкер с тем же соответствующим концом второго полипептида. Таким

образом, в определенных вариантах осуществления лиганд слит с N-концом первого полипептида через пептидный линкер, а рецептор слит с N-концом второго полипептида через второй пептидный линкер. Наоборот, в определенных вариантах осуществления лиганд слит с С-концом первого полипептида через пептидный линкер, а рецептор слит со вторым полипептидом через второй пептидный линкер.

**[00187]** В определенных более конкретных вариантах осуществления биологически функциональный белок содержит полипептидный каркас, состоящий из димерной области Fc и пары лиганд-рецептор, которая представляет собой PDL-1 и PD-1. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит биологически функциональный белок, состоящий из димерной области Fc и пары лиганд-рецептор, которая представляет собой CD80 и CTLA4. В определенных вариантах осуществления домен Fc полипептидного каркаса содержит аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 4 и 5, и необязательно SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления полипептидный каркас состоит из гетеродимерной Fc, содержащей SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5; где первый полипептид Fc содержит SEQ ID NO: 4, а второй полипептид Fc содержит SEQ ID NO: 5. В определенных вариантах осуществления полипептидный каркас, состоящий из гетеродимерной Fc, содержит модифицированный домен CH3 и/или CH2 из таблицы 2 и таблицы 3, соответственно.

***Домены Fc***

**[00188]** В определенных вариантах осуществления слитые белки, описанные в данном документе, включают биологически функциональные белки, например, антитела или полипептидные каркасы, содержащие димерную область Fc иммуноглобулина. Термин «область Fc» включает области Fc с нативной последовательностью и варианты областей Fc. Если не указано иное, нумерация аминокислотных остатков области Fc или константной области соответствует системе нумерации EU, также называемой индексом EU, как описано в Kabat *et al.,* Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). «Полипептид Fc» димерной Fc относится к одному из двух полипептидов, образующих димерную область Fc, то есть к полипептиду, содержащему С-концевые константные области тяжелой цепи иммуноглобулина, которые способны к стабильной самоассоциации.

**[00189]** Область Fc может содержать либо домен CH3, либо домен CH3 и домен CH2. Домен CH3 содержит две последовательности CH3, каждая из которых состоит из одного

из двух полипептидов Fc димерной Fc. Точно так же домен CH2 содержит две последовательности CH2, каждая из которых состоит из одного из двух полипептидов Fc димерной Fc.

**[00190]** В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит Fc, основанный на Fc IgG человека. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит Fc на основе Fc IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит Fc, основанный на гетеродимерной Fc, содержащей два разных полипептида Fc.

**[00191]** В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит Fc на основе модифицированного Fc IgG, в котором домен CH3 содержит одну или более аминокислотных модификаций. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит Fc на основе модифицированного Fc IgG, в котором домен CH2 содержит одну или более аминокислотных модификаций. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит Fc на основе модифицированного Fc IgG, в котором домен CH3 содержит одну или более аминокислотных модификаций, а домен CH2 содержит одну или более аминокислотных модификаций.

***Модифицированные домены Fc CH3***

**[00192]** В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит гетеродимерную Fc иммуноглобулина, содержащую модифицированный домен CH3, где модифицированный домен CH3 содержит одну или более асимметричных аминокислотных модификаций. В контексте данного документа термин «ассимметричная аминокислотная модификация» относится к модификации, при которой аминокислота в определенном положении в первом полипептиде Fc отличается от аминокислоты в соответствующем положении во втором полипептиде Fc. Эти ассимметричные аминокислотные модификации могут включать модификацию только одной из двух аминокислот в соответствующем положении на каждом полипептиде Fc или они могут включать модификации обеих аминокислот в соответствующих положениях на каждом из первого и второго полипептидов Fc.

**[00193]** В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит гетеродимерную Fc, содержащую модифицированный домен CH3, где модифицированный домен CH3 содержит одну или более ассимметричных аминокислотных модификаций,

которые способствуют образованию гетеродимерной Fc по сравнению с образованием гомодимерной Fc. Аминокислотные модификации, которые могут быть внесены в домен CH3 Fc для стимуляции образования гетеродимерной Fc, известны в данной области техники и включают, например, модификации, описанные в международной публикации № WO 96/027011 («выступы-во-впадины»), Gunasekaran *et al.*, 2010, *J Biol Chem*, 285, 19637-46 («электростатическое взаимодействие»), Davis *et al.*, 2010, *Prot Eng Des Sel*, 23(4):195-202 (технология замены цепи для сконструированного домена (SEED)) и Labrijn *et al.*, 2013, *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(13):5145-50 (обмен плечами Fab). Другие примеры включают подходы, сочетающие позитивные и негативные стратегии дизайна для получения стабильных асимметрично модифицированных областей Fc, как описано в международных публикациях №№ WO 2012/058768 и WO 2013/063702.

**[00194]** В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит гетеродимерную Fc, имеющий модифицированный домен CH3, как описано в международной публикации № WO 2012/058768 или международной публикации патента № WO 2013/063702.

**[00195]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит гетеродимерную Fc IgG1 человека, имеющую модифицированный домен CH3. В таблице 2 ниже предложена аминокислотная последовательность из последовательности Fc IgG1 человека, соответствующая аминокислотам от 231 до 447 полноразмерной тяжелой цепи IgG1 человека. Домен CH2 обычно определяют как содержащий аминокислоты 231-340 тяжелой цепи полноразмерного IgG1 человека, а домен CH3 обычно определяют как содержащий аминокислоты 341-447 тяжелой цепи полноразмерного IgG1 человека.

**[00196]** В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит гетеродимерную Fc, имеющую модифицированный домен CH3, содержащий одну или более асимметричных аминокислотных модификаций, которые способствуют образованию гетеродимерной Fc по сравнению с образованием гомодимерной Fc, в которой модифицированный домен CH3 содержит первый полипептид Fc, включающий аминокислотные модификации в положениях F405 и Y407 и второй полипептид Fc, включающий аминокислотные модификации в положениях T366 и T394. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная модификация в положении F405 первого полипептида Fc модифицированного домена CH3 представляет собой F405A, F405I, F405M, F405S, F405T или F405V. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная

модификация в положении Y407 первого полипептида Fc модифицированного домена CH3 представляет собой Y407I или Y407V. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная модификация в положении T366 второго полипептида Fc модифицированного домена CH3 представляет собой T366I, T366L или T366M. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная модификация в положении T394 второго полипептида Fc модифицированного домена CH3 представляет собой T394W. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc модифицированного домена CH3 дополнительно включает аминокислотную модификацию в положении L351. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная модификация в положении L351 в первом полипептиде Fc модифицированного домена CH3 представляет собой L351Y. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc модифицированного домена CH3 дополнительно включает аминокислотную модификацию в положении K392. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная модификация в положении K392 во втором полипептиде Fc модифицированного домена CH3 представляет собой K392F, K392L или K392M. В некоторых вариантах осуществления один или оба из первого и второго полипептидов Fc модифицированного домена CH3 дополнительно содержат аминокислотную модификацию T350V.

**[00197]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит гетеродимерную Fc, имеющую модифицированный домен CH3, содержащий одну или более асимметричных аминокислотных модификаций, которые способствуют образованию гетеродимерной Fc по сравнению с образованием гомодимерной Fc, в котором модифицированный домен CH3 содержит первый полипептид Fc, содержащий аминокислотную модификацию F405A, F405I, F405M, F405S, F405T или F405V вместе с аминокислотной модификацией Y407I или Y407V, и второй полипептид Fc, содержащий аминокислотную модификацию T366I, T366L или T366M, вместе с аминокислотной модификацией T394W. В некоторых вариантах осуществления первый полипептид Fc модифицированного домена CH3 дополнительно содержит аминокислотную модификацию L351Y. В некоторых вариантах осуществления второй полипептид Fc модифицированного домена CH3 дополнительно содержит аминокислотную модификацию K392F, K392L или K392M. В некоторых вариантах осуществления один или оба из первого и второго полипептидов Fc модифицированного домена CH3 дополнительно содержат аминокислотную модификацию T350V.

**[00198]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит гетеродимерную Fc, содержащую модифицированный домен CH3, содержащий первый полипептид Fc,

который содержит аминокислотные модификации в положениях F405 и Y407 и необязательно дополнительно содержит аминокислотную модификацию в положении L351, и второй полипептид Fc, который содержит аминокислотные модификации в положениях T366 и T394 и необязательно дополнительно содержит аминокислотную модификацию в положении K392, как описано выше, и первый полипептид Fc дополнительно содержит аминокислотную модификацию в одном или обоих положениях S400 или Q347 и/или второй полипептид Fc дополнительно содержит аминокислотную модификацию в одном или обоих положениях K360 или N390, где аминокислотная модификация в положении S400 представляет собой S400E, S400D, S400R или S400K; аминокислотная модификация в положении Q347 представляет собой Q347R, Q347E или Q347K; аминокислотная модификация в положении K360 представляет собой K360D или K360E, а аминокислотная модификация в положении N390 представляет собой N390R, N390K или N390D.

**[00199]** В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит гетеродимерную Fc, содержащую модифицированный домен CH3, содержащий модификации любого из вариантов 1, 2, 3, 4 или 5, как показано в таблице 2. В определенных вариантах осуществления CH3 имеет аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. В определенных вариантах осуществления CH3 имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. В определенных вариантах осуществления домен CH3 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

**Таблица 2. Последовательности и варианты Fc IgG1 человека**

| **Последовательность Fc IgG1 человека 231–447 (EU-нумерация)** | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 29) | |
|---|---|---|
| **Вариант, №** | **Цепь** | **Мутации** |
| **1** | A | L351Y_F405A_Y407V |
| | B | T366L_K392M_T394W |

| | | |
|---|---|---|
| **2** | A | L351Y_F405A_Y407V |
| | B | T366L_K392L_T394W |
| **3** | A | T350V_L351Y_F405A_Y407V |
| | B | T350V_T366L_K392L_T394W |
| **4** | A | T350V_L351Y_F405A_Y407V |
| | B | T350V_T366L_K392M_T394W |
| **5** | A | T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V |
| | B | T350V_T366L_N390R_K392M_T394W |

***Модифицированные домены CH2 Fc***

**[00200]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит Fc на основе Fc IgG, имеющей модифицированный домен CH2. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит Fc на основе Fc IgG, имеющей модифицированный домен CH2, причем модификация домена CH2 приводит к изменению связывания с одним или более Fc-рецепторами (FcR), такими как рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII.

**[00201]** В данной области техники известен ряд аминокислотных модификаций домена CH2, которые избирательно изменяют аффинность Fc к различным Fcγ-рецепторам. Аминокислотные модификации, которые приводят к увеличению связывания, и аминокислотные модификации, которые приводят к снижению связывания, могут быть полезны при определенных показаниях. Например, увеличение аффинности связывания Fc с FcγRIIIa (активирующим рецептором) приводит к усилению антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), что, в свою очередь, приводит к усилению лизиса клетки-мишени. Уменьшение связывания с FcγRIIb (ингибирующим рецептором) также может быть полезным при некоторых обстоятельствах. При определенных показаниях может быть желательным уменьшение или устранение ADCC и комплемент-опосредованной цитотоксичности (CDC). В таких случаях могут быть полезны модифицированные домены CH2, содержащие аминокислотные модификации, которые приводят к увеличению связывания с FcγRIIb, или аминокислотные модификации, которые уменьшают или исключают связывание области Fc со всеми Fcγ-рецепторами («нокаутные» варианты).

**[00202]** Примеры аминокислотных модификаций домена CH2, которые изменяют связывание Fc Fcγ-рецепторами, включают, помимо прочего, следующие:) S298A/E333A/K334A и S298A/E333A/K334A/K326A (повышенная аффинность к FcγRIIIa)

(Lu, *et al.*, 2011, *J Immunol Methods*, 365(1-2):132-41); F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L (повышенная аффинность к FcγRIIIa) (Stavenhagen, *et al.*, 2007, *Cancer Res,* 67(18):8882-90); F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L (повышенная аффинность к FcγRIIIa) (Nordstrom JL, *et al.*, 2011, *Breast Cancer Res*, 13(6):R123); F243L (повышенная аффинность к FcγRIIIa) (Stewart, *et al.*, 2011, *Protein Eng Des Sel.*, 24(9):671-8); S298A/E333A/K334A (повышенная аффинность к FcγRIIIa) (Shields, *et al.*, 2001, *J Biol Chem,* 276(9):6591-604); S239D/I332E/A330L и S239D/I332E (повышенная аффинность к FcγRIIIa) (Lazar, *et al.*, 2006, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(11):4005-10), и S239D/S267E и S267E/L328F (повышенная аффинность к FcγRIIb) (Chu, *et al.*, 2008, *Mol Immunol,* 45(15):3926-33).

**[00203]** Дополнительные модификации, влияющие на связывание Fc с Fcγ-рецепторами, описаны в публикации *Therapeutic Antibody Engineering* (Strohl & Strohl, Woodhead Publishing series in Biomedicine No 11, ISBN 1 907568 37 9, Oct 2012, page 283).

**[00204]** В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит Fc, основанный на Fc IgG, имеющей модифицированный домен CH2, в котором модифицированный домен CH2 содержит одну или более аминокислотных модификаций, которые приводят к уменьшению или отсутствию связывания области Fc со всеми Fcγ-рецепторами (т. е. «нокаутный» вариант).

**[00205]** В различных публикациях описаны стратегии, которые использовались для конструирования антител для получения «нокаутных» вариантов (см., например, Strohl, 2009, *Curr Opin Biotech* 20:685-691, и Strohl & Strohl, "*Antibody Fc engineering for optimal antibody performance*" In Therapeutic Antibody Engineering, Cambridge: Woodhead Publishing, 2012, pp 225-249). Эти стратегии включают снижение эффекторной функции посредством модификации гликозилирования (более подробно описано ниже), использования каркасов IgG2/IgG4 или введения мутаций в шарнире или домене CH2 Fc (см. также публикацию патента США № 2011/0212087, международную публикацию № WO 2006/105338, публикацию патента США № 2012/0225058, публикацию патента США № 2012/0251531 и Strop *et al.*, 2012, *J. Mol. Biol.*, 420: 204-219).

**[00206]** Конкретные, не ограничивающие примеры известных аминокислотных модификаций для уменьшения связывания FcγR и/или комплемента с Fc включают модификации, указанные в таблице 3.

**Таблица 3: Модификации для уменьшения связывания Fcγ-рецептора или**

**комплемента с Fc**

| **Компания** | **Мутации** |
|---|---|
| GSK | N297A |
| Ortho Biotech | L234A/L235A |
| Protein Design labs | IgG2 V234A/G237A |
| Wellcome Labs | IgG4 L235A/G237A/E318A |
| GSK | IgG4 S228P/L236E |
| Merck | IgG2 H268Q/V309L/A330S/A331S |
| Bristol-Myers | C220S/C226S/C229S/P238S |
| Seattle Genetics | C226S/C229S/E3233P/L235V/L235A |
| Medimmune | L234F/L235E/P331S |

**[00207]** Дополнительные примеры включают области Fc, сконструированные таким образом, чтобы они включали аминокислотные модификации L235A/L236A/D265S. Кроме того, в международной публикации № WO 2014/190441 описаны асимметричные аминокислотные модификации в домене CH2, которые снижают связывание Fc со всеми Fcγ-рецепторами.

**[00208]** В определенных вариантах осуществления домен CH2 имеет аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления домен CH2 имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична SEQ ID NO: 6. В определенных вариантах осуществления домен CH2 имеет аминокислотную последовательность, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 6.

***Конъюгаты антитело - лекарственное средство***

**[00209]** Определенные варианты осуществления слитых белков, описанных в данном документе, включают биологически функциональные белки, которые представляют собой антитело, конъюгированное с лекарственным средством, то есть конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC). Лекарственным средством ADC может быть любая

терапевтическая молекула, например, токсин, химиотерапевтический агент, низкомолекулярный ингибитор. ADC может быть конъюгирован с лекарственным средством через линкер, который может быть расщепляемым линкером или нерасщепляемым линкером. Расщепляемый линкер может подвергаться расщеплению во внутриклеточных условиях, например, посредством лизосомальных процессов. Примеры расщепляемых линкеров включают линкеры, которые являются чувствительными к протеазе, чувствительными к кислоте, чувствительными к восстановлению или фотолабильными. Конъюгацию лекарственного средства можно осуществлять любым способом, известным в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, лизиновую или цистеиновую конъюгацию, бис-тиоловые линкеры, конъюгацию с использованием сайтов гликозилирования антител, конъюгацию под действием ультрафиолетового света и использование неприродных аминокислот.

**Пептидные линкеры, протеазы и сайты расщепления протеазами**

**[00210]** Описанные в данном документе слитые белки содержат по меньшей мере первый и второй пептидный линкер. Пептидный линкер представляет собой пептид, который соединяется или связывается с другими пептидами или полипептидами. В определенных вариантах осуществления пептидный линкер сливает полипептид биологически функционального белка, например, антитело или димерный каркас Fc, с лигандом и/или рецептором пары лиганд-рецептор.

**[00211]** В определенных вариантах осуществления, где биологически функциональный белок содержит область Fc, полипептид Fc слит с лигандом или рецептором пары лиганд-рецептор, или линкер может соединять полипептид Fc с лигандом или рецептором пары лиганд-рецептор. В определенных вариантах осуществления лиганд слит с концом первого полипептида через первый пептидный линкер; рецептор слит с тем же соответствующим концом второго полипептида посредством второго пептидного линкера. В определенных вариантах осуществления слитых белков, описанных в данном документе, рецептор и лиганд сливаются с соответствующими N-концами первого и второго полипептидов посредством пептидных линкеров. В определенных вариантах осуществления слитых белков, описанных в данном документе, рецептор и лиганд сливаются с соответствующими C-концами первого и второго полипептидов посредством пептидных линкеров.

**[00212]** Пептидный линкер имеет достаточную длину, чтобы сделать возможным спаривание лиганда и рецептора. В дополнение к выполнению функции спейсера

пептидный линкер может обеспечивать гибкость или жесткость, подходящие для правильной ориентации одного или более доменов слитых белков по настоящему изобретению, как внутри слитого белка, так и между слитыми белками и их мишенью(-ями). Кроме того, пептидный линкер может поддерживать экспрессию полноразмерного слитого белка и стабильность очищенного белка как in vitro, так и in vivo после введения нуждающемуся в этом субъекту, такому как человек, и предпочтительно является неиммуногенным или слабоиммуногенным у тех же субъектов. В определенных вариантах осуществления пептидный линкер может содержать часть или весь шарнир иммуноглобулина человека, стеблевую область лектинов С-типа, семейство мембранных белков II типа или их комбинации.

**[00213]** В определенных вариантах осуществления пептидный линкер имеет достаточную длину, чтобы сделать возможным связывание лиганда и рецептора, и содержит от около 2 до около 150 аминокислот. В определенных вариантах осуществления пептидные линкеры имеют длину от около 3 до около 50 аминокислот, или от около 5 до около 20 аминокислот, или от около 10 до около 50 аминокислот, или от около 2 до около 40 аминокислот, или от около 8 до около 20 аминокислот, от около 10 до около 60 аминокислот, от около 10 до около 30 аминокислот или от около 15 до около 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, или 60 аминокислот.

**[00214]** По меньшей мере один из пептидных линкеров слитых белков, описанных в данном документе, содержит сайт расщепления протеазой, также называемый последовательностями расщепления. В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит по меньшей мере один пептидный линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, и по меньшей мере один пептидный линкер, не содержащий сайт расщепления протеазой. При использовании сайты расщепления протеазами располагаются внутри пептидных линкеров таким образом, чтобы максимизировать распознавание и расщепление желаемой протеазой или протеазами и минимизировать распознавание и неспецифическое расщепление другими протеазами. Пептидный линкер может содержать один или более сайтов расщепления. В этом отношении слитый белок может быть расщеплен 1, 2, 3, 4, 5 или более протеазами. Кроме того, сайт или сайты расщепления протеазой могут быть расположены внутри пептидных линкеров (или, другими словами, могут быть окружены

линкерами) и расположены внутри слитого белка в целом таким образом, чтобы достичь наилучшего желаемого расщепления и высвобождения фрагментов слитого белка (например, лиганд пары рецептор-лиганд, рецептор пары лиганд-рецептор или как лиганд, так и рецептор) после расщепления. Фрагмент полипептида, который слит со слитым белком с помощью пептидного линкера и который высвобождается из слитого белка после расщепления пептидного линкера, может называться в данном документе расщепляемым фрагментом (СМ). В определенных вариантах осуществления, где слитый белок содержит более одного СМ, они могут быть слиты со слитым белком с помощью одних и тех же или разных пептидных линкеров, которые имеют один и тот же сайт расщепления или разные сайты расщепления.

**[00215]** Сайт расщепления протеазой или последовательность расщепления можно выбрать на основе протеазы, совместно локализованной в ткани, где желательна активность слитого белка или биологически функционального белка. Сайт расщепления может служить субстратом для нескольких протеаз, например, субстратом для сериновой протеазы и другой протеазы, например, матриксной металлопротеиназы (ММР). В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления может служить субстратом для более чем одной сериновой протеазы, например, матриптазы и активатора плазминогена урокиназного типа (uPA). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер может служить субстратом для более чем одной ММР, например, ММР9 и ММР14.

**[00216]** В определенных вариантах осуществления пептидный линкер специфически расщепляется протеазой со скоростью приблизительно 0,001-1500×$10^4$ $M^{-1}*c^{-1}$ или по меньшей мере 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250, или 1500 x $10^4$ $M^{-1}*c^{-1}$.

**[00217]** Для специфического расщепления ферментом устанавливается контакт между ферментом и пептидным линкером. В определенных вариантах осуществления, когда слитый белок содержит по меньшей мере первый пептидный линкер и имеет достаточную ферментативную активность, пептидный линкер расщепляется. Достаточная активность фермента может относиться к способности фермента вступать в контакт с пептидным линкером и осуществлять расщепление. Легко предположить, что фермент может находиться вблизи пептидного линкера, но неспособен к расщеплению из-за других клеточных факторов или белковой модификации фермента.

**[00218]** В определенных вариантах осуществления пептидный линкер содержит сайт расщепления протеазой длиной 5-10 аминокислот, или 7-10 аминокислот, или 8-10 аминокислот. В еще одном варианте осуществления пептидный линкер состоит из сайта расщепления протеазой длиной 5-10 аминокислот, или 7-10 аминокислот, или 8-10 аминокислот. В одном варианте осуществления сайту расщепления протеазой предшествует на N-конце линкерная последовательность длиной около 1-20 аминокислот, 2-5 аминокислот, 5-10 аминокислот, 10-15 аминокислот, 10-20 аминокислот, 12-16 аминокислот, или около 5, или около 10 аминокислот. В еще одном варианте осуществления за сайтом расщепления протеазой следует на С-конце линкерная последовательность длиной около 1-20 аминокислот, 2-5 аминокислот, 5-10 аминокислот, 10-15 аминокислот, 10-20 аминокислот, 12-16 аминокислот, или, в некоторых случаях, около 5 или около 10 аминокислот. В еще одном варианте осуществления сайту расщепления протеазой предшествует линкерная последовательность на N-конце, а за ним следует линкерная последовательность на С-конце. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сайт расщепления протеазой расположен между двумя линкерами. Линкеры либо на N-, либо на С-конце сайта расщепления протеазой могут иметь различную длину, например, длину около 2-20, 6-20, 8-15, 8-10, 10-18 или 12-16. В определенных вариантах осуществления длина N- или С-концевой линкерной последовательности составляет около 3 или около 5 аминокислот.

**[00219]** Примеры пептидных линкеров по настоящему изобретению содержат один или более сайтов расщепления протеазами, распознаваемых любой из множества протеаз, таких как, но не ограничиваясь ими, сериновые протеазы, MMP (MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP18 (коллагеназу 4), MMP19, MMP20, MMP21 и т. д.), адамализины, серрализины, астацины, каспазы (например, каспазу 1, каспазу 2, каспазу 3, каспазу 4, каспазу 5, каспазу 6, каспазу 7, каспазу 8, каспазу 9, каспазу 10, каспазу 11, каспазу 12, каспазу 13, каспазу 14), катепсины (например, катепсин A, катепсин B, катепсин D, катепсин E, катепсин K, катепсин S), граним B, гуанидинобензоатазу (GB), гепсин, эластазу, легумаин, матриптазу, матриптазу 2, меприн, нейрозин, MT-SP1, неприлизин, плазмин, PSA, PSMA, TACE, TMPRSS3/4, uPA и кальпаин, FAP и KLK. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой uPA или матриптазу.

**[00220]** В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит сайт расщепления, который расщепляется более чем одной протеазой. В связи с этим отдельный

сайт расщепления может быть расщеплен 1, 2, 3, 4, 5 или более протеазами. В еще одном варианте осуществления пептидный линкер может содержать сайт расщепления, который по существу расщепляется одним ферментом, но не расщепляется другими. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит сайт расщепления, имеющий высокую специфичность. Под «высокой специфичностью» подразумевается >90% расщепления, которое наблюдается для конкретной протеазы, и менее 50% расщепления, которое наблюдается для других протеаз. В определенных вариантах осуществления пептидный линкер содержит сайт расщепления, который демонстрирует >80% расщепления одной протеазой, но менее 50% расщепления другими протеазами. В определенных вариантах осуществления пептидный линкер содержит сайт расщепления, который демонстрирует >70%, 75%, 76%, 77%, 78% или 79% расщепления одной протеазой, но менее 65%, 60%, 55%, 54 %, 53%, 52%, 51%, 50%, 49%, 48%, 47%, 46% или 45% расщепления другими протеазами. Например, в варианте осуществления сайт расщепления может быть на >90% расщеплен матриптазой и на ~75% расщеплен uPa и плазмином. В другом варианте осуществления сайт расщепления может быть расщеплен uPa и матриптазой, но специфического расщепления плазмином не наблюдается. В еще одном варианте осуществления сайт расщепления может быть расщеплен uPa, а не матриптазой или плазмином. В одном варианте осуществления сайт расщепления может демонстрировать некоторый уровень устойчивости к расщеплению неспецифической протеазой, например, расщеплению плазмином или другими неспецифическими протеазами. В связи с этим сайт расщепления протеазами может иметь «высокую устойчивость к неспецифическим протеазам» (<25% расщепления плазмином или эквивалентной неспецифической протеазой), «умеренную устойчивость к неспецифическим протеазам» (<75% расщепления плазмином или эквивалентной неспецифической протеазой) или «низкую устойчивость к неспецифической протеазе» (примерно до 90% расщепления плазмином или эквивалентной неспецифической протеазой). Такую активность расщепления можно измерить с помощью анализов, известных в данной области техники, таких как инкубация с соответствующей протеазой с последующим ДСН-ПААГ-электрофорезом или другим анализом. В определенных вариантах осуществления сайт расщепления протеазой может демонстрировать полную устойчивость к расщеплению протеазой в течение 24 часов после контакта с протеазой. В других вариантах осуществления расщепляемая протеазой последовательность может проявлять вплоть до полной устойчивости к неспецифическому расщеплению протеазой после контакта с протеазой в течение от 0,5 до 36 часов. В еще одном варианте осуществления последовательность расщепления протеазой проявляет до полной

устойчивости к неспецифическому расщеплению протеазой через 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 20, 24, 36, 48 или 72 часа контакта с соответствующей протеазой.

**[00221]** Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сайты расщепления выбраны на основе предпочтений различных желаемых протеаз. Таким образом, желаемый профиль расщепления для конкретного пептидного линкера, содержащего сайт расщепления, может быть выбран для желаемой цели (например, высокоспецифичное расщепление в определенных микроокружениях опухоли или конкретных органах), где конкретная протеаза или набор протеаз могут демонстрировать высокое, специфическое, повышенное, эффективное, умеренное, слабое расщепление или отсутствие расщепления конкретного сайта расщепления в пептидном линкере. Способы определения расщепления известны в данной области техники.

**[00222]** В определенных вариантах осуществления пептидный линкер может содержать один или более сайтов расщепления, расположенных в тандеме, с дополнительными линкерами между каждым сайтом расщепления или без них. В определенных вариантах осуществления пептидный линкер содержит первый сайт расщепления и второй сайт расщепления, где первый сайт расщепления расщепляется первой протеазой, а второй сайт расщепления расщепляется второй протеазой. В качестве неограничивающего примера пептидный линкер может содержать первый сайт расщепления, расщепляемый матрицей и uPa, и второй сайт расщепления, расщепляемый MMP. В определенных вариантах осуществления пептидный линкер содержит первый сайт расщепления, второй сайт расщепления и третий сайт расщепления, где первый сайт расщепления расщепляется первой протеазой, второй сайт расщепления расщепляется второй протеазой, а третий сайт расщепления расщепляется третьей протеазой.

**[00223]** Иллюстративные протеолитические ферменты и их распознающие последовательности, применимые в слитых белках по настоящему документу, могут быть идентифицированы специалистом в данной области техники и известны в данной области техники, например, описаны в базе данных MEROPS (см. например, Rawlings, et al. *Nucleic Acids Research*, Volume 46, Issue D1, 4 January 2018, Pages D624–D632), и в других местах (Hoadley et al, Cell, 2018; GTEX Consortium, Nature, 2017; Robinson et al, Nature, 2017).

**[00224]** Другие способы также могут быть использованы для идентификации сайтов расщепления для использования в данном документе, например, описанные в патентах

США №№ 9453078, 10138272, 9562073 и опубликованных международных заявках № WO 2015048329; WO2015116933; WO2016118629.

**[00225]** Соответственно, вариант осуществления настоящего изобретения относится к слитому белку, который содержит по меньшей мере два пептидных линкера, при этом по меньшей мере один из пептидных линкеров содержит один или более сайтов расщепления, указанных в данном документе. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предложен слитый белок, который содержит пептидный линкер, где пептидный линкер содержит сайт расщепления протеазой и расщепляется uPA. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к слитому белку, который содержит пептидный линкер, где пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность MSGRSANA (SEQ ID NO: 28). В определенных вариантах осуществления последовательность пептидного линкера содержит по меньшей мере один сайт расщепления протеазой, выбранный из TSGRSANP, LSGRSDNH, GSGRSAQV, GSSRNADV, GTARSDNV, GTARSDNV. GGGRVNNV, MSARILQV или GKGRSANA (SEQ ID NOS: 30-37, соответственно).

**[00226]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий пептидный линкер, описанный в данном документе, содержит два гетерологичных полипептида, первый полипептид, расположенный на амино (N) конце пептидного линкера, и второй полипептид, расположенный на карбоксильном (C) конце пептидного линкера, причем два гетерологичных полипептида таким образом разделены пептидным линкером.

**[00227]** В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит по меньшей мере один пептидный линкер, который не содержит сайт расщепления протеазой. В определенных вариантах осуществления пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность (EAAAK)n, где n представляет собой целое число от 1 до 5. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой EAAAK (SEQ ID NO:39). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой EAAAKEAAAK (SEQ ID NO:38). В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит полипролиновый линкер, необязательно имеющий аминокислотную последовательность PPP (SEQ ID NO: 41) или PPPP (SEQ ID NO: 40). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой глицин (G)-пролиновый (P) полипептидный линкер, необязательно GPPPG, GGPPPGG, GPPPPG или GGPPPGG. В определенных вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой линкер

$Gly_nSer$ . В определенных вариантах осуществления пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность $(Gly_3Ser)_n(Gly_4Ser)_1$, $(Gly_3Ser)_1(Gly_4Ser)_n$, $(Gly_3Ser)_n(Gly_4Ser)_n$, или $(Gly_4Ser)_n$, где n представляет собой целое число от 1 до 5. В определенных вариантах осуществления пептидные линкеры подходят для соединения различных доменов, включая последовательности, содержащие глицин-сериновые линкеры, например, но не ограничиваясь ими, $(G_mS)_n$-GG, (SGn)m, (SEGn)m, где m и n находятся в диапазоне от 0 до 20.

**[00228]** В определенных вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой аминокислотную последовательность, полученную, производную или сконструированную из последовательности шарнирной области антитела, последовательности, связывающей связывающий домен с рецептором, или последовательности, связывающей связывающий домен с трансмембранной областью или мембранным якорем. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер содержит по меньшей мере один цистеин, способный участвовать по меньшей мере в одной дисульфидной связи в физиологических условиях или других стандартных условиях для пептида (например, условиях очистки пептида, условиях хранения пептида). В определенных вариантах осуществления пептидный линкер, соответствующий или аналогичный шарнирному пептиду иммуноглобулина, сохраняет цистеин, который соответствует шарнирному цистеину, расположенному по направлению к амино-концу этого шарнира. В дополнительных вариантах осуществления пептидный линкер получен из шарнира IgG1 и был модифицирован для удаления любых остатков цистеина или представляет собой шарнир IgG1, который содержит один цистеин или два цистеина, соответствующие цистеинам шарнира.

**[00229]** В определенных вариантах осуществления пептидный линкер для применения в данном документе может содержать «измененную шарнирную область иммуноглобулина дикого типа» или «измененную шарнирную область иммуноглобулина». Такие измененные шарнирные области относятся к (a) шарнирной области иммуноглобулина дикого типа с аминокислотными заменами до 30 процентов (например, до 25 процентов, 20 процентов, 15 процентов, 10 процентов или 5 процентов аминокислотных замен или делеций), (b) части шарнирной области иммуноглобулина дикого типа длиной по меньшей мере 10 аминокислот (например, по меньшей мере 12, 13, 14 или 15 аминокислот) с аминокислотными заменами до 30 процентов (например, до 25 процентов, 20 процентов, 15 процентов, 10 процентов или 5 процентов аминокислотных замен или делеций), или (c)

части шарнирной области иммуноглобулина дикого типа, которая включает центральную шарнирную область (эта часть может иметь длину 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 или по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот). В определенных вариантах осуществления один или более остатков цистеина в шарнирной области иммуноглобулина дикого типа, такой как шарнирная область IgG1, содержащая верхнюю и центральную области, могут быть заменены одним или более другими аминокислотными остатками (например, одним или более остатками серина). Измененная шарнирная область иммуноглобулина может альтернативно или дополнительно содержать остаток пролина шарнирной области иммуноглобулина дикого типа, такой как шарнир IgG1, включающий верхнюю и центральную области, замещенный другим аминокислотным остатком (например, остатком серина).

**[00230]** Альтернативные шарнирные и линкерные последовательности, которые можно использовать в качестве соединительных областей, могут быть созданы из частей рецепторов клеточной поверхности, которые соединяют IgV-подобные или IgC-подобные домены. Области между IgV-подобными доменами, где рецептор клеточной поверхности содержит несколько тандемных IgV-подобных доменов, и между IgC-подобными доменами, где рецептор клеточной поверхности содержит несколько тандемных IgC-подобных областей, также могут быть использованы в качестве соединительных областей или линкерных пептидов. В определенных вариантах осуществления шарнирная и линкерная последовательности имеют длину от 5 до 60 аминокислот и могут быть преимущественно гибкими, но также могут обеспечивать более жесткие характеристики, могут содержать преимущественно спиральную структуру с минимальной структурой бета-листа.

**[00231]** В определенных вариантах осуществления протеазы, описанные в данном документе, экспрессируются в более высоких количествах рядом с конкретной представляющей интерес клеткой-мишенью, например, в опухолевом микроокружении опухолевой клетки-мишени in vivo. Известно множество различных патологических состояний или заболеваний, при которых представляющая интерес мишень (например, конкретный тип опухоли, конкретная опухоль, которая экспрессирует конкретный опухоль-ассоциированный антиген) совместно локализована с протеазой, где субстрат протеазы известен в данной области техники. В примере злокачественного новообразования ткань-мишень может представлять собой раковую ткань, в частности раковую ткань солидной опухоли. В литературе имеются данные о повышенном уровне протеаз в ряде

злокачественных новообразований, например, в гемобластозах или солидных опухолях. См., например, La Rocca et al, (2004) British J. of Cancer 90(7): 1414-1421.

**[00232]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к C-концу лиганд-линкер-VL, рецептор-линкер-VL, лиганд-линкер-VH или рецептор-линкер-VH.

**[00233]** В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к C-концу лиганд-расщепляемый линкер-VL, рецептор- расщепляемый линкер -VL, лиганд- расщепляемый линкер -VH, или рецептор- расщепляемый линкер -VH.

**[00234]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к C-концу лиганд-линкер (SEQ ID NO:114)-VL, рецептор-линкер (SEQ ID NO:114)-VL, лиганд-линкер (SEQ ID NO:14)-VH, или рецептор-линкер (SEQ ID NO:14)-VH.

**[00235]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к C-концу лиганд-линкер (SEQ ID NO:145)-VL, рецептор-линкер (SEQ ID NO:145)-VL, лиганд-линкер (SEQ ID NO:145)-VH, или рецептор-линкер (SEQ ID NO:145)-VH.

**[00236]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к C-концу лиганд-линкер (SEQ ID NO:147)-VL, рецептор-линкер (SEQ ID NO:147)-VL, лиганд-линкер (SEQ ID NO:147)-VH, или рецептор-линкер (SEQ ID NO:147)-VH.

**[00237]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к C-концу лиганд-линкер (SEQ ID NO:154)-VL, рецептор-линкер (SEQ ID NO:154)-VL, лиганд-линкер (SEQ ID NO:154)-VH, или рецептор-линкер (SEQ ID NO:154)-VH.

**[00238]** В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к C-концу лиганд-линкер (SEQ ID NO:203)-VL, рецептор-линкер (SEQ ID NO:203)-VL, лиганд-линкер (SEQ ID NO:203)-VH, или рецептор-линкер (SEQ ID NO:203)-VH.

**[00239]** В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к C-концу лиганд-линкер-Fc или рецептор-линкер-Fc.

**[00240]** В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к

С-концу лиганд - расщепляемый линкер - Fc или рецептор - расщепляемый линкер-Fc.

**[00241]** В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к С-концу лиганд -расщепляемый линкер (SEQ ID NO:28)-Fc или рецептор - расщепляемый линкер (SEQ ID NO:28)-Fc.

**[00242]** В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца к С-концу лиганд-линкер-Fc1 или рецептор-линкер-Fc1.

**[00243]** В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит от N-конца до С-конца лиганд - расщепляемый линкер-Fc2 или рецептор - расщепляемый линкер-Fc2.

**[00244]** В определенных вариантах осуществления Fc1 и Fc2 могут образовывать гетеродимеры. В определенных вариантах осуществления Fc1 связан с лигандом, а Fc2 связан с рецептором. В определенных вариантах осуществления линкер, соединяющий лиганд с Fc1, является расщепляемым, а линкер, соединяющий рецептор с Fc2, является нерасщепляемым. В определенных вариантах осуществления линкер, соединяющий лиганд с Fc1, является нерасщепляемым, а линкер, соединяющий рецептор с Fc2, является расщепляемым. В определенных вариантах осуществления линкер, соединяющий лиганд с Fc1, является расщепляемым, а линкер, соединяющий рецептор с Fc2, является расщепляемым. В определенных вариантах осуществления линкер, соединяющий лиганд с Fc1, является нерасщепляемым, а линкер, соединяющий рецептор с Fc2, является нерасщепляемым.

**Мишени**

**[00245]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен слитого белка, описанного в данном документе, специфически связывается с молекулой клеточной поверхности. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен слитого белка специфически связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA). TAA представляет собой любое антигенную субстанцию, экспрессированную на поверхности опухолевых клеток. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывается с TAA, выбранным из белка активации фибробластов альфа (FAPa), гликопротеина трофобласта (5T4), опухоль-ассоциированного трансдуктора кальциевого сигнала 2 (Trop2), EDB фибронектина (EDB-FN), домена F.IIIB фибронектина, CGS-2, EpCAM, EGER, HER-2, HER-3, cMet, CEA, и FOLR1, EpCAM, EGFR, HER-2, HER-3, cMet, CEA, и FOLR1, EpCAM, EGFR, HER-2, HER-

3, c-Met, FOLR1, PSMA, CD38, BCMA, и CEA. 5T4, AFP, B7-H3, кадгерина-6, CAIX, CD117, CD123, CD138, CD166, CD19, CD20, CD205, CD22, CD30, CD33, CD40, CD352, CD37, CD44, CD52, CD56, CD70, CD71, CD74, CD79b, DLL3, DR5, EphA2, FAP, FGFR2, FGFR3, GPC3, gpA33, FLT-3, gpNMB, HPV-16 E6, HPV-16 E7, ITGA2, ITGA3, SLC39A6, MAGE, мезотелина (MSLN), Mucl, Mucl6, NaPi2b, нектина-4, P-кадгерина, NY-ESO- 1, PRLR, PSCA, PTK7, ROR1, SLC44A4, SLTRK5, SLTRK6, STEAP1, TIM1, тканевого фактора (TF), Trop2, WT1.

**[00246]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывается с белком иммунной контрольной точки. Примеры белков иммунных контрольных точек включают, но не ограничиваются ими: CD27, CD137, 2B4, TIGIT, CD155, ICOS, HVEM, CD40L, LIGHT, TIM-1, 0X40, DNAM-1, PD-L1, PD1, PD-L2, CTLA-4, CD80, CD40, CEACAM1, CD48, CD70, A2AR, CD39, CD73, B7-H3, B7-H4, BTLA, IDOl, ID02, TDO, KIR, LAG-3, TIM-3, VISTA, CD47, или SIRPα.

**[00247]** В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывается с антигеном, экспрессируемым на инфицированной вирусом клетке, инфицированной бактериями клетке, поврежденном эритроците, артериальной клетке с бляшкой, воспаленной клетке или клетке фиброзной ткани.

**[00248]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфически связывается с рецептором цитокинов. Примеры рецепторов цитокинов включают, но не ограничиваются ими, рецепторы цитокинов типа I, такие как рецептор GM-CSF, рецептор G-CSF, рецепторы IL типа I, рецептор Epo, рецептор LIF, рецептор CNTF, рецептор TPO; рецепторы цитокинов типа II, такие как рецептор IFN-альфа (IFNAR1, IFNAR2), рецептор IFB-бета, рецептор IFN-гамма (IFNGR1, IFNGR2), рецепторы IF типа II; хемокиновые рецепторы, такие как CC-хемокиновые рецепторы, CXC-хемокиновые рецепторы, CX3C-хемокиновые рецепторы, XC-хемокиновые рецепторы; рецепторы суперсемейства рецепторов некроза опухоли, такие как TNFRSF5/CD40, TNFRSF8/CD30, TNFRSF7/CD27, TNFRSF1A/TNFR1/CD120a, TNFRSF1B/TNFR2/CD120b; рецепторы TGF-бета, такие как рецептор TGF-бета 1, рецептор TGF-бета 2; рецепторы суперсемейства Ig, такие как рецепторы IF-1, CSF-1R, PDGFR (PDGFRA, PDGFRB), SCFR.

**[00249]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающие домены слитых белков, описанных в данном документе, специфически связываются по меньшей мере с

одной представляющей интерес молекулой или мишенью in vivo. В некоторых вариантах осуществления представляющей интерес мишенью является: Кластер дифференцировки 3 (CD3), рецептор эпидермального фактора роста человека 2 (HER2), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), мезотелин (MSLN), тканевой фактор (TF), кластер дифференцировки 19 (CD19), тирозин-протеинкиназа Met (c-Met), кластер дифференцировки 40 (CD40), кадгерин 3 (CDH3) или их комбинации. В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит антитело, и по меньшей мере один антигенсвязывающий домен антитела связывается с эпитопом на CD3, HER2, EGFR, MSLN, TF, CD19, c-Met, CD40, CDH3 или их комбинациями.

**[00250]** В некоторых вариантах осуществления представляющей интерес мишенью является HER2, и паратоп анти-HER2 из слитого белка имеет VH, имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 120, и VL, имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 124. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-HER2 имеет аминокислотную последовательность VH, которая по существу идентична SEQ ID NO: 120, и аминокислотную последовательность VL, которая по существу идентична SEQ ID NO: 124. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-HER2 имеет аминокислотную последовательность VH, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 120, и аминокислотную последовательность VL, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 124. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-HER2 имеет аминокислотную последовательность VH, которая имеет около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с SEQ ID NO: 120, и аминокислотную последовательность VL, которая имеет около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с SEQ ID NO: 124. В некоторых вариантах осуществления паратоп анти-HER2 содержит scFv, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления анти-HER2 имеет VH, имеющую 3 CDR, HCDR1, HDR2 и HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 121, 122 и 123, соответственно, и VL, имеющую 3 CDR, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 125, 126 и 127, соответственно.

**[00251]** В некоторых вариантах осуществления представляющей интерес мишенью является EGFR, и паратоп анти-EGFR слитого белка имеет VH, имеющую аминокислотную

последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 14, и VL, имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-EGFR имеет аминокислотную последовательность VH, которая по существу идентична SEQ ID NO: 14, и аминокислотную последовательность VL, которая по существу идентична SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-EGFR имеет аминокислотную последовательность VH, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 14, и аминокислотную последовательность VL, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-EGFR имеет аминокислотную последовательность VH, которая имеет около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с SEQ ID NO: 14, и аминокислотную последовательность VL, которая имеет около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления анти-EGFR имеет VH, имеющую 3 CDR, HCDR1, HDR2 и HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 84, 85 и 86, соответственно, и VL, имеющую 3 CDR, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 59, 60, и 61, соответственно.

**[00252]** В некоторых вариантах осуществления представляющей интерес мишенью является MSLN, и паратоп анти-MSLN слитого белка имеет VH, имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 16, и VL, имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 15. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-MSLN имеет аминокислотную последовательность VH, которая по существу идентична SEQ ID NO: 16, и аминокислотную последовательность VL, которая по существу идентична SEQ ID NO: 15. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-MSLN имеет аминокислотную последовательность VH, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 16, и аминокислотную последовательность VL, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 15. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-MSLN имеет аминокислотную последовательность VH, которая имеет около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с SEQ ID NO: 16, и аминокислотную последовательность VL, которая имеет около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления анти-MSLN имеет VH, имеющую 3 CDR, HCDR1, HDR2 и HCDR3,

имеющие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 69, 70 и 71, соответственно, и VL, имеющую 3 CDR, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 74, 75, и 76, соответственно.

**[00253]** В некоторых вариантах осуществления представляющей интерес мишенью является TF (тканевой фактор), и паратоп анти-TF слитого белка имеет VH, имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 18, и VL, имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 17. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-TF имеет аминокислотную последовательность VH, которая по существу идентична SEQ ID NO: 18, и аминокислотную последовательность VL, которая по существу идентична SEQ ID NO: 17. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-TF имеет аминокислотную последовательность VH, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 18, и аминокислотную последовательность VL, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 17. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-TF имеет аминокислотную последовательность VH, которая имеет около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с SEQ ID NO: 18, и аминокислотную последовательность VL, которая имеет около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления анти-TF имеет VH, имеющую 3 CDR, HCDR1, HDR2 и HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 54, 55 и 56, соответственно, и VL, имеющую 3 CDR, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 48, 49, и 50, соответственно.

**[00254]** В некоторых вариантах осуществления представляющей интерес мишенью является CD19, и паратоп анти-CD19 слитого белка имеет VH, имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 20, и VL, имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 19. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-CD19 имеет аминокислотную последовательность VH, которая по существу идентична SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность VL, которая по существу идентична SEQ ID NO: 19. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-CD19 имеет аминокислотную последовательность VH, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность VL, которая имеет около 80%, около 85%,

около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 19. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-CD19 имеет аминокислотную последовательность VH, которая имеет около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность VL, которая имеет около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления анти-CD19 имеет VH, имеющую 3 CDR, HCDR1, HDR2 и HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 64, 65 и 66, соответственно, и VL, имеющую 3 CDR, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 74, 75, и 165, соответственно.

**[00255]** В некоторых вариантах осуществления представляющей интерес мишенью является c-Met и паратоп анти-c-Met слитого белка имеет VH, имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 22, и VL, имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления паратоп анти-c-Met имеет аминокислотную последовательность VH, которая по существу идентична SEQ ID NO: 22, и аминокислотную последовательность VL, которая по существу идентична SEQ ID NO: 21. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-c-Met имеет аминокислотную последовательность VH, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 22, и аминокислотную последовательность VL, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 21. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-c-Met имеет аминокислотную последовательность VH, которая имеет около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с SEQ ID NO: 22, и аминокислотную последовательность VL, которая имеет около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления анти-c-Met имеет VH, имеющую 3 CDR, HCDR1, HDR2 и HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 99, 100 и 101, соответственно, и VL, имеющую 3 CDR, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 94, 95, и 96, соответственно.

**[00256]** В некоторых вариантах осуществления представляющей интерес мишенью является CDH3 и паратоп анти-CDH3 слитого белка имеет VH, имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 24, и VL, имеющую аминокислотную

последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 23. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-CDH3 имеет аминокислотную последовательность VH, которая по существу идентична SEQ ID NO: 24, и аминокислотную последовательность VL, которая по существу идентична SEQ ID NO: 23. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-CDH3 имеет аминокислотную последовательность VH, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 24, и аминокислотную последовательность VL, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 23. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-CDH3 имеет аминокислотную последовательность VH, которая имеет около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с SEQ ID NO: 24, и аминокислотную последовательность VL, которая имеет около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления анти-CDH3 имеет VH, имеющую 3 CDR, HCDR1, HDR2 и HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и VL, имеющую 3 CDR, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 94, 95, и 96, соответственно.

**[00257]** В некоторых вариантах осуществления представляющей интерес мишенью является CD40 и паратоп анти-CD40 слитого белка имеет VH, имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 172, и VL, имеющую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 177. В некоторых вариантах осуществления паратоп анти-CD40 имеет аминокислотную последовательность VH, которая по существу идентична SEQ ID NO: 172, и аминокислотную последовательность VL, которая по существу идентична SEQ ID NO: 177. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-CD40 имеет аминокислотную последовательность VH, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 172, и аминокислотную последовательность VL, которая имеет около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности с SEQ ID NO: 177. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-CD40 имеет аминокислотную последовательность VH, которая имеет около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с SEQ ID NO: 172, и аминокислотную последовательность VL, которая имеет около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с SEQ ID NO: 177. В некоторых вариантах осуществления анти-CD40 имеет VH, имеющую 3 CDR, HCDR1, HDR2 и HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 173, 174 и 175,

соответственно, и VL, имеющую 3 CDR, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 178, 179, и 180, соответственно.

**[00258]** В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен слитого белка специфически связывается с молекулой, например, полипептидом, на иммунной клетке. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит антигенсвязывающий домен, который специфически связывается как с TAA, так и с антигенсвязывающим доменом, который специфически связывается с молекулой, например, полипептидом, на иммунной клетке. Таким образом, в определенных вариантах осуществления слитый белок связывается как с опухолевой клеткой, так и с иммунной клеткой. В определенных вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку. В определенных вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой макрофаг, дендритную клетку, нейтрофил, В-клетку или NK-клетку.

**[00259]** В определенных вариантах осуществления слитый белок связывается с антигеном CD3 на Т-клетке и с одним или более TAA на опухолевой клетке.

**Замаскированные привлекающие Т-клетки активаторы**

**[00260]** Привлекающие Т-клетки активаторы (TCE) представляет собой полипептидную конструкцию, часто биспецифическое антитело, которое одновременно связывает TAA на опухолевой клетке и эпитоп CD3 на Т-клетке с образованием TCR-независимого искусственного иммунного синапса. В результате Т-клетки активируются и оказывают цитотоксический эффект на опухолевую клетку. Биспецифические антитела, способные нацеливать Т-клетки на опухолевые клетки, были идентифицированы и протестированы на предмет их эффективности при лечении злокачественного новообразования. Блинатумомаб является примером биспецифического антитела к CD3-CD19 в формате, называемом BiTE™ (привлекающие Т-клетки биспецифические активаторы), который был идентифицирован для лечения В-клеточных заболеваний, таких как рецидивирующая В-клеточная неходжкинская лимфома и хронический лимфолейкоз (Baeuerle et al (2009) Cancer Research12:4941-4944), и одобрен FDA. Также были созданы привлекающие Т-клетки активаторы, направленные против других опухоль-ассоциированных антигенов-мишеней, и некоторые из них прошли клинические испытания: AMG110/MT110 EpCAM для рака легкого, рака желудка и колоректального рака; AMG211/MEDI565 CEA для желудочно-кишечной аденокарциномы; и AMG 212/BAY2010112 PSMA для рака предстательной железы (см. Suruadevara, C. M. et al, Oncoimmunology. 2015 Jun; 4(6):

e1008339). Хотя эти исследования показали многообещающую клиническую эффективность, им также мешала тяжелая дозолимитирующая токсичность, в первую очередь из-за синдрома высвобождения цитокинов (СВЦ). Это приводило к узким терапевтическим окнам. Использование замаскированных паратопов, связывающих с Т-клетки, которые активируются преимущественно в микроокружении опухоли, может снизить токсичность TCE.

**[00261]** В определенных вариантах осуществления слитый белок связывает антиген CD3 на Т-клетке и TAA на опухолевой клетке. В определенных вариантах осуществления слитый белок связывает антиген CD3 на Т-клетке, TAA на опухолевой клетке и внеклеточный домен IgSF на опухолевой клетке. В определенных вариантах осуществления слитый белок связывает антиген CD3 на Т-клетке, TAA на опухолевой клетке и внеклеточный домен IgSF на Т-клетке.

**[00262]** В определенных вариантах осуществления слитый белок демаскируется протеазой в микроокружении опухоли и связывается с TAA на опухолевой клетке и антигеном CD3 на Т-клетке, вызывая образование мостиков между Т-клеткой и опухолевой клеткой, как показано в Примере 20. В определенных вариантах осуществления незамаскированный слитый белок связывает антиген CD3 на Т-клетке, а также лиганд TAA и IgSF на опухолевой клетке, как показано на Фиг. 31. В определенных вариантах осуществления связывание лиганда IgSF (например, PD-L1) с опухолевой клеткой предотвращает связывание ее рецептора IgSF (например, PD-1) с Т-клеткой, таким образом блокируя ингибирование контрольной точки (Фиг. 31C).

**[00263]** В определенных вариантах осуществления слитые белки содержат VH и VL паратопа анти-CD3, по существу идентичные паратопам, показанным в таблице BB. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-CD3 содержит аминокислотные последовательности VH и VL:

**[00264]** (a) VH, включающую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 2, и VL, включающую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 1;

**[00265]** (b) VH, включающую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 206, и VL, включающую аминокислотную последовательность в соответствии

с SEQ ID NO: 210;

**[00266]** (c) VH, включающую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 215, и VL, включающую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 219;

**[00267]** (d) VH, включающую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 223, и VL, включающую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 227;

**[00268]** (d) VH, включающую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 231, и VL, включающую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 235; или

**[00269]** (e) VH, включающую аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 239, и VL, включающую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 243.

**[00270]** В определенных вариантах осуществления паратоп CD3 содержит VH и VL, которые имеют около 90%, около 91%, около 92%, около 93%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98% или около 99% идентичности с:

**[00271]** (a) VH, включающей аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 2, и VL, включающей аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 1;

**[00272]** (b) VH, включающей аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 206, и VL, включающей аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 210;

**[00273]** (c) VH, включающей аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 215, и VL, включающей аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 219;

**[00274]** VH, включающей аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 223, и VL, включающей аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ

ID NO: 227;

**[00275]** VH, включающей аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 231, и VL, включающей аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 235; или

**[00276]** VH, включающей аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 239, и VL, включающей аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 243.

**[00277]** В некоторых вариантах осуществления паратоп анти-CD3 содержит VH, содержащую 3 CDR тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 207, 208 и 209, и VL, содержащую 3 CDR легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 211, 212 и 214. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-CD3 содержит VH, содержащую 3 CDR тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 224, 225 и 226, и VL, содержащую 3 CDR легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 228, 229 и 230. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-CD3 содержит VH, содержащую 3 CDR тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 232, 233 и 234, и VL, содержащую 3 CDR легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 236, 237 и 238. В определенных вариантах осуществления паратоп анти-CD3 содержит VH, содержащую 3 CDR тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 240, 241 и 242, и VL, содержащие 3 CDR легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности, соответствующие SEQ ID NO: 244, 245 и 246.

**Конструкции CAR**

**[00278]** В определенных вариантах осуществления слитый белок может быть включен в состав химерного антигенного рецептора (CAR) или фрагмента CAR. CAR может содержать один или более внеклеточных лиганд-связывающих доменов, необязательно шарнирную область, трансмембранную область и внутриклеточную сигнальную область.

Один или более внеклеточных лиганд-связывающих доменов могут включать один или более слитых белков. Внеклеточный лиганд-связывающий домен, как правило, может содержать одноцепочечный вариабельный фрагмент иммуноглобулина (scFv) или другой лиганд-связывающий домен, такой как Fab или природный белковый лиганд. Шарнирная область, как правило, может содержать полипептидную шарнирную область вариабельной длины, например, одну или более аминокислот, шарнирную область CD8 альфа или область IgG4 (или другие), а также их комбинации. Трансмембранный домен, как правило, может включать трансмембранную область, полученную из CD8-альфа, CD28 или других трансмембранных белков, таких как DAP10, DAP12 или NKG2D, и их комбинаций. Внутриклеточная сигнальная область может включать один или более внутриклеточных сигнальных доменов, таких как CD28, 4-1BB, CD3-дзета, OX40, 2B4 или другие внутриклеточные сигнальные домены и их комбинации. Например, один или более внутриклеточных сигнальных доменов могут включать CD28 и CD3-дзета, 4-1BB и CD3-дзета или CD3-дзета. Лимфоциты, такие как Т-клетки и NK-клетки, можно модифицировать для получения клеток с химерным антигенным рецептором (например, CAR-T). CAR-T-клетки могут распознавать специфические растворимые антигены или антигены на поверхности клеток-мишеней, таких как поверхность опухолевых клеток, или на клетках в микроокружении опухоли. Когда внеклеточный лиганд-связывающий домен связывается с родственным лигандом, внутриклеточный сигнальный домен CAR может активировать лимфоцит. *См., например*, Brudno et al., Nature Rev. Clin. Oncol. (2018) 15:31 - 46; Maude et al., N. Engl. J. Med. (2014) 371: 1507-1517; Sadelain et al, Cancer Disc. (2013) 3:388-398 (2018); патенты США №№ 7446190 и 8399645.

**[00279]** В определенных вариантах осуществления предложена конструкция CAR, которая содержит конструкцию пары лиганд-рецептор, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления конструкция CAR содержит scFv, который может быть слит с конструкцией пары лиганд-рецептор. В определенных вариантах осуществления конструкция пары лиганд-рецептор представляет собой конструкцию пары лиганд-рецептор с одной цепью, которая может быть слита с N-концом scFv с линкером или без него. В определенных вариантах осуществления конструкция пары лиганд-рецептор с одной цепью содержит расщепляемый протеазой линкер. В определенных вариантах осуществления рецептор слит с первым линкером или без него с N-концом scFv, а лиганд внутренне слит со вторым линкером, соединяющим тяжелую цепь и легкую цепь scFv. В некоторых вариантах осуществления линкеры содержат сайт расщепления протеазой, расщепляемый протеазой. В определенных вариантах осуществления лиганд слит с первым

линкером или без него с N-концом scFv, а рецептор внутренне слит со вторым линкером, соединяющим тяжелую цепь и легкую цепь scFv. В определенных вариантах осуществления первый линкер расщепляется, а второй линкер не расщепляется протеазой. В определенных вариантах осуществления Т-клетка может быть модифицирована для экспрессии CAR пары лиганд-рецептор.

## Гомология последовательностей

**[00280]** Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к выделенному полинуклеотиду или набору полинуклеотидов, кодирующих слитый белок, описанный в данном документе. Полинуклеотид в этом контексте может кодировать весь слитый белок или его часть.

**[00281]** Термины «нуклеиновая кислота», «молекула нуклеиновой кислоты» и «полинуклеотид» используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидов, либо рибонуклеотидов, либо их аналогов. Неограничивающие примеры полинуклеотидов включают ген, фрагмент гена, матричную РНК (мРНК), кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенную ДНК любой последовательности, выделенную РНК любой последовательности, зонды на основе нуклеиновой кислоты и праймеры.

**[00282]** Полинуклеотид, который «кодирует» данный полипептид, представляет собой полинуклеотид, который транскрибируется (в случае ДНК) и транслируется (в случае мРНК) в полипептид *in vivo* при помещении под контроль соответствующих регуляторных последовательностей. Границы кодирующей последовательности определяются стартовым кодоном на 5’ (амино)-конце и стоп-кодоном трансляции на 3’ (карбокси)-конце. Последовательность терминации транскрипции может быть расположена на 3'-конце от кодирующей последовательности.

**[00283]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотидным и полипептидным последовательностям, которые идентичны или по существу идентичны полипептиду, кодирующему по меньшей мере часть слитого белка, описанного в данном документе, например, первый или второй полипептид биологически функционального белка. Термин «идентичный» в контексте двух или более последовательностей полинуклеотидов или полипептидов относится к двум или более

последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми. Последовательности являются «по существу идентичными», если они имеют одинаковый процент аминокислотных остатков или нуклеотидов (например, около 80%, около 85%, около 90% или около 95% идентичности в определенной области) при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или обозначенной области, измеренной с использованием одного из обычно используемых алгоритмов сравнения последовательностей, известных специалистам в данной области техники, или путем выравнивания вручную и при визуальном осмотре. Это определение также относится к комплементарности тестируемой полинуклеотидной последовательности. Идентичность может существовать в отношении области, по меньшей мере составляющей в длину около 50 аминокислот или нуклеотидов, или области, составляющей в длину около 75–100 аминокислот или нуклеотидов, или, если не указано, по всей последовательности полипептида или полинуклеотида. Для сравнения последовательностей, как правило, тестируемые последовательности сравнивают с назначенной эталонной последовательностью. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости, обозначают координаты последовательности и указывают программные параметры алгоритма для работы с последовательностями. Можно использовать программные параметры по умолчанию или указать альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для исследуемых последовательностей по сравнению с эталонной последовательностью на основании программных параметров.

**[00284]** «Окно сравнения», как используется в данном документе, относится к сегменту последовательности, включающему смежные положения аминокислот или нуклеотидов, которые могут составлять от 20 до 1000 аминокислотных или нуклеотидных положений, например, от около 50 до около 600 или от около 100 до около 300 или от около 150 до около 200 смежных аминокислотных или нуклеотидных положений, по которым тестируемая последовательность может быть сравнена с эталонной последовательностью с таким же числом смежных положений после оптимального выравнивания двух последовательностей. Более длинные сегменты вплоть до полноразмерной последовательности включительно также могут использоваться в качестве окна сравнения в некоторых вариантах осуществления. Способы выравнивания последовательностей для сравнения известны специалистам в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно провести, например, с помощью алгоритма

поиска локальной гомологии Smith & Waterman, 1970, *Adv. Appl. Math.,* 2:482c; с помощью алгоритма выравнивания областей гомологии Needleman & Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.,* 48:443; поиска по методу сходства согласно Pearson & Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 85:2444, или с помощью компьютеризированной реализации этих алгоритмов (например, GAP, BESTFIT, FASTA или TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Мэдисон, штат Висконсин), или путем ручного выравнивания и визуального осмотра (см. например, Ausubel *et al.,* Current Protocols in Molecular Biology, (1995 supplement), Cold Spring Harbor Laboratory Press). Примерами доступных алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul *et al.,* 1997, *Nuc. Acids Res.,* 25:3389-3402, и Altschul *et al.,* 1990, *J. Mol. Biol.,* 215:403-410, соответственно. Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным на вебсайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI).

**[00285]** Определенные варианты осуществления, описанные в данном документе, относятся к вариантным последовательностям, которые содержат одну или более аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены являются консервативными заменами. В общем, «консервативная замена» считается заменой одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей сходные физические, химические и/или структурные свойства. Обычные консервативные замены перечислены в столбце 1 таблицы 4. Специалисты в данной области техники поймут, что основными факторами при определении того, что является консервативной заменой, обычно являются размер боковой цепи аминокислоты и ее физические/химические свойства, но некоторые среды позволяют заменять данную аминокислоту более широким спектром аминокислот, чем те, которые перечислены в столбце 1. Эти дополнительные аминокислоты, как правило, либо имеют сходные свойства с замещаемой аминокислотой, но более значительно варьируют по размеру, либо имеют сходные размеры, но более значительно варьируют по физическим/химическим свойствам. Этот более широкий диапазон консервативных замен указан в столбце 2 таблицы 4. Специалист в данной области техники может легко определить наиболее подходящую группу заместителей для выбора с учетом конкретной белковой среды, в которой производится аминокислотная замена.

**Таблица 4: Консервативные аминокислотные замены**

| **Исходная аминокислота** | **Столбец 1** | **Столбец 2** |
|---|---|---|
| Ala (A) | Gly, Ile, Leu, Met, норлейцин, Val | Cys, Gly, Ile, Leu, Met, норлейцин, Phe, Trp, Tyr, Val |
| Arg (R) | His, Lys | His, Lys |
| Asn (N) | Cys, Gln, Ser, Thr | Asp, Cys, Gln, Glu, Ser, Thr |
| Asp (D) | Glu | Asn, Cys, Gln, Glu, Ser, Thr |
| Cys (C) | Asn, Gln, Ser, Thr | Asn, Asp, Gln, Glu, Ser, Thr |
| Gln (Q) | Asn, Cys, Ser, Thr | Asn, Asp, Cys, Glu, Ser, Thr |
| Glu (E) | Asp | Asp, Asn, Cys, Gln, Ser, Thr |
| Gly (G) | Pro | Ala, Ile, Leu, Met, норлейцин, Pro, Val |
| His (H) | Arg, Lys | Arg, Lys, Phe, Trp, Tyr |
| Ile (I) | Ala, Gly, Leu, Met, норлейцин, Val | Ala, Cys, Gly, Leu, Met, норлейцин, Phe, Trp, Tyr, Val |
| Leu (L) | Ala, Gly, Ile, Met, норлейцин, Val | Ala, Cys, Gly, Ile, Met, норлейцин, Phe, Trp, Tyr, Val |
| Lys (K) | Arg, His | Arg, His |
| Met (M) | Ala, Gly, Ile, Leu, норлейцин, Val | Ala, Cys, Gly, Ile, Leu, норлейцин, Phe, Trp, Tyr, Val |
| Phe (F) | Tyr, Trp | Ala, Cys, Gly, His, Ile, Leu, Met, норлейцин, Trp, Tyr, Val |
| Pro (P) | Gly | Gly |
| Ser (S) | Asn, Cys, Gln, Thr | Asp, Asn, Cys, Gln, Glu, Thr |

| **Исходная аминокислота** | **Столбец 1** | **Столбец 2** |
|---|---|---|
| Thr (T) | Asn, Cys, Gln, Ser | Asp, Asn, Cys, Gln, Glu, Ser |
| Trp (W) | Phe, Tyr | Ala, Cys, Gly, His, Ile, Leu, Met, норлейцин, Phe, Tyr, Val |
| Tyr (Y) | Phe, Trp | Ala, Cys, Gly, His, Ile, Leu, Met, норлейцин, Phe, Trp, Val |
| Val (V) | Ala, Gly, Ile, Leu, Met, норлейцин | Ala, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, норлейцин, Phe, Trp, Tyr |

## Получение слитых белков

**[00286]** Слитые белки, описанные в данном документе, могут быть получены с использованием стандартных рекомбинантных способов, известных в данной области техники (см., например, патент США № 4816567 и «*Antibodies: A Laboratory Manual*,» 2nd Edition, Ed. Greenfield, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2014).

### *Векторы, кодирующие слитые белки*

**[00287]** Для рекомбинантного получения слитого белка, описанного в данном документе, полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующих слитый белок, создают и встраивают в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Полинуклеотид(-ы), кодирующий слитый белок, может быть получен стандартными способами, известными в данной области техники (см., например, Ausubel *et al., Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1994 & update, и "*Antibodies: A Laboratory Manual*," 2nd Edition, Ed. Greenfield, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2014). Как должно быть понятно специалисту в данной области техники, количество полинуклеотидов, необходимых для экспрессии слитого белка, будет зависеть от формата слитого белка, включая то, содержит ли слитый белок антитело и количество полипептидов в пределах слитого белка. Например, когда слитый белок содержит две полипептидные цепи, потребуются два полинуклеотида, каждый из которых кодирует одну полипептидную цепь. Аналогичным образом, в определенных вариантах осуществления, когда слитый белок содержит биологически функциональный белок в формате мкАт, требуются два полинуклеотида, каждый из которых кодирует одну полипептидную цепь.

Когда требуется несколько полинуклеотидов, их можно включить в один вектор или в более чем один вектор.

**[00288]** Как правило, для экспрессии полинуклеотид или набор полинуклеотидов включают в вектор экспрессии вместе с одним или более регуляторными элементами, такими как транскрипционные элементы, которые необходимы для эффективной транскрипции полинуклеотида. Примеры таких регуляторных элементов включают, но не ограничиваются ими, промоторы, энхансеры, терминаторы и сигналы полиаденилирования. Специалисту в данной области техники понятно, что выбор регуляторных элементов зависит от клетки-хозяина, выбранной для экспрессии полипептидов слитого белка, и что такие регуляторные элементы могут быть получены из различных источников, включая гены бактерий, грибов, вирусов, млекопитающих или насекомых. Вектор экспрессии может дополнительно содержать гетерологичные последовательности нуклеиновых кислот, которые облегчают экспрессию или очистку экспрессированного белка. Примеры включают, но не ограничиваются ими, сигнальные пептиды и аффинные метки, такие как аффинные метки металлов, гистидиновые метки, последовательности, кодирующие авидин/стрептавидин, последовательности, кодирующие глутатион-S-трансферазу (GST), и последовательности, кодирующие биотин. Вектор экспрессии может быть внехромосомным вектором или интегрирующим вектором.

**[00289]** Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к векторам (таким как векторы экспрессии), содержащим один или более полинуклеотидов, кодирующих по меньшей мере часть слитого белка, описанного в данном документе. Полинуклеотид(-ы) могут быть включены в один вектор или в более чем один вектор. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды входят в состав мультицистронного вектора.

**[00290]** Векторы экспрессии, используемые для экспрессии полинуклеотидов, включают, но не ограничиваются ими, pTT5 и pUC15, клетки, содержащие векторы, кодирующие слитые белки.

**[00291]** Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии полипептидов слитых белков включают различные прокариотические или эукариотические клетки, известные в данной области техники. Эукариотические клетки-хозяева включают, например, клетки млекопитающих, клетки растений, клетки насекомых и дрожжевые клетки (такие как клетки *Saccharomyces* или *Pichia*). Прокариотические клетки-хозяева

включают, например, клетки *E. coli, A. salmonicida* или *B. subtilis*.

**[00292]** В определенных вариантах осуществления слитые белки продуцируются бактериями, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не требуются, как описано, например, в патентах США №№ 5648237, 5789199 и 5840523, а также в Charlton, *Methods in Molecular Biology,* Vol. 248, pp. 245-254, B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003.

**[00293]** Эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, являются подходящими клетками-хозяевами для экспрессии в определенных вариантах осуществления, в частности, штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были «гуманизированы», что приводит к продукции антитела с частично или полностью человеческим профилем гликозилирования (см. например, Gerngross, 2004, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414, и Li *et al.*, 2006, *Nat. Biotech.* 24:210-215).

**[00294]** Подходящими клетками-хозяевами для экспрессии гликозилированных слитых белков, как правило, являются эукариотические клетки. Например, в патентах США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 описана технология PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях. Линии клеток млекопитающих, адаптированные для роста в суспензии, особенно пригодны для экспрессии слитых белков. Примеры включают, но не ограничиваются ими, линию почки обезьяны CV1, трансформированную клетками SV40 (COS-7), линию эмбриональной почки человека (HEK) 293 или клетки 293 (см., например, Graham *et al.,* 1977, *J. Gen Virol.,* 36:59), клетки почки детенышей хомячка (BHK), мышиные клетки Сертоли TM4 (см., например, Mather, 1980, *Biol Reprod,* 23:243-251); клетки почки обезьяны (CV1), клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76), клетки карциномы шейки матки человека (HeLa), клетки почки собаки (MDCK), клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A), клетки легкого человека (W138), клетки человека клетки печени (Hep G2), опухоль молочной железы мыши (MMT 060562), клетки TRI (см., например, Mather *et al.,* 1982, *Annals N.Y. Acad Sci,* 383:44-68), клетки MRC 5, клетки FS4, китайские клетки яичника хомяка (CHO) (включая клетки DHFR$^-$CHO, см. Urlaub *et al.,* 1980, *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:4216), и линии клеток миеломы (такие как Y0, NS0 и Sp2/0). Иллюстративные линии клеток-хозяев млекопитающих, подходящие для продукции антител, рассмотрены в Yazaki & Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, pp. 255-268 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003).

**[00295]** В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой временную или стабильную линию клеток высших эукариот, такую как линия клеток млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего HEK293T, CHO, HeLa, NS0 или COS. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой стабильную линию клеток, которая позволяет осуществлять созревание гликозилирования слитого белка.

**[00296]** Клетки-хозяева, содержащие вектор(-ы) экспрессии, кодирующий слитый белок, можно культивировать с использованием обычных способов для получения слитого белка. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, содержащие вектор(-ы) экспрессии, кодирующий слитый белок, можно использовать терапевтически или профилактически для доставки слитого белка субъекту, или полинуклеотиды или векторы экспрессии можно вводить в клетку от субъекта *ex vivo*, после чего клетку возвращают в организм субъекта.

**[00297]** В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит (например, была трансформирована) вектор, содержащий полинуклеотид, который кодирует VL связывающего домена, описанного в данном документе, и VH связывающего домена. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий VL связывающего домена, описанный в данном документе, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий соответствующую VH связывающего домена. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичника китайского хомячка (CHO), клеткой эмбриональной почки человека (HEK) или лимфоидной клеткой (например, клеткой Y0, NS0, Sp20).

**[00298]** В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой Expi293™ (Thermo Fisher, Уолтем, штат Массачусетс). В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетки CHO-S (Национальный научно-исследовательский совет Канады) или клетки HEK293.

**[00299]** Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способу получения слитого белка, включающему культивирование клетки-хозяина, в которую были введены один или более полинуклеотидов, кодирующих слитый белок, или один или более векторов экспрессии, кодирующих слитый белок, в условиях, подходящих

для экспрессии слитого белка и, необязательно, выделение слитого белка из клетки-хозяина (или из среды для культивирования клеток-хозяев).

**[00300]** Среды для культивирования клеток, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, DMEM (Thermo Fisher, Уолтем, штат Массачусетс), Opti-MEM™ (Thermo Fisher, Уолтем, штат Массачусетс), среду с пониженным содержанием сыворотки Opti-MEM™ I (Thermo Fisher, Уолтем, штат Массачусетс), среду RPMI-1640, среду для экспрессии Expi293™ (Thermo Fisher, Уолтем, штат Массачусетс) и среду для экспрессии FreeStyle CHO (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс).

**[00301]** Среда для культивирования клеток может быть дополнена сывороткой, например, эмбриональной бычьей сывороткой (FBS), аминокислотами, например, L-глютамином, антибиотиками, например, пенициллином и стрептомицином, и/или противогрибковыми средствами, например, амфотерицином, или любыми другими добавками, обычно используемыми для поддержания культуры клеток.

***Очистка слитых белков***

**[00302]** Как правило, слитые белки очищают после экспрессии. Белки могут быть выделены или очищены различными способами, известными специалистам в данной области техники (см., например, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994). Стандартные методы очистки включают хроматографические методики, включая ионный обмен, гидрофобное взаимодействие, аффинность, разделение по размерам или гель-фильтрацию и обращение фаз, выполняемые при атмосферном давлении или при высоком давлением с использованием таких систем, как ЖХБР и ВЭЖХ. Дополнительные методы очистки включают электрофоретические, иммунологические методики, методики преципитации, диализа и хроматофокусирования. Применимы также методики ультрафильтрации и диафильтрации в сочетании с концентрированием белков. Как хорошо известно специалистам, множество природных белков связывают Fc и антитела, и эти белки используют для очистки определенных антител. Например, бактериальные белки A и G связываются с областью Fc. Аналогичным образом бактериальный белок L связывается с областью Fab некоторых антител. Очистка также становиться возможной с помощью конкретного партнера по слиянию. Например, антитела можно очищать, используя смолу с глутатионом, если применяется GST-гибридизация, аффинную хроматографию с $Ni^{+2}$, если применяется His-маркер, или иммобилизованное

антитело к flag, если применяется flag-маркер. Необходимая степень очистки будет варьироваться в зависимости от применения антител. В некоторых случаях очистка может быть не нужна.

**[00303]** В некоторых вариантах осуществления слитые белки являются по существу чистыми. Термин «по существу чистый» (или «по существу очищенный») при использовании в отношении слитого белка, описанного в данном документе, означает, что слитый белок по существу или по существу свободен от компонентов, которые обычно сопровождают белок или взаимодействуют с ним, обнаруженные в его встречающемся в природе среде, такой как нативная клетка или клетка-хозяин в случае рекомбинантно полученного слитого белка. В определенных вариантах осуществления по существу чистый слитый белок представляет собой белковый препарат, содержащий менее около 30%, менее около 25%, менее около 20%, менее около 15%, менее около 10% или менее около 5% (по сухому весу) загрязняющего белка.

**[00304]** Оценка очистки и/или гомогенности белка может быть выполнена любым методом, известным в данной области, включая, помимо прочего, КЭ-ДСН в невосстанавливающих/восстанавливающих условиях, ДСН-ПААГ-электрофорез в невосстанавливающих/восстанавливающих, эксклюзионной сверхэффективную жидкостную хроматографию (СВЭЖХ-ЭХ), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), масс-спектрометрию, многоракурсное рассеивание света (MALS), динамическое рассеяние света (DLS).

***Посттрансляционные модификации***

**[00305]** В определенных вариантах осуществления слитые белки, описанные в данном документе, содержат одну или более посттрансляционных модификаций. Такие посттрансляционные модификации могут происходить *in vivo* или их можно проводить *in vitro* после выделения слитого белка из клетки-хозяина.

**[00306]** Посттрансляционные модификации включают различные модификации, известные в данной области техники (см., например, *Proteins - Structure and Molecular Properties*, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; *Post-Translational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12, 1983; Seifter *et al.,* 1990, *Meth. Enzymol.*, 182:626-646, и Rattan *et al.,* 1992, *Ann. N.Y.*

*Acad. Sci.*, 663:48-62). В тех вариантах осуществления, в которых слитые белки содержат одну или более посттрансляционных модификаций, слитые белки могут содержать модификации одного и того же типа в одном или более сайтах или могут содержать разные модификации в разных сайтах.

**[00307]** Примеры посттрансляционных модификаций включают гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защитными/блокирующими группами, формилирование, окисление, восстановление, протеолитическое расщепление или специфическое химическое расщепление бромистым цианом, трипсином, химотрипсином, папаином, протеазой V8 или $NaBH_4$.

**[00308]** Другие примеры посттрансляционных модификаций включают, например, добавление или удаление N-связанных или O-связанных углеводных цепей, химические модификации N-связанных или O-связанных углеводных цепей, процессинг N-концевых или C-концевых концов, присоединение химических фрагментов к аминокислотному остову и добавление или удаление N-концевого остатка метионина в результате экспрессии в прокариотической клетке-хозяине. Посттрансляционные модификации также могут включать модификацию обнаруживаемой меткой, такой как ферментативная, флуоресцентная, изотопная или аффинная метка для обеспечения обнаружения и выделения белка. Примеры подходящих ферментных меток включают, но не ограничиваются ими, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу и ацетилхолинэстеразу. Примеры подходящих комплексов простетической группы включают, но не ограничиваются ими, стрептавидин/биотин и авидин/биотин. Примеры подходящих флуоресцентных материалов включают, но не ограничиваются ими, умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, дихлортриазиниламин флуоресцеин, дансилхлорид и фикоэритрин. Примером люминесцентного материала является люминол, примерами биолюминесцентного материала являются люцифераза, люциферин и экворин, а примерами подходящих радиоактивных материалов являются йод, углерод, сера, тритий, индий, технеций, таллий, галлий, палладий, молибден, ксенон и фтор.

**[00309]** Дополнительные примеры посттрансляционных модификаций включают ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гемового компонента, ковалентное присоединение нуклеотида или нуклеотидного производного, ковалентное присоединение липида или липидного производного, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола,

перекрестное сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных поперечных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, гамма-карбоксилирование, образование GPI-якоря, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристиолирование, пегилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК присоединение аминокислот к белкам, например, аргинилирование и убиквитинирование.

***Маскировка и запрограммированная активация слитых белков***

**[00310]** В соответствии с настоящим изобретением слитые белки замаскированы от взаимодействия с намеченной(-ыми) мишенью(-ями). Степень снижения связывания слитых белков с их мишенью(-ями) можно измерить стандартными методами, такими как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), биослойная интерферометрия (BLI), поверхностный плазмонный резонанс (ППР), флуоресцентно-активированная сортировка клеток (FACS), проточная цитометрия, анализ кинетического исключения (KinExA), Meso Scale Discovery (MSD)), микрофлюидика или изотермическая титрационная калориметрия (ITC). В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит антигенсвязывающий домен, который замаскирован парой лиганд-рецептор, и связывание антигенсвязывающего домена с его родственным антигеном снижено по меньшей мере в 3 раза по сравнению с соответствующим незамаскированным антигеннсвязывающим доменом, например, связывание антигенсвязывающего домена с его родственным антигеном снижается в по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 10 раз, по меньшей мере 20 раз, по меньшей мере 25 раз или по меньшей мере 30 раз, или по меньшей мере 40 раз, или по меньшей мере 50 раз, или по меньшей мере 70 раз, или по меньшей мере 80 раз, или по меньшей мере 90 раз, или по меньшей мере 100 раз, или по меньшей мере 200 раз, или по меньшей мере 400 раз, или по меньшей мере 600 раз, или по меньшей мере 800 раз, или по меньшей мере 1000 раз, или по меньшей мере 2000 раз, или по меньшей мере 5000 раз, или по меньшей мере 10000 раз.

**[00311]** В соответствии с настоящим изобретением расщепление протеазой по меньшей мере одного из пептидных линкеров между лигандом или рецептором пары лиганд-рецептор и биологически функциональным белком демаскирует (активирует) слитый белок, так что он может связываться с намеченной(-ыми) мишенью(-ями). Восприимчивость пептидного линкера к расщеплению может быть проверена *in vitro* стандартными методами, включая описанные в данном документе в примерах. Степень, в которой связывание слитого белка с его мишенью(-ями) восстанавливается после

расщепления протеазой, также можно проверить с помощью стандартных методов, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), биослойная интерферометрия (BLI), поверхностный плазмонный резонанс (ППР), сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS), проточная цитометрия, анализ кинетического исключения (KinExA), Meso Scale Discovery (MSD), микрофлюидика или изотермическая титрационная калориметрия (ITC). Восстановление связывания слитого белка с его мишенью(-ями) может быть частичным или полным. Частичное восстановление связывания определяется как измеримое связывание соответствующего домена слитого белка (например, лиганда, рецептора или антигенсвязывающего домена) с предполагаемой мишенью и может быть, например, в 100-2 раза меньше, чем связывание исходного домена. Частичное восстановление может быть в примерно 100, 75, 50, 25, 10, 5 или 2 раза меньше, чем связывание исходного домена.

## Способы лечения

**[00312]** В определенных аспектах настоящее изобретение включает способы лечения заболевания или патологического состояния, включающие введение слитого белка, описанного в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

**[00313]** В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе способы предназначены для лечения злокачественного новообразования. Злокачественные новообразования могут включать, но не ограничиваться ими, гематологические новообразования (включая лейкозы, миеломы и лимфомы), карциному (включая аденокарциному и плоскоклеточный рак), меланому и саркому. Карциномы и саркомы также часто называют «солидными опухолями». В некоторых вариантах осуществления изобретения злокачественное новообразование представляет собой солидную опухоль. В конкретных вариантах осуществления, злокачественное новообразование представляет собой лейкоз. В определенных вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой лимфому.

**[00314]** Слитый белок может оказывать цитотоксическое или цитостатическое действие и может привести к одному или более из уменьшения размера опухоли, замедления или предотвращения увеличения размера опухоли, увеличения времени безрецидивной выживаемости между исчезновением или удалением опухоли и ее повторным появлением,

предотвращение первоначального или последующего возникновения опухоли (например, метастазирования), увеличение времени до прогрессирования, уменьшение одного или более неблагоприятных симптомов, связанных с опухолью, или увеличение общего времени выживаемости субъекта, имеющего опухоль.

**[00315]** В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе способы предназначены для лечения иммунодефицитного нарушения или заболевания.

**[00316]** В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе способы предназначены для лечения аутоиммунных заболеваний или патологических состояний.

**[00317]** Способы, описанные в данном документе, включают введение слитого белка, описанного в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом. Слитый белок можно вводить субъекту подходящим путем введения. Как будет понятно специалисту в данной области техники, путь и/или способ введения будут варьироваться в зависимости от желаемых результатов. Как правило, иммунотерапевтические антитела вводят системным или местным путем. Местное введение может осуществляться в место расположения опухоли или в дренирующий опухоль лимфатический узел. Как правило, слитые белки вводят парентерально, например, внутривенно, внутримышечно, внутрикожно, внутрибрюшинно, подкожно или в спинномозговой канал, например, путем инъекции или инфузии.

**[00318]** Лечение достигается введением «терапевтически эффективного количества» слитого белка. «Терапевтически эффективное количество» относится к количеству, которое эффективно в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса субъекта. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты слитого белка перевешиваются терапевтически полезными эффектами. «Достаточное количество» означает количество, достаточное для получения желаемого эффекта, например, количество, достаточное для модулирования иммунного ответа на клетку или ткань-мишень, например, путем связывания иммуномодулирующего лиганда-рецептора с иммунной клеткой.

**[00319]** Подходящая дозировка слитого белка может быть определена практикующим врачом. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретного используемого слитого белка, способ введения, время введения, скорость выведения полипептида, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в сочетании со слитым белком, например, противораковые агенты, возраст, пол, массу, патологическое состояние, общее состояние здоровья и анамнез болезни субъекта, подлежащего лечению, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

**Способы модулирования иммунной клетки или иммунного ответа**

**[00320]** В определенных вариантах осуществления слитые белки, описанные в данном документе, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, например, субъекту, имеющему злокачественное новообразование, для модулирования иммунной системы субъекта. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления слитые белки, описанные в данном документе, подавляют иммунный ответ или усиливают иммунный ответ.

**[00321]** В соответствии с этим вариантом осуществления введение субъекту достаточного количества слитого белка может вызвать один или более из следующих эффектов для активации или усиления иммунного ответа: модуляция контрольной точки иммунного ответа, модуляция сигналинга Т-клеточного рецептора, модуляция Т-клеточного рецептора, активация клеток, модуляция провоспалительных цитокинов, модуляция продукции интерферона-γ Т-клетками, модуляция супрессии Т-клеток, модуляция выживаемости и/или дифференцировки опухоль-ассоциированных макрофагов (TAM) или супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC), и/или модуляция цитотоксического или цитостатического эффекта на клетки.

**[00322]** В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы модулирования иммунного ответа, включающие ингибирование иммунной контрольной точки, стимуляцию контрольной точки иммунного ответа, активацию иммунных клеток, стимуляцию сигналинга Т-клеточного рецептора и стимуляцию антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), зависимой от Т-клеток цитотоксичности (TDCC)), клеточно-зависимой цитотоксичности (CDC) или антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

**[00323]** В определенных вариантах осуществления слитый белок при активации протеазой способен агонизировать целевой костимулирующий рецептор лейкоцитов. Функциональные эффекты агонизма костимулирующих рецепторов лейкоцитов включают активацию эффекторных Т-клеток, дифференцировку и активацию воспалительных миелоидных клеток и/или рекрутирование В-клеток и/или NKT-клеток. Активация эффекторных Т-клеток может привести к увеличению продукции одного или более цитокинов Т-клетками, таких как гамма-интерферон (IFN-γ), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-17 (IL-17), интерлейкин-21 (IL-21), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), фактор некроза опухоли-α (TNF-α), белок воспаления макрофагов 1β (MIP-1β) и/или лиганд 13 C-X-C-мотива (CXCL13). Повышенная продукция IL-21 и CXCL13 эффекторными Т-клетками может, например, поддерживать дифференцировку и активацию воспалительных миелоидных клеток в TME, рекрутировать противоопухолевые лимфоидные клетки, такие как В- и NKT-клетки, и/или поддерживать образование третичных лимфоидных структур.

**[00324]** В определенных вариантах осуществления слитый белок активирует эффекторные Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления слитый белок увеличивает продукцию GM-CSF, TNF-α, MIP-1β, IL-17, IL-12, IL-21 и/или лиганда 13 C-X-C-мотива (CXCL13) эффекторными Т-клетками.

**[00325]** В определенных вариантах осуществления слитый белок снижает CSF1-зависимую жизнеспособность моноцитов и активирует эффекторные Т-клетки.

**[00326]** Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам применения слитых белков для модулирования агонизма костимулирующих рецепторов лейкоцитов *in vivo*, например, для лечения злокачественного новообразования.

**[00327]** В определенных вариантах осуществления способы относятся к ингибированию или подавлению иммунной клетки или иммунного ответа, например, для лечения аутоиммунного заболевания или нарушения. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления слитый белок вводят в количестве, достаточном для модуляции иммунной клетки. В определенных вариантах осуществления подавление иммунного ответа осуществляется путем модуляции контрольной точки иммунного ответа, модуляции сигналинга Т-клеточного рецептора, модуляции Т-клеточного рецептора. активации

клеток, модуляции провоспалительных цитокинов, модуляции продукции интерферона-γ Т-клетками, модуляции супрессии Т-клеток, модуляции выживаемости и/или дифференцировки опухоль-ассоциированных макрофагов (TAM) или супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC), и/или модуляции цитотоксического или цитостатического эффекта на клетки.

**Способы модификации ADCC целевой клетки**

**[00328]** В определенных вариантах осуществления слитые белки, описанные в данном документе, индуцируют антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), что, в свою очередь, приводит к повышенному лизису клетки-мишени. В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит Fc-область с повышенной аффинностью связывания Fc в отношении FcγRIIIa (активирующего рецептора), что приводит к усилению антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и усилению лизиса клетки-мишени. В определенных вариантах осуществления область Fc имеет модифицированные домены CH2, содержащие аминокислотные модификации, которые приводят к повышенной аффинности связывания Fc с FcγRIIIa (активирующим рецептором), что приводит к повышенной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

**[00329]** В определенных вариантах осуществления слитые белки, описанные в данном документе, снижают антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC). При определенных показаниях желательно снижение или устранение ADCC и комплемент-опосредованной цитотоксичности (CDC). В некоторых вариантах осуществления могут быть полезны слитые белки, содержащие область Fc с модифицированными доменами CH2, содержащими аминокислотные модификации, которые приводят к увеличению связывания с FcγRIIb, или аминокислотные модификации, которые уменьшают или устраняют связывание области Fc со всеми Fcγ-рецепторами («нокаутные» варианты). В определенных вариантах осуществления слитый белок содержит область Fc со сниженным связыванием с FcγRIIb (ингибирующим рецептором)

**Фармацевтические композиции**

**[00330]** Слитые белки по настоящему изобретению могут быть включены в состав фармацевтических композиций. Эти композиции могут содержать в дополнение к одному или более слитым белкам фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам в данной области

техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Точная природа носителя или другого материала может зависеть от способа введения, например, пероральный, внутривенный, кожный или подкожный, назальный, внутримышечный, внутрибрюшинный пути.

**[00331]** Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме таблеток, капсул, порошка или жидкости. Таблетка может содержать твердый носитель, такой как желатин или адъювант. Жидкие фармацевтические композиции, как правило, содержат жидкий носитель, такой как вода, нефть, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахарида или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

**[00332]** Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в место поражения активный ингредиент будет в форме парентерально приемлемого водного раствора, не содержащего пирогенов и имеющего подходящие pH, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области техники могут с успехом приготовить пригодные растворы с применением, например, изотонических носителей, таких как хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, лактата Рингера для инъекций. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

**[00333]** Для слитых белков в соответствии с настоящим изобретением, которые должны быть введены индивиду, введение предпочтительно осуществляется в «терапевтически эффективном количестве», достаточном для оказания пользы индивиду. Также можно вводить «профилактически эффективное количество», когда оно достаточно для оказания пользы индивиду. Фактическое вводимое количество, а также скорость и продолжительность введения будут зависеть от характера и степени тяжести заболевания, вызываемого агрегацией белков. Назначение лечения, например, принятие решений о дозировке и д. входит в обязанности врачей общей практики и других врачей, и, как правило, учитывает нарушение, подлежащее лечению, состояние конкретного пациента, место доставки, способ применения и другие факторы, известные практикующим врачам. Примеры вышеупомянутых техник и протоколов можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980.

**[00334]** Композиция может назначаться отдельно или в комбинации с другими видами лечения, одновременно или последовательно, в зависимости от патологического состояния, подлежащего лечению.

## Наборы

**[00335]** В настоящем изобретении также предложены наборы, содержащие одну или более композиций, описанных в данном документе, и инструкции по применению. Таким образом, в определенных вариантах осуществления в данном документе описаны наборы, содержащие векторы для экспрессии слитого белка, описанные в данном документе, и инструкции по применению. В определенных вариантах осуществления в данном документе описаны наборы, включающие клетки-хозяева, содержащие вектор для экспрессии слитого белка и инструкции по применению. В определенных вариантах осуществления представлены наборы, содержащие очищенный слитый белок и инструкции по применению. Очищенный слитый белок может быть лиофилизирован или представлен в сухой форме, такой как порошок или гранулы, и набор может дополнительно содержать подходящий растворитель для восстановления лиофилизированного или высушенного компонента(-ов).

**[00336]** Набор, как правило, содержит контейнер и размещенную с контейнером или находящуюся на нем этикетку и/или вкладыш в упаковку. Этикетка или вкладыш в упаковку содержит инструкции, в обычном порядке включенные в коммерческие упаковки терапевтических препаратов, предоставляющие информацию или инструкции о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях и/или предупреждениях, касающихся использования таких терапевтических препаратов. Этикетка или вкладыш в упаковку могут дополнительно включать указание в предписанной государственным органом форме, регулирующее производство, применение или продажу фармацевтических или биологических препаратов, упоминание которого отображает одобрение этим органом производства, применения или продажи препарата для введения людям или животным. Контейнер содержит композицию, содержащую слитый белок. В некоторых вариантах осуществления контейнер может иметь стерильный порт доступа. Например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций.

**[00337]** В дополнение к контейнеру, содержащему композицию, содержащую слитый

белок, набор может включать один или более дополнительных контейнеров, содержащих другие компоненты набора. Например, фармацевтически приемлемый буфер (такой как бактериостатическая вода для инъекций) (BWFI), забуференный фосфатом солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы), другие буферные растворы или разбавители.

**[00338]** Подходящий контейнер включает, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты для внутривенных растворов и т. п. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Если необходимо, один или более компонентов набора могут быть лиофилизированы или предоставлены в сухой форме, такой как порошок или гранулы, и набор может дополнительно содержать подходящий растворитель для восстановления лиофилизированного(-ых) или сухого(-их) компонентов.

**[00339]** Набор может дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения или с точки зрения пользователя, такие как фильтры, иглы и шприцы.

## ПРИМЕРЫ

**[00340]** Следующие примеры предлагаются только в иллюстративных целях и никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Были приняты меры для того, чтобы сохранить точность в отношении используемых чисел (например, количеств, значений температуры и т. д.), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения.

**[00341]** В практике по данному описанию будут использоваться, если не указано иное, стандартные методы химии белков, биохимии белков, методы рекомбинантной ДНК и фармакологии, доступные специалистам в данной области техники. Такие методики подробно описаны в литературе. См., например, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry 3rd Ed.* (Plenum Press) Vols A and B(1992).

## ПРИМЕР 1 ДИЗАЙН ЗАМАСКИРОВАННЫХ АНТИ-CD3 X АНТИ-HER2 СЛИТЫХ БЕЛКОВ ПРИВЛЕКАЮЩИХ Т-КЛЕТОК АКТИВАТОРОВ

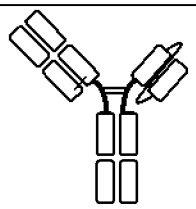
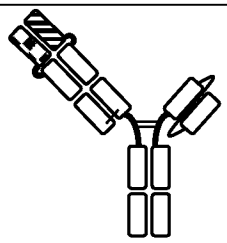
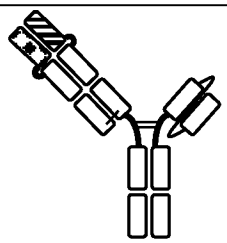
**[00342]** К анти-CD3 Fab x анти-Her2 scFv Fc присоединяли маску на анти-CD3 путем связывания одной из пар лиганд-рецептор PD-1-PDL-1 с N-концом легкой цепи Fab, а другой к N-концу тяжелой цепи. Конструкции слитых белков конструировали следующим образом.

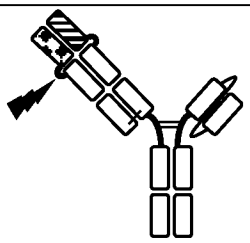
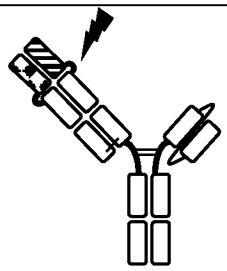
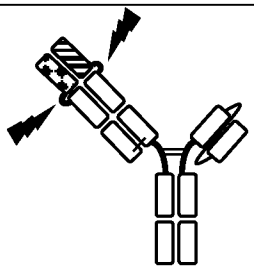
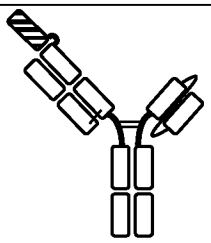
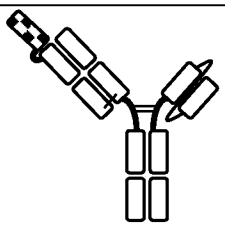
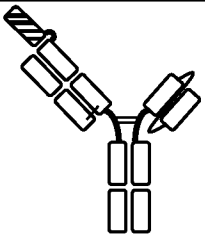
***Способы***

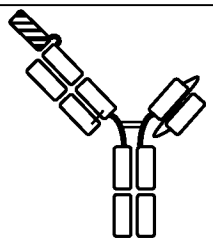
**[00343]** Слитые белки были в модифицированном биспецифическом формате Fab x scFv Fc с полуантителом, содержащим тяжелую и легкую цепи анти-CD3, которые образуют гетеродимер с анти-Her2 scFv, слитым с Fc. Паратоп анти-CD3 был описан в US20150232557A1 (VL SEQ ID NO: 1, VH SEQ ID NO: 2). Паратоп анти-Her2 был в формате scFv, основанном на VL и VH трастузумаба (Carter, P. *et al.* Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4285-4289, doi:10.1073/pnas.89.10.4285 (1992)), соединенного линкером глицин-серин, как описано в US10000576B1 (SEQ ID NO: 3). Чтобы сделать возможным селективное гетеродимерное объединение, мутации вводили в цепь CH3 анти-CD3, а также цепь анти-Her2 scFv-CH3 Fc, как описано ранее (Von Kreudenstein, T. S. *et al.* Improving biophysical properties of a bispecific antibody scaffold to aid developability: quality by molecular design. *MAbs* **5**, 646-654, doi:10.4161/mabs.25632 (2013); (домен CH3 A-цепи, SEQ ID NO: 4, домен CH3 B-цепи SEQ ID NO: 5). Мутации (L234A_L235A_D265S по сравнению с человеческим IgG1 CH2 дикого типа) также вводили в оба домена CH2 для снижения связывания с Fc-гамма-рецепторами (SEQ ID NO: 6). Кроме того, полипептиды на основе модифицированных белковых последовательностей доменов IgV человеческого PD-1 (SEQ ID NO: 7) и/или PD-L1 (SEQ ID NO: 8) (West, S. M. & Deng, X. A. Considering B7-CD28 as a family through sequence and structure. *Exp Biol Med (Maywood)*, 1535370219855970, doi:10.1177/1535370219855970 (2019) сливали с N-концами тяжелой цепи (VH-CH1-шарнир-CH2-CH3) и легкой каппа-цепи (VL-CL) вариабельных доменов анти-CD3, соответственно, с использованием линкеров, которые состоят из переменного количества повторов последовательностей, которые, по прогнозам, образуют спиральные витки ($(EAAAK)_n$, Chen, X., Zaro, J. L. & Shen, W. C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev* **65**, 1357-1369, doi:10.1016/j.addr.2012.09.039 (2013)). Было предсказано, что эти фрагменты PD-1 и PD-L1 димеризуются и стерически блокируют связывание эпитопа. Во всех вариантах либо последовательность PD-1, либо последовательность PD-L1, используемая в качестве половины маски, содержала мутации для увеличения аффинности комплекса PD-1:PD-L1, как описано ранее (Maute, R. L. *et al.* Engineering high-affinity PD-1 variants for optimized

immunotherapy and immuno-PET imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E6506-6514, doi:10.1073/pnas.1519623112 (2015); SEQ ID NO: 9; Liang, Z. *et al.* High-affinity human PD-L1 variants attenuate the suppression of T cell activation. *Oncotarget* **8**, 88360-88375, doi:10.18632/oncotarget.21729 (2017); SEQ ID NO: 10). Кроме того, во всех фрагментах PD-1 дикого типа неспаренный цистеин был заменен на серин, чтобы снять нагрузку с экспонируемой восстанавливающей группы (SEQ ID NO: 11). Некоторые варианты также содержали последовательность расщепления для протеазы uPa, ассоциированной с микроокружением опухоли (TME) (MSGRSANA SEQ ID NO: 28), чтобы обеспечить удаление части или всей маски путем воздействия протеазы на слитый белок. Схема дизайна конструкции для замаскированного Fab, а также предполагаемый механизм действия показаны на Фиг. 1. Окончательные дизайны представляли собой биспецифические молекулы Fab x scFv Fc, которые содержат замаскированный анти-CD3 Fab, а также анти-Her2 scFv. Схема показана на Фиг. 2, а используемые последовательности перечислены в таблице A.

**Таблица A: Состав последовательности тестируемых вариантов***

| **Вариант, №** | **Схема** | **Описание** | **Клон H1** | **Клон L1** | **Клон H2** |
|---|---|---|---|---|---|
| 30421 |  | CD3 x Her2 Fab x scFv Fc без маски | 12989 | 12985 | 21490 |
| 30423 |  | Замаскированный HA PD-1: PD-L1 ДТ CD3 x Her2 Fab x scFv Fc, с нерасщепляемым линкером | 22080 | 22091 | 21490 |
| 30426 |  | Замаскированный PD-1 ДТ: HA PD-L1 CD3 x Her2 Fab x scFv Fc, с нерасщепляемым линкером | 22082 | 22092 | 21490 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 30430 |  | Замаскированный HA PD-1:PD-L1 ДТ CD3 x Her2 Fab x scFv Fc с расщепляемым линкером PD-L1 | 22080 | 22096 | 21490 |
| 30436 |  | Замаскированный PD-1 ДТ: HA PD-L1 CD3 x Her2 Fab x scFv Fc, расщепляемый PD-1 | 22086 | 22092 | 21490 |
| 31934 |  | Замаскированный PD-1 ДТ: PD-L1 ДТ, CD3 x Her2 Fab x scFv Fc, PD-1 и расщепляемый PD-L1 | 22083 | 22094 | 21490 |
| 31929 |  | Полумаскированный CD3 x Her2 Fab x scFv Fc, HA PD-1, присоединенный к HC | 22080 | 12985 | 21490 |
| 31931 |  | Полумаскированный CD3 x Her2 Fab x scFv Fc, HA PD-L1, присоединенный к LC | 12989 | 22092 | 21490 |
| 32497 |  | Полумаскированный CD3 x Her2 Fab x scFv Fc, PD-1 KO, присоединенный к HC | 23734 | 12985 | 21490 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 33551 |  | Полумаскированный Fab x scFv Fc к CD3 x гемагглютинину, HA PD-1, присоединенный к HC | 22080 | 12985 | 11018 |

* Домен IgV PD-1, присоединенный к тяжелой цепи, обозначен полосатым узором на упрощенных изображениях, а домен IgV PD-L1, присоединенный к легкой цепи, показан клетчатым узором.

## ПРИМЕР 2 ПРОИЗВОДСТВО ЗАМАСКИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ АНТИ-CD3

**[00344]** Последовательности модифицированных вариантов CD3 x Her2 Fab x scFv, сконструированные в Примере 1, переносили в векторы экспрессии, экспрессировали и очищали следующим образом.

***Способы***

**[00345]** Вставки вектора тяжелой цепи, содержащие сигнальный пептид (Barash *et al.*, 2002, *Biochem and Biophys Res. Comm.*, 294:835–842, SEQ ID 27) и клон тяжелой цепи, оканчивающийся на G446 (нумерация EU) CH3, лигировали в вектор pTT5 для получения векторов для экспрессии тяжелой цепи. Вставки вектора легкой цепи, содержащие тот же самый сигнальный пептид и клон легкой цепи, лигировали в вектор pTT5 для получения векторов для экспрессии легкой цепи. Полученные векторы для экспрессии тяжелой и легкой цепи секвенировали, чтобы подтвердить правильность рамки считывания и последовательность кодирующей ДНК.

**[00346]** Тяжелые и легкие цепи модифицированных вариантов CD3 x Her2 Fab x scFv Fc коэкспрессировали в 25 мл культур клеток Expi293F™ (Thermo Fisher, Уолтем, штат Массачусетс). Клетки Expi293™ культивировали при 37°C в среде для экспрессии Expi293™ (Thermo Fisher, Уолтем, штат Массачусетс) на орбитальном шейкере, вращающемся со скоростью 125 об/мин, в увлажненной атмосфере с 8% $CO_2$. Объем 25 мл с общим числом клеток $7{,}5\times10^7$ клеток трансфицировали всего 25 мкг ДНК при соотношении трансфекции 40:40:20 для H1:L1:H2. Перед трансфекцией ДНК разводили в 1,5 мл среды с пониженным содержанием сыворотки Opti-MEM™ I (Thermo Fisher, Уолтем, штат Массачусетс). В объеме 1,42 мл среды с пониженным содержанием сыворотки Opti-MEM™ I разбавляли 80 мкл реагента ExpiFectamine™ 293 (Thermo Fisher, Уолтем, штат Массачусетс) и после инкубации в течение пяти минут объединяли со смесью для

трансфекции ДНК до общего объема 3 мл. Через 10-20 минут к культуре клеток добавляли смесь реагентов ДНК-ExpiFectamine™293. После инкубации при 37°C в течение 18-22 часов к каждой культуре добавляли 150 мкл ExpiFectamine™ 293 Enhancer 1 и 1,5 мл ExpiFectamine™ 293 Enhancer 2 (Thermo Fisher, Уолтем, штат Массачусетс). Клетки инкубировали в течение пяти-семи дней и собирали супернатанты для очистки белка.

**[00347]** Образцы осветленного супернатанта наносили на 1 мл суспензии, содержащей 50% смолы mAb Select SuRe (GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс) в периодическом режиме. Колонки уравновешивали в PBS. После загрузки колонки промывали PBS и белок элюировали 100 мМ буфером цитрата натрия, pH 3,5. Для элюированных образцов корректировали pH путем добавления 10% (об./об.) 1 M Tris pH 9 для получения конечного pH 6-7. После концентрирования весь материал вводили в систему AKTA Pure FPLC (GE Life Sciences) и пропускали через колонку Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Life Sciences), предварительно уравновешенную PBS с pH 7,4. Белок элюировали с колонки со скоростью 0,75 мл/мин и собирали фракциями по 0,5 мл. Пиковые фракции объединяли и концентрировали с использованием полиэфирсульфоновых концентраторов Vivaspin с НОММ 20, 30 кДа (MilliporeSigma, Берлингтон, Массачусетс, США). После стерильной фильтрации через 0,2 мкм шприцевые фильтры PALL Acrodisc™ с мембраной Supor™ белки количественно определяли по поглощению при A280 нм (Nanodrop), замораживали и хранили при -80°C до дальнейшего использования.

***Результаты***

**[00348]** Образцы содержали значительные количества соединений с более высокой молекулярной массой, что было определено с помощью СВЭЖХ-ЭХ после очистки белка А (не показано), и для получения образцов высокой чистоты использовали препаративную ЭХ. Выход после препаративной ЭХ варьировали от 1,5 до 5 мг на вариант. Чистоту и стабильность образца оценивали в Примере 3 и Примере 4.

## ПРИМЕР 3 ОЦЕНКА ЧИСТОТЫ И ГОМОГЕННОСТИ ЗАМАСКИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ АНТИ-CD3

**[00349]** Очищенные варианты оценивали на чистоту и гомогенность образца с помощью КЭ-ДСН в невосстанавливающих/восстанавливающих условиях, СВЭЖХ-ЭХ, как описано ниже.

***Способы***

**[00350]** После очистки чистоту образцов оценивали с помощью экспресс-анализа белков с высокой пропускной способностью в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с использованием LabChip® GXII для КЭ-ДСН (Perkin Elmer, Уолтем, штат Массачусетс). Процедуры проводились в соответствии с Руководством пользователя HT Protein Express LabChip® версии 2 со следующими изменениями. Образцы мкАт в количестве 2 мкл или 5 мкл (диапазон концентраций 5–2000 нг/мкл) добавляли в отдельные лунки 96-луночных планшетов (BioRad, Геркулес, штат Калифорния) вместе с 7 мкл HT Protein Express Sample Buffer (Perkin Elmer, № 760328). Восстанавливающий буфер готовят путем добавления 3,5 мкл DTT(1M) к 100 мкл буфера HT Protein Express Sample Buffer. Затем образцы мкАт денатурировали при 90°C в течение 5 минут и в каждую лунку для образца добавляли 35 мкл воды. Прибор LabChip® использовали с чипом HT Protein Express Chip (Perkin Elmer, № 760499) и настройками анализа HT Protein Express 200 (14-200 кДа).

**[00351]** СВЭЖХ-ЭХ выполняли на системе Agilent Technologies 1260 Infinity LC с использованием колонки Agilent Technologies AdvanceBio SEC 300A при 25 °C. Перед инъекцией образцы центрифугировали при 10000 *g* в течение 5 минут и в колонку вводили 5 мкл. Образцы анализировали в течение 7 минут при скорости потока 1 мл/мин в PBS, pH 7,4, и элюирование контролировали по поглощению в УФ-диапазоне при 190-400 нм. Хроматограммы экстрагировали при 280 нм. Интеграцию пиков проводили с использованием программного обеспечения OpenLAB CDS ChemStation.

***Результаты***

**[00352]** Репрезентативные кривые СВЭЖХ-ЭХ для образцов после препаративной очистки ЭХ вариантов на Фиг. 3A, 3C, 3E и 3G показали высокогомогенные образцы, которые содержали 89–94 % правильных соединений. Наличие небольшого пика при малом времени удерживания по сравнению с основными частицами указывает на присутствие небольших количеств высокомолекулярных соединений, таких как олигомеры и агрегаты, во всех образцах.

**[00353]** Анализ КЭ-ДСН в невосстанавливающих условиях (Фиг. 3B, 3D, 3E и 3F) показал одно преобладающее соединение, и только полосы, соответствующие интактным цепям всех вариантов, обнаружены в ходе КЭ-ДСН в восстанавливающих условиях. Примечательно, что замаскированные тяжелые и легкие цепи показали значительно более высокую кажущуюся молекулярную массу, чем можно было бы ожидать (110 кДа против 63 кДа для HC, 54 кДа против 37 кДа для LC). Это также отражалось в высокой кажущейся молекулярной массе невосстановленных соединений с дисульфидной связью (215 кДа

против 152 кДа). Гликозилирование фрагментов PD1 и PD-L1 в конструкциях, вероятно, вызывает увеличение кажущейся молекулярной массы (Tan, S. *et al.* An unexpected N-terminal loop in PD-1 dominates binding by nivolumab. *Nat Commun* **8**, 14369, doi:10.1038/ncomms14369 (2017), Li, C. W. *et al.* Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nat Commun* **7**, 12632, doi:10.1038/ncomms12632 (2016)).

## ПРИМЕР 4 ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ЗАМАСКИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ АНТИ-CD3

**[00354]** Очищенные варианты оценивали на термическую стабильность с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), как описано ниже.

***Способы***

**[00355]** Образцы репрезентативного набора модифицированных вариантов CD3 x Her2 Fab x scFv Fc разводили в PBS до концентрации 0,5-1 мг/мл. Для анализа ДСК с использованием NanoDSC (TA Instruments, Нью-Касл, штат Делавэр, США) в 96-луночные планшеты для образцов и эталона добавляли 950 мкл образца и соответствующего буфера (PBS), соответственно. В начале выполнения ДСК выполняли холостую инъекцию буфера (PBS) для стабилизации исходного уровня. Затем каждый образец вводили и сканировали при температуре от 25 до 95 °C со скоростью 1 °C/мин и давлением азота 60 фунтов на квадратный дюйм. Термограммы анализировали с помощью программного обеспечения NanoAnalyze. Соответствующую термограмму буфера вычитали из термограммы образца и базового уровня, используя сигмоидальную кривую. Затем данные аппроксимировали с масштабированной моделью ДСК с двумя состояниями.

***Результаты***

**[00356]** Термограмма ДСК немодифицированного варианта CD3 x Her2 Fab x scFv Fc (30421, Фиг. 4) показала переходы при 68 и 83 °C. В то время как переход с $T_m$ = 68 °C, вероятно, соответствует неразрешенным отдельным переходам для разворачивания анти-CD3 Fab, анти-Her2 scFv и домен CH2, переход при $T_m$ = 83 °C, вероятно, соответствует разворачиванию домена CH3 в тяжелой цепи. Термограммы вариантов с маской PD-1:PD-L1 (30430, 30436; Фиг. 4) также показали два перехода при одинаковых температурах и с аналогичными кривыми термограммы для варианта без маски. Это указывает на то, что слитые маскирующие домены не влияют на $T_m$ анти-CD3 Fab и разворачиваются либо совместно с Fab, либо несовместно, но с $T_m$, сходной с Fab, scFv и CH2.

## ПРИМЕР 5 РАСЩЕПЛЕНИЕ UPA ВАРИАНТОВ К CD3

**[00357]** Для оценки высвобождения части или всей маски из анти-CD3 из слитых белков

путем расщепления введенных сайтов расщепления протеазами в линкерах образцы обрабатывали uPa *in vitro*. Реакции отслеживали с помощью КЭ-ДСН в восстанавливающих условиях следующим образом.

***Способы***

**[00358]** Для предварительного расщепления вариантов 25-100 мкг очищенного образца разбавляли до конечной концентрации варианта 0,2 мг/мл в PBS + 0,05% Tween20 и рекомбинантного человеческого активатора u-плазминогена (uPa)/урокиназы (R&D Systems, № P00749) добавляли при молярном соотношении протеаза:субстрат 1:50. После инкубации при 37°C в течение 24 часов фрагменты образцов анализировали в КЭ-ДСН в восстанавливающих условиях, как описано в Примере 2, а затем замораживали и хранили при -80°C до дальнейшего применения.

***Результаты***

**[00359]** Анализ профилей КЭ-ДСН в восстанавливающих условиях для замаскированных вариантов с обработкой uPa и без нее показал, что в исследованных условиях часть или вся маска эффективно удалялась из Fab путем расщепления в введенных сайтах расщепления (Фиг. 5). Для успешно расщепленных вариантов (30430, 30436, 31934) полосы, представляющие фрагменты замаскированной тяжелой и/или легкой цепи, полностью исчезают при расщеплении, в то время как появляются фрагменты незамаскированной тяжелой и/или легкой цепи. В то время как широкая полоса низкой интенсивности, соответствующая фрагменту свободного PD-1, может наблюдаться для варианта 30430, этого не было для высвобожденного PD-L1 в варианте 30436. Небольшой размер и гетерогенность размеров из-за гликозилирования (Tan, S. *et al.* An unexpected N-terminal loop in PD-1 dominates binding by nivolumab. *Nat Commun* **8**, 14369, doi:10.1038/ncomms14369 (2017), Li, C. W. *et al.* Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nat Commun* **7**, 12632, doi:10.1038/ncomms12632 (2016)), вероятно, делают свободные фрагменты PD-1 и PD-L1 едва обнаруживаемыми и необнаружимыми, соответственно. В вариантах, которые не содержат последовательности расщепления (30421, 30423), расщепления не наблюдалось.

## ПРИМЕР 6 МАСКИРОВКА/ДЕМАСКИРОВКА CD3-СВЯЗЫВАНИЯ

**[00360]** Нерасщепленные и расщепленные образцы вариантов анти-CD3 из Примера 5 тестировали на связывание с экспрессирующими CD3 клетками Jurkat с помощью ELISA и с пан-Т-клетками с помощью проточной цитометрии следующим образом.

***Способы***

**ELISA**

**[00361]** Клетки Jurkat человека (Fujisaki Cell Center, Япония) поддерживали в среде RPMI-1640 с добавлением 2 мМ L-глютамина и 10% инактивированной теплом фетальной бычьей сыворотки (FBS) с 1X пенициллином/стрептомицином в инкубаторе с увлажнителем с 5% CO2 при 37°C.

Образцы модифицированных вариантов к CD3 x Her2 из Примера 5 разбавляли 2X в блокирующем буфере, содержащем насыщающие количества нерелевантного человеческого Ig, с последующими семью трехкратными серийными разведениями в блокирующем буфере, всего в восьми точках концентрации. В контрольные лунки добавляли только блокирующий буфер для измерения фонового сигнала на клетках (отрицательный/пустой контроль).

**[00362]** Все инкубации проводили при 4°C. В день анализа экспоненциально растущие клетки центрифугировали и высевали в 96-луночный фильтровальный планшет (MilliporeSigma, Берлингтон, штат Массачусетс, США) в смеси 1:1 полной культуральной среды и блокирующего буфера. К клеткам добавляли равные объемы 2X вариантов или контролей и инкубировали в течение 1 часа. Затем планшет промывали 4 раза с использованием фильтрации под вакуумом. В лунки добавляли HRP-конъюгированное специфическое к IgG Fc-гамма человека вторичное антитело (Jackson ImmunoResearch, Уэст, штат Пенсильвания, США) и дополнительно инкубировали в течение 1 часа. Планшеты 7 раз промывали фильтрацией под вакуумом с последующим добавлением субстрата TMB (Thermo Scientific, Уолтем, штат Массачусетс, США) при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 0,5 объема 1 М серной кислоты и супернатант переносили фильтрацией в прозрачный 96-луночный планшет (Corning, Корнинг, штат Нью-Йорк, США). Поглощение при 450 нм считывали на планшет-ридере Spectramax 340PC с коррекцией оптического пути PathCheck.

**[00363]** Кривые связывания ОП450 за вычетом фона по сравнению с линейной или логарифмической концентрацией антител аппроксимировали с помощью GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Ла-Хойя, штат Калифорния, США). Модель аппроксимации кривой нелинейной регрессии с четырьмя параметрами для одного участка с угловым коэффициентом Хилла использовали для определения значений Bmax и кажущихся значений Kd для каждого исследуемого соединения.

**Проточная цитометрия**

**[00364]** Антитела титровали в 96-луночном планшете с V-образным дном (Sarstedt AG, Нюмбрехт, Германия) от 300 нМ до 1,7 пМ при разведении 1:3 в общей сложности 20 мкл/лунку в буфере для FACS - PBS, содержащем 2% FBS (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс). Пан-Т-клетки периферической крови здорового донора (BioIVT, Вестбери, штат Нью-Йорк) размораживали и промывали в среде, состоящей из среды RPMI 1640 (A1049101, модификация ATCC) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс). Клетки подсчитывали, ресуспендировали в буфере для FACS и добавляли в 96-луночный планшет по 50000 клеток на лунку. Клетки инкубировали с вариантами при 4°C в течение 1 часа, а затем дважды промывали буфером для FACS и 1 мг/мл козьего вторичного антитела AF647 к Fc IgG человека (Jackson ImmunoResearch, Уэст-Гроув, Пенсильвания). В лунки также добавляли разбавленный в 1000 раз краситель для оценки жизнеспособности (Biolegend, Сан-Диего, штат Калифорния). Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин при встряхивании (200 об/мин). Затем клетки дважды промывали буфером для FACS и ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS. Для считывания результатов анализа среднее геометрическое значения флуоресценции APC измеряли с помощью проточной цитометрии на приборе BD LSRFortessa (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния). Исходные данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo, LLC (Becton, Dickinson & Company, Эшленд, штат Орегон). Графики были созданы с помощью GraphPad Prism версии 8.1.2 для Mac OS X (GraphPad Software, Ла-Хойя, штат Калифорния).

***Результаты***

**ELISA**

**[00365]** Как видно на Фиг. 6, варианты, содержащие полную маску на основе PD1:PD-L1, присоединенную к Fab к CD3 (30423, 30430, 30436), показали снижение связывания в 40-180 раз по сравнению с незамаскированным контролем (30421). После обработки uPa связывание CD3 расщепляемыми вариантами 30430 и 30436 частично восстанавливалось (в пределах 6-7 раз по сравнению с незамаскированным контролем). Это частичное восстановление может быть вызвано стерическим затруднением связывания эпитопа частью маски, которая остается на маске после расщепления. В то же время контроли, у которых только PD-1 или PD-L1 были присоединены либо к тяжелой, либо к легкой цепи, соответственно (31929, 31931), показали аналогичное снижение (в 4-5 раз) связывания по сравнению с незамаскированным контролем, как и расщепленные uPa образцы полностью

замаскированных вариантов.

**Проточная цитометрия**

**[00366]** Как видно на Фиг. 22, варианты, содержащие полную маску на основе PD1:PD-L1, присоединенную к Fab к CD3 (30423, 30430), показали снижение связывания в >43 раза по сравнению с незамаскированным контролем (30421). После обработки uPa связывание CD3 расщепляемого варианта 30430 частично восстанавливалось (в пределах 29 раз по сравнению с незамаскированным контролем). Это частичное восстановление может быть вызвано стерическим затруднением связывания эпитопа частью маски, которая остается на маске после расщепления. В то же время контроль, в котором к тяжелой цепи был присоединен только PD-1 (31929), продемонстрировал аналогичное (в 14 раз) снижение связывания по сравнению с незамаскированным контролем, что и расщепленные uPa образцы полностью замаскированных вариантов. В отдельном эксперименте вариант с нефункциональным доменом PD-1, присоединенным к тяжелой цепи (32497), показал аналогичное (6-кратное) снижение связывания по сравнению с незамаскированным контролем, как это видно для эквивалентного варианта с функциональным PD-1 (31929, 5-кратное) (Фиг. 32).

## ПРИМЕР 7 ЗАВИСИМАЯ ОТ Т-КЛЕТОК КЛЕТОЧНАЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ЗАМАСКИРОВАННЫХ И НЕЗАМАСКИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ

**[00367]** Функциональное влияние маски на основе PD-1:PD-L1 на способность вариантов CD3 x Her2 Fab x scFv Fc привлекать и активировать Т-клетки для уничтожения клеток, несущих Her2, оценивали в анализе зависимой от Т-клеток клеточной цитотоксичности (TDCC) следующим образом.

***Способы***

**Анализ совместного культивирования**

**[00368]** JIMT-1 (Институт Лейбница, Брауншвейг, Германия), культивируемые в питательной среде, состоящей из среды DMEM (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), HCC1954 (ATCC, Манассас, штат Вирджиния), и HCC827 (ATCC, Манассас, штат Вирджиния), культивируемые в питательной среде, состоящей из модификации RPMI-1640 ATCC (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, и MCF-7 (ATCC, Манассас, штат Вирджиния), культивируемые в питательной среде, состоящей из среды MEM (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) с добавлением 10%

эмбриональной бычьей сыворотки и 0,01 мг/мл человеческого рекомбинантного инсулина (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), культивировали в горизонтальном положении в колбах T-175 (Corning, Корнинг, штат Нью-Йорк) в инкубаторе при 37 °C с 5% углекислого газа. В день подготовки анализа варианты титровали в трех повторностях при разведении 1:3 непосредственно в 384-луночных планшетах с оптически прозрачным дном, обработанных клеточной культурой, (ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), от 5 нМ до 0,08 пМ. Опухолевые клетки промывали PBS (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), собирали с помощью TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), разводили в среде и подсчитывали с использованием Vi-Cell (Beckman Coulter, Индианаполис, штат Индиана). Флакон с первичными пан-Т-клетками человека (BioIVT, Вестбери, штат Нью-Йорк) оттаивали на водяной бане при 37 °C, промывали в среде и подсчитывали с помощью Vi-Cell. Суспензию пан-Т-клеток смешивали с опухолевыми клетками при соотношении эффектора к мишени 5:1, промывали и ресуспендировали при 0,55 клеток E6/мл. 20 мкл суспензии смешанных клеток добавляли в планшет, содержащий титрованные варианты. Планшеты инкубировали в течение 48 ч в инкубаторе при 37°C с 5% углекислого газа. Затем образцы подвергали многопараметрическому анализу цитотоксичности, а супернатанты собирали для анализа на IFNγ.

**Многопараметрический анализ цитотоксичности**

**[00369]** Для визуализации ядер и оценки жизнеспособности клетки окрашивали Hoechst33342. 10 мкл Hoechst33342 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) разбавляли в среде 1:1000, добавляли к клеткам через 48 часов и инкубировали еще 1 час при 37°C. Затем планшет подвергали многопараметрическому анализу изображений на CellInsight CX-5 (ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) для того, чтобы отличить и количественно определить жизнеспособные и мертвые опухолевые клетки, а также эффекторные клетки. Планшет сканировали на приборе для многопараметрического анализа CellInsightCX5 с использованием приложения SpotAnalysis.V4 Bioapplication со следующими настройками: Объектив: 10x, канал 1 — 386 нм: Hoechst (фиксированное время экспозиции 0,008 мс с коэффициентом усиления 2).

**Количественная оценка IFNγ**

**[00370]** Для количественного определения IFNγ в 384-луночных покрытых стрептивидином планшетах MSD U-PLEX Single-Spot Assay MULTI-ARRAY (планшеты MA6000 384 SA, Meso Scale Diagnostics, Роквилл, штат Мэриленд) блокировали 50 мкл

DILUENT 100, запечатывали и инкубировали при комнатной температуре при встряхивании (800 об/мин) в течение 30 мин. По окончании инкубации содержимое всех лунок аспирировали. Биотинилированное захватывающее антитело IFNγ добавляли к Diluent 100 в соотношении 1:16,5, и в каждую лунку блокированного планшета добавляли 10 мкл раствора захватывающего антитела. Планшеты запечатывали и инкубировали при 4°C в течение ночи. На следующий день замороженные супернатанты из анализа совместного культивирования оттаивали на влажном льду. Планшеты промывали и в каждую лунку добавляли 5 мкл разбавителя 43, а затем 5 мкл размороженного образца супернатанта или стандарта. Планшеты запечатывали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа при встряхивании (800 об/мин). После инкубации планшеты промывали и в каждую лунку добавляли 10 мкл меченного SULFO-TAG детектирующего антитела, разбавленного 1:1000 в DILUENT 3. Планшет закрывали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа при встряхивании (800 об/мин). После инкубации планшет промывали и в каждую лунку добавляли по 40 мкл буфера для считывания MSD GOLD. Планшет считывали на приборе MESO SECTOR R600 (Meso Scale Diagnostics, Роквилл, штат Мэриленд).

**Количественное определение рецепторов PD-L1 и Her2**

**[00371]** Количественную оценку рецепторов Her2 и PD-L1 проводили с помощью проточной цитометрии с использованием наборов Quantum Simply Cellular против человеческого и мышиного IgG, соответственно (Bangs Laboratories,Фишерс, штат Индиана). Опухолевые клетки промывали PBS (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) и собирали с помощью TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс). Клетки подсчитывали с использованием Vi-Cell (Beckman Coulter, Индианаполис, штат Индиана), промывали и ресуспендировали в буфере для FACS - PBS, содержащем 2% FBS (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) в количестве 4×10^6 клеток/мл. 25 мкл суспензии опухолевых клеток в трех повторностях добавляли в 96-луночный планшет с V-образным дном (Sarstedt AG, Нюмбрехт, Германия). Анти-Her2-AF647 (трастузумаб, моновалентное антитело, Zymeworks, Ванкувер, Британская Колумбия), анти-PDL1-APC (клон MIH1, BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния) или нерелевантное отрицательное контрольное антитело IgG-AF657 (Zymeworks, Ванкувер, Британская Колумбия) в концентрации 15 мкг/мл добавляли в лунки и пробирки Эппендорфа (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), содержащие частицы

Quantum Simply Cellular IgG (античеловеческие или антимышиные) и контрольные частицы. Клетки и частицы инкубировали с антителами в течение 1 часа при 4°C в темноте. Клетки и частицы промывали, ресуспендировали и анализировали с помощью проточной цитометрии. Для анализа была построена стандартная кривая с использованием электронной таблицы, предоставленной Bangs Laboratories (Фишерс, штат Индиана) для конкретной партии частиц, а поверхностная антигенсвязывающая способность (ABC) была получена путем ввода средних геометрических значений для популяций клеток с использованием той же электронной таблицы. Значения ABC представляют количество молекул рецептора, экспрессированных на клеточной поверхности, предполагая модель моновалентного связывания. Стандартная кривая, определяющая диапазон для уверенного определения количества рецепторов, варьировала от 3500 рецепторов/клетку до 330000 рецепторов/клетку для Her2 и от 4400 рецепторов/клетку до 630000 рецепторов/клетку для PD-L1.

***Результаты***

**[00372]** Маскирующие эффекты, наблюдаемые для вариантов CD3 x Her2 Fab x scFv Fc при связывании с CD3 в Примере 6, были воспроизведены, когда те же самые образцы исследовали на предмет функции в анализе TDCC с Her2-экспрессирующими клетками JIMT-1 (Фиг. 7). В то время как незазамаскированный вариант (30421) демонстрировал сильное уничтожение опухолевых клеток при низких концентрациях варианта, активность замаскированного, нерасщепляемого варианта (30423) была снижена в 49000 раз. Полностью замаскированный вариант с расщепляемым фрагментом PD-L1 на легкой цепи (30430) также снижал активность без обработки uPa в 5800 раз. Это несоответствие в маскировке между нерасщепляемым и расщепляемым вариантами также наблюдалось в отношении связывания с CD3 (Пример 6). Когда маска была расщеплена uPa, активность 30430 вернулась к таковой у варианта без маски (30421). Контрольный вариант с только фрагментом PD-1 присоединенной маски (31929) показал эффективность, аналогичную 30421 и обработанному uPa 30430. Нерелевантное антитело против респираторно-синцитиального вируса (RSV) (22277) не продемонстрировало активации Т-клеток для уничтожения опухолевых клеток.

**[00373]** TDCC с использованием JIMT-1 в качестве положительной по Her2 и PD-L1 линии клеток повторяли и расширяли до 3 других линий клеток с разными уровнями этих рецепторов и с использованием другого донора Т-клеток, чем в предыдущем эксперименте. Данные о цитотоксичности для двух повторов показаны на Фиг. 23. Уровни цитокина IFNγ также отслеживали как косвенный показатель иммунной активации Т-клеток для повтора

n=1 (Фиг. 24). Количество рецепторов определяли для всех используемых линий клеток, и они показаны на Фиг. 25. Активность немеченого контроля (30421) была определена в диапазоне от 0,03 пМ (HCC1954: высокий Her2, высокий PD-L1) до 3 пМ (MCF-7: средний Her2, низкий PD-L1) для цитотоксичности различных линий клеток. Активность этого незамаскированного контроля, определяемая по высвобождению IFNγ, составляла от 8,4 пМ (HCC1954: высокий уровень Her2, высокий уровень PD-L1) до 50 пМ (HCC829: низкий уровень Her2, средний уровень PD-L1). Маскировка, измеренная по увеличению EC50 для нерасщепляемых (30423) и расщепляемых (30430) замаскированных вариантов, была подтверждена для всех линиях клеток и варьировалась от 72 до >450 раз в показателе цитотоксичности и от 8,2 до >350 раз в показателе IFNγ. Вариант, в котором к тяжелой цепи присоединен только фрагмент PD-1 (31929), расщепляемый замаскированный вариант после обработки uPa (30430 +uPa), а также комбинация незамаскированного контроля и насыщающего количества антитела к PD-L1 (30421 + 120 нМ атезолизумаба) продемонстрировали более высокую активность (в 0,019-0,84 раза ниже EC50 в отношении цитотоксичности) по сравнению с незамаскированным контролем (30421) для линий клеток со значительной экспрессией PD-L1 (HCC1954, JIMT-1, HCC827) благодаря их способности также взаимодействовать с PD-L1. Линия клеток с очень низкой экспрессией PD-L1 (MCF-7) не показала значительной дифференциации в показателях цитотоксичности между незамаскированным контролем (30421) и вариантами, способными взаимодействовать с PD-L1 (31929, 30421 + 120 нМ атезолизумаб, 30430 +uPa). Однако эти варианты с фрагментом анти-PD-L1 показали более высокую активность в отношении высвобождения IFNγ для всех протестированных линий клеток по сравнению с незамаскированным контролем (30421). Нерелевантное антитело к RSV (22277) не показало активности в TDCC ни для одной из линий клеток.

## ПРИМЕР 8 АНАЛИЗ СВЯЗЫВАНИЯ PD1 И PD-L1 ЗАМАСКИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ АНТИ-CD3

**[00374]** В качестве показателя биологической активности фрагментов PD-1 и PD-L1, используемых в качестве маскирующего домена, связывание модифицированных вариантов с клетками CHO, экспрессирующими PD-L1 и PD-1, определяли следующим образом.

***Способы***

**Трансфекция клеток CHO**

**[00375]** Клетки CHO-S (Национальный научно-исследовательский совет Канады) культивировали в среде для экспрессии FreeStyle CHO (Thermo Fisher Scientific, Уолтем,

штат Массачусетс) с 1% фетальной бычьей сывороткой (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс). Для проведения трансфекции использовали систему Neon Transfection (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс). Клетки CHO-S подсчитывали и промывали 2 раза PBS и один раз в буфере для ресуспендирования R (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) перед ресуспендированием в концентрации 100 клеток E6/мл. Добавляли плазмидную ДНК PD-1, PDL-1 или GFP (GenScript, Пискатауэй, штат Нью-Джерси) в количестве 1 мкг/1 клетку E6. Трубку Neon заполняли 3 мл электролитического буфера E2 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс). С использованием наконечника Neon объемом 100 мкл (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) для каждой плазмиды проводили трансфекцию при следующих настройках: напряжение – 1620, ширина – 10, импульс – 3. Трансфицированные клетки переносили в предварительно нагретую колбу в концентрации 1 клетка E6/мл для каждого условия.

**Связывание PD1/PDL1 с помощью проточной цитометрии**

**[00376]** Варианты, очищенные в Примере 2, и обработанные uPa в примере 5, титровали непосредственно в 96-луночном планшете с V-образным дном (VWR, Рэднор, штат Пенсильвания, США) от 200 нМ при разведении 1:3. Клетки CHO-PD1, CHO-PDL-1 и CHO-GFP размораживали и промывали в среде RPMI 1640 (A1049101, модификация ATCC) (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс, США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) и ресуспендировали в буфере для FACS (PBS + 2% FBS). Каждую из клеток CHO-PD1 и CHO-PDL-1 объединяли 2:1 с клетками CHO-GFP и добавляли 20 мкл клеточной суспензии в планшет с титрованными вариантами. Клетки инкубировали с вариантами при 4°C в течение 1 часа. После инкубации клетки промывали 2 раза буфером для FACS и 1 мкг/мл козьего вторичного антитела AF647 к Fc IgG человека (Jackson ImmunoResearch, Уэст-Гроув, штат Пенсильвания, США) вместе с 1000-кратно разбавленным красителем для оценки жизнеспособности (Biolegend, Сан-Диего, штат Калифорния, США) добавляли в лунки. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Клетки дважды промывали буфером для FACS и ресуспендировали в 50 мкл буфера для FACS.

**[00377]** Для считывания результатов анализа среднее геометрическое значение флуоресценции APC измеряли с помощью проточной цитометрии на приборе BD LSRFortessa (BD Life Sciences, Гуруграм, Индия). Неспецифическое связывание определяли путем измерения флуоресценции APC. Среднее геометрическое GFP-положительных клеток. Графики были созданы с использованием GraphPad Prism версии 8.1.2 для Mac OS

X (GraphPad Software, Ла-Хойя, Калифорния, США).

***Результаты***

**[00378]** Как показано на Фиг. 8, связывание с PD-L1 (A) или PD-1 (B) не наблюдалось для замаскированных вариантов (30423, 30426, 30430, 30436) без обработки uPa (-uPa). Варианты только с фрагментом PD-1 или PD-L1 с созревшей аффинностью, присоединенным либо к тяжелой, либо к легкой цепи, показали связывание с IC50 0,3 нМ и 6 нМ, соответственно. Нерасщепляемые варианты (30423, 30426) не связывались с PD-L1 или PD-1 при обработке протеазой (+uPa), тогда как частичное связывание было восстановлено для образцов, обработанных uPa, которые содержат последовательность расщепления uPa между Fab и маской PD-1:PD-L1. В частности, связывание с PD-L1 было частично восстановлено для 30430, в пределах 53 раз по сравнению с соответствующим контролем с односторонней маской 31929 (A). Связывание с PD-1 было частично восстановлено для 30436, в пределах 12-кратного увеличения по сравнению с контрольным образцом 31931 с односторонней маской (B). Это согласуется с идентичностью иммуномодулятора, который был разработан так, чтобы оставаться на этих вариантах при расщеплении протеазой (PD-1 на 30430, PD-L1 на 30436). Вариант без маски на основе PD-1:PD-L1 (30421) и нерелевантный контроль (22277) не продемонстрировали связывания с PD-L1 или PD-1, как и ожидалось. В отдельном эксперименте с использованием JIMT-1 в качестве клеток-мишеней вариант с нефункциональным доменом PD-1, присоединенным к тяжелой цепи (32497), показал снижение активности TDCC (55-кратная $EC_{50}$, Фиг. 33) по сравнению с незамаскированным контролем (v30421), в то время как эквивалентный вариант с функциональным PD-1 (31929) продемонстрировал повышенную эффективность TDCC (0,2-кратная $EC_{50}$) по сравнению с незамаскированным контролем (v30421), который наблюдался ранее.

## ПРИМЕР 9 ИССЛЕДОВАНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ МАСКИ PD-1 В АНАЛИЗЕ РЕПОРТЕРНОГО ГЕНА ГИБРИДА PD-1/PD-L1

**[00379]** Чтобы исследовать блокирование взаимодействия контрольной точки PD-1: PD-L1 фрагментом PD-1 маски в дополнение к функции взаимодействия вариантов с T-клетками, был проведен специально разработанный анализ репортерного гена гибрида PD-1/PD-L1 (RGA) выполняли следующим образом.

***Способы***

**[00380]** JIMT-1 (Институт Лейбница, Брауншвейг, Германия), культивируемые в питательной среде, состоящей из среды DMEM (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат

Массачусетс) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), HCC1954 (ATCC, Манассас, штат Вирджиния), и HCC827 (ATCC, Манассас, штат Вирджиния), культивируемые в питательной среде, состоящей из модификации RPMI-1640 ATCC (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, MCF-7 (ATCC, Манассас, штат Вирджиния), культивируемые в питательной среде, состоящей из среды MEM (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 0,01 мг/мл человеческого рекомбинантного инсулина (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), и Т-клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие человеческий PD-1 и NFAT-индуцированную люциферазу (PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay Promega, кат. № J1250, Мэдисон, штат Висконсин), культивируемые в среде RPMI-1640 в модификации ATCC с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, культивировали в колбах T-75 или T-175 (Corning, Корнинг, штат Нью-Йорк) в инкубаторе при 37 °C с 5 % диоксида углерода до проведения анализа. В день эксперимента варианты титровали в трех повторностях при разведении 1:3 непосредственно в 384-луночные обработанные тканевой культурой плоскодонные полистироловые микропланшеты с низким фланцем (Corning, кат. № 3570, Корнинг, штат Нью-Йорк) от 150 нМ до 0,85 пМ в 20 мкл общего объема на лунку. Опухолевые клетки диссоциировали с использованием буфера для диссоциации клеток и смешивали с клетками Jurkat в соотношении 1:1 в среде RPMI 1640 с добавлением 1% эмбриональной бычьей сыворотки. 20 мкл суспензии смешанных клеток добавляли в планшет, содержащий титрованные варианты. Планшеты инкубировали в течение 16 ч при 37°C с 5% диоксида углерода. После инкубации во все лунки добавляли 40 мкл реагента Bio-Glo™ Luciferase Assay (Promega, кат. № G7940, Мэдисон, штат Висконсин), следя за тем, чтобы не образовывались пузырьки, и через 10 минут планшет считывали в режиме люминесценции на микропланшетном ридере (Biotek Synergy H1, Винуски, штат Вермонт) с коэффициентом усиления 150. Схема установки анализа показана на Фиг. 9A.

***Результаты***

**[00381]** Анализ специально разработанного RGA для исследования дополнительной функциональности маски показан на Фиг. 9B. Когда клетки обрабатывали незамаскированным вариантом, способным связывать Т-клетки и опухолевые клетки (30421), в сочетании с насыщающим количеством (150 нМ) антитела к PD-L1, наблюдался высокий ответ RGA. В то время как незамаскированное биспецифическое антитело к CD3 x Her2 могло продуктивно связывать Т-клетки и опухолевые клетки, высокие концентрации антитела к PD-L1 надежно блокировали взаимодействие с контрольной точкой PD-1:PD-

L1, что приводило к высокому сигналу при всех протестированных концентрациях вариантов. Наоборот, при обработке только незамаскированным вариантом (30421) сигнал значительно снижался из-за взаимодействия PD-1 и PD-L1 между модифицированными Т-клетками и клетками JIMT-1. Нерасщепляемые (30423) и расщепляемые (30430) замаскированные варианты, не обработанные uPa (-uPa), демонстрируют значительно сниженную активность ниже концентрации варианта 10 нМ по сравнению с незамаскированным вариантом 30421, что указывает на продуктивное ингибирование функциональности привлекающего Т-клетки активатора за счет стерического блокирования паратопа CD3. Образец 30430, не обработанный uPa, более эффективно вызывал ответ RGA, чем 30423. При обработке uPa (+uPa) расщепляемый замаскированный вариант (30430) проявлял активность в RGA, которая была выше, чем у незамаскированного контроля (30421) при концентрациях варианта выше 100 пМ, что также указывает на демаскирование паратопа CD3 как блокирование взаимодействия контрольной точки PD-1:PD-L1 с помощью функционального фрагмента PD-1 из маски, оставшейся на варианте после расщепления. В соответствии с этим открытием, контрольный образец, содержащий только домен PD-1, присоединенный к тяжелой цепи Fab к CD3, показал аналогичный профиль и повышенную активность в RGA при концентрациях вариантов выше 100 пМ по сравнению с незамаскированным контролем (30421). Нерелевантное антитело к RSV (22277) не показало активности в RGA.

**[00382]** RGA с использованием JIMT-1 в качестве положительной по Her2 и PD-L1 линии клеток повторяли и расширяли до 3 других линий клеток с разными уровнями этих рецепторов, как определено в Примере 7. Данные для проведенного в данном документе RGA показаны на Фиг. 26. Маскировка, измеренная по увеличению EC50 для нерасщепляемых (30423) и расщепляемых (30430) замаскированных вариантов, была подтверждена для всех линиях клеток и варьировалась от 4 до 530 раз по сравнению с незамаскированным контролем (30421). В то время как активность этого незамаскированного контроля (30421) была сопоставима для линий клеток (EC50 = 20-50 пМ), варианты, протестированные на линиях клеток с более низким количеством рецепторов Her2 и/или PD-L1 (HCC827 и MCF-7), показали более сильную маскировку, чем на тех, у которых экспрессия рецептора выше (HCC1954 и JIMT-1). После обработки uPa (+uPa) расщепляемый замаскированный вариант (30430) восстанавливал активность в пределах от 1,7 до 3,6 раз по сравнению с незамаскированным контролем. Вариант, в котором к тяжелой цепи присоединен только фрагмент PD-1 (31929), расщепляемый замаскированный вариант после обработки uPa (30430 +uPa), а также комбинация

незамаскированного контроля и насыщающего количества антитела к PD-L1 ( 30421 + 120 нМ атезолизумаба) продемонстрировали более высокую эффективность (в 1,6-3,3 раза выше максимального значения RLU) для линий клеток со значительной экспрессией PD-L1 (HCC1954, JIMT-1, HCC827) благодаря их способности также взаимодействовать с PD-L1. В линиях клеток с высокой экспрессией TAA и PD-L1 (HCC1954, JIMT-1) также наблюдали более высокую активность этих вариантов (от 0,2 до 0,4 раза в EC50). Линия клеток с очень низкой экспрессией PD-L1 (MCF-7) не показала различий для незамаскированного контроля (30421) и вариантов, способных взаимодействовать с PD-L1 (31929, 30421 + 120 нМ атезолизумаба, 30430 +uPa). Нерелевантное антитело к RSV (22277) не показало активности в RGA ни для одной из линий клеток.

## ПРИМЕР 10 ПОЛУЧЕНИЕ ЗАМАСКИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ АНТИ-EGFR, АНТИ-МЕЗОТЕЛИНА, АНТИ-TF, АНТИ-CD19, АНТИ-CMET И АНТИ-CDH3

Чтобы исследовать применимость технологии маскировки к антителам, нацеленным на разные антигены, к вариабельным доменам мкАт, направленным против нескольких разных эпитопов, присоединяли маскирующий домен, содержащий комплекс PD-1:PD-L1. Конструкции слитых белков конструировали следующим образом.

***Способы***

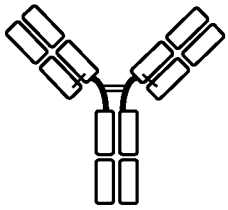
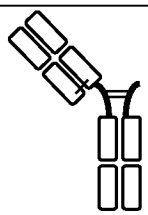
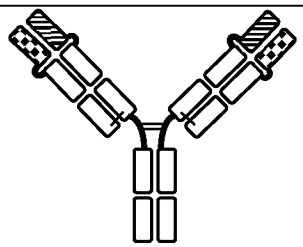
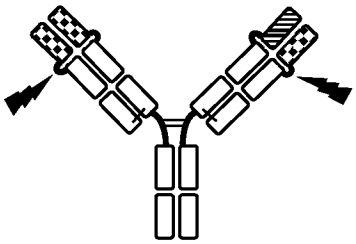
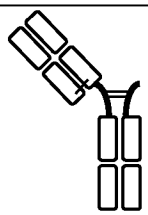
**[00383]** Белковые последовательности и модифицированных доменов IgV и доменов IgV ДТ человеческих PD-1 и PD-L1 были слиты через нерасщепляемые и расщепляемые uPa линкеры с N-концами тяжелой цепи IgG1 и легкой каппа-цепи (VL-CL), соответственно, антител, направленных против нескольких различных эпитопов (EGFR, мезотелин, TF, CD19, cMet, CDH3), как описано в Примере 1. Последовательности VL и VH и их источники описаны в таблице 2. Заметным отличием конструкций в Примере 1 является использование CH3 дикого типа (ДТ) (SEQ ID 12), что обеспечивает сборку гомодимерных, полноразмерных антител. Схема конструкции замаскированного Fab, а также предполагаемый механизм действия (MoA) показаны на Фиг. 1. На Фиг. 10 показана схема конечного дизайна, бивалентного, полностью замаскированного мкАт с двумя идентичными тяжелыми и легкими цепями. Используемые последовательности конечных вариантов перечислены в таблице B.

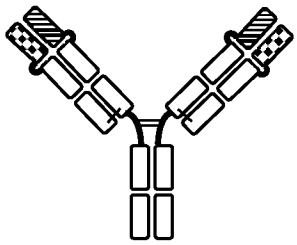
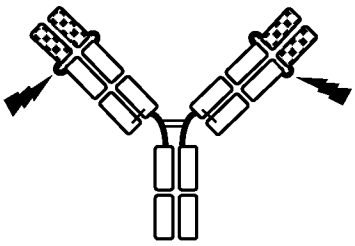
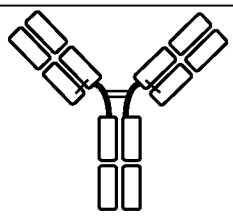
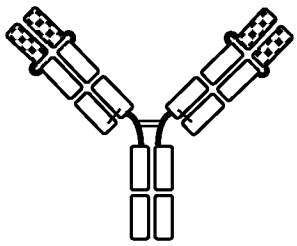
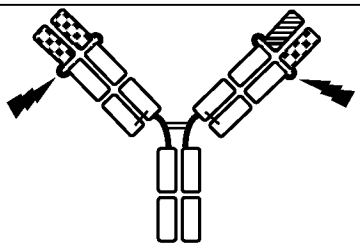
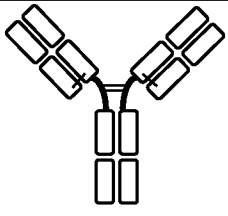
**Таблица B: Последовательности паратопов исследованы на совместимость с маской**

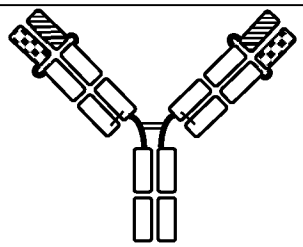
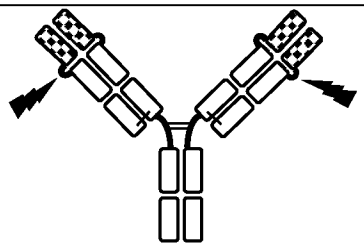
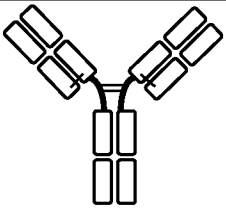
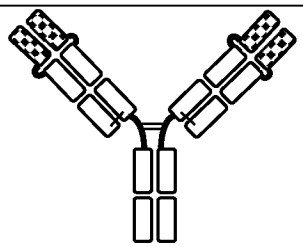
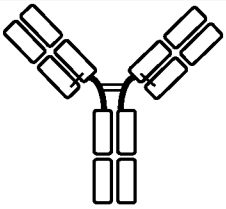
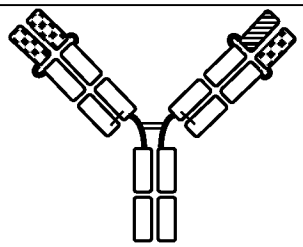
| Целевой эпитоп | Эталон | Эталон. SEQ ID | Эталон. VH SEQ ID |
|---|---|---|---|

| | | | |
|---|---|---|---|
| EGFR | US6217866B1 | 13 | 14 |
| Мезотелин | Bauss, F. *et al.* Characterization of a re-engineered, mesothelin-targeted Pseudomonas exotoxin fusion protein for lung cancer therapy. *Mol Oncol* **10**, 1317-1329, doi:10.1016/j.molonc.2016.07.003 (2016). | 15 | 16 |
| TF | Presta, L. *et al.* Generation of a humanized, high affinity anti-tissue factor antibody for use as a novel antithrombotic therapeutic. *Thromb Haemost* **85**, 379-389 (2001). | 17 | 18 |
| CD19 | Gerber, H. P. *et al.* Potent antitumor activity of the anti-CD19 auristatin antibody drug conjugate hBU12-vcMMAE against rituximab-sensitive and -resistant lymphomas. *Blood* **113**, 4352-4361, doi:10.1182/blood-2008-09-179143 (2009). | 19 | 20 |
| cMet | US8741290 | 21 | 22 |
| CDH3 | Zhang, C. C. *et al.* PF-03732010: a fully human monoclonal antibody against P-cadherin with antitumor and antimetastatic activity. *Clin Cancer Res* **16**, 5177-5188, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1343 (2010). | 23 | 24 |

**Таблица C: Состав последовательности тестируемых вариантов**

| **Вариант, №** | **Упрощенное изображение** | **Описание** | **Клон H1** | **Клон L1** | **Клон H2** |
|---|---|---|---|---|---|
| **EGFR** | | | | | |
| 32474 |  | Незамаскированное мкАт к EGFR | 23567 | 3232 | |
| 16427 |  | Незамаскированное ОАА к EGFR | 10606 | 3357 | 1380 |
| 31722 |  | Замаскированное НА PD-1: PD-L1 ДТ мкАт к EGFR, нерасщепляемое | 23246 | 23247 | |
| 31723 |  | Замаскированное НА PD-1: PD-L1 ДТ мкАт к EGFR, расщепляемый PD-L1 | 23246 | 23248 | |
| **MSLN** | | | | | |
| 16417 |  | Незамаскированное ОАА к EGFR | 10564 | 10565 | 1380 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 31728 |  | Замаскированное НА PD-1: PD-L1 ДТ мкАт к MSLN, нерасщепляемое | 23253 | 23254 | |
| 31729 |  | Замаскированное НА PD-1: PD-L1 ДТ мкАт к MSLN, расщепляемый PD-L1 | 23253 | 23256 | |
| **TF** | | | | | |
| 6323 |  | Незамаскированное мкАт к TF | 2932 | 787 | |
| 31736 |  | Замаскированное НА PD-1: PD-L1 ДТ мкАт к TF, нерасщепляемое | 23261 | 23262 | |
| 31737 |  | Замаскированное НА PD-1: PD-L1 ДТ мкАт к TF, расщепляемый PD-L1 | 23261 | 23264 | |
| **CD19** | | | | | |
| 4372 |  | Незамаскированное мкАт к CD19 | 3344 | 3346 | 3345 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 31732 |  | Замаскированное HA PD-1: PD-L1 ДТ мкАт к CD19, нерасщепляемое | 23257 | 23258 | |
| 31733 |  | Замаскированное HA PD-1: PD-L1 ДТ мкАт к CD19, расщепляемый PD-L1 | 23257 | 23260 | |
| **cMET** | | | | | |
| 17606 |  | Незамаскированное мкАт к cMet | 11509 | 11462 | |
| 28647 |  | Замаскированное HA PD-1: PD-L1 ДТ мкАт к cMet, нерасщепляемое | 20859 | 20855 | |
| **CDH3** | | | | | |
| 17214 |  | Незамаскированное мкАт к CDH3 | 11274 | 10567 | |
| 28662 |  | Замаскированное HA PD-1: PD-L1 ДТ мкАт к CDH3, нерасщепляемое | 20875 | 20871 | |

**ПРИМЕР 11 ПРОИЗВОДСТВО ЗАМАСКИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ АНТИ-EGFR, АНТИ-МЕЗОТЕЛИНА, АНТИ-TF, АНТИ-CD19, АНТИ-CMET И АНТИ-CDH3**

**[00384]** Последовательности модифицированных вариантов, сконструированных в Примере 10, клонировали в векторы экспрессии, экспрессировали и очищали следующим

образом.

***Способы***

**[00385]** Последовательности тяжелой и легкой цепей модифицированных вариантов, направленных против нескольких различных эпитопов (EGFR, MSLN, TF, CD19, cMet, CDH3) из Примера 10, трансфицировали в клетки Expi293F™ в равном молярном соотношении и иным образом экспрессировали и очищали, как описано в Примере 2.

***Результаты***

**[00386]** Препаративную ЭХ, как описано в Примере 2, использовали для получения образцов высокой чистоты. Выход после препаративной ЭХ варьировали от 1,5 до 6 мг на вариант. Чистоту образца оценивали, как описано в Примере 12.

## ПРИМЕР 12 ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЗАМАСКИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ АНТИ-EGFR, АНТИ-МЕЗОТЕЛИНА, АНТИ-TF, АНТИ-CD19, АНТИ-CMET И АНТИ-CDH3

**[00387]** Очищенные образцы из Примера 10 оценивали на чистоту и гомогенность образцов с помощью СВЭЖХ-ЭХ и ДСН-ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих условиях, как описано ниже.

***Способы***

**[00388]** Для ДСН-ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих условиях 2 мкл образца разбавляли 10 мкл PBS, а затем смешивали с 4 мкл 4X буфера Лэммли (BioRad, Геркулес, штат Калифорния). Затем образцы нагревали в течение 5 минут при 95 °C и обрабатывали на 4-20% сборных гелях mini-PROTEAN (BioRad, Геркулес, штат Калифорния) в предоставленном буфере Трис/глицин/ДСН перед окрашиванием Кумасси G-250, обесцвечиванием и визуализацией. СВЭЖХ-ЭХ и КЭ-ДСН в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях проводили, как описано в Примере 3.

***Результаты***

**[00389]** Кривые СВЭЖХ-ЭХ для образцов после препаративной ЭХ на Фиг. 11A-J показали гомогенные образцы, которые содержали 85%-98% правильных соединений. Наличие небольшого пика при малом времени удерживания по сравнению с основными частицами указывает на присутствие небольших количеств высокомолекулярных соединений, таких как олигомеры и агрегаты, во всех образцах. Эти высокомолекулярные соединения были более распространены в образцах, нацеленных на CD19 и EGFR, по сравнению с образцами, нацеленными на MSLN, TF, c-Met и CDH3.

**[00390]** Анализ методом ДСН-ПААГ-электрофореза и КЭ-ДСН в невосстанавливающих

условиях (Фин. 11K, L) показал одно преобладающее соединение для всех вариантов. Примечательно, что кажущаяся молекулярная масса этого соединения значительно выше, чем можно было бы ожидать (> 250 кДа против 200 кДа). КЭ-ДСН в невосстанавливающих условиях репрезентативных вариантов, направленных против c-Met и CDH3, показал только полосы, соответствующие интактным тяжелым и легким цепям. Они демонстрируют такую же высокую кажущуюся молекулярную массу, как описано в Примере 3. Гликозилирование фрагментов PD1 и PD-L1 в конструкциях, вероятно, вызывает увеличение кажущейся молекулярной массы (Tan, S. *et al.* An unexpected N-terminal loop in PD-1 dominates binding by nivolumab. *Nat Commun* **8**, 14369, doi:10.1038/ncomms14369 (2017), Li, C. W. *et al.* Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nat Commun* **7**, 12632, doi:10.1038/ncomms12632 (2016)).

## ПРИМЕР 13 РАСЩЕПЛЕНИЕ UPA ЗАМАСКИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ АНТИ-EGFR, АНТИ-МЕЗОТЕЛИНА, АНТИ-TF, АНТИ-CD19, АНТИ-CMET И АНТИ-CDH3

**[00391]** Чтобы оценить высвобождение части или всей маски из фрагментов Fab нескольких различных паратопов путем расщепления предполагаемых протеазных сайтов в линкерах, выбранные образцы, полученные в Примере 11, обрабатывали uPa *in vitro*. Реакции отслеживали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в восстанавливающих условиях следующим образом.

***Способы***

**[00392]** Препаративные анализы расщепления модифицированных вариантов, нацеленных на разные эпитопы, проводили, как описано в Примере 5, и анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих условиях. ДСН-ПААГ-электрофорез проводили, как описано в Примере 12, за исключением использования восстанавливающего буфера Лэммли для денатурации образца. Восстанавливающий буфер получали добавлением 4X буфера Лэммли с 10% β-ME.

***Результаты***

**[00393]** В то время как варианты, не содержащие последовательности расщепления uPa, не демонстрировали какой-либо реакции в тестируемых условиях, все варианты, которые включали специфичную для uPa последовательность между фрагментом PD-L1 и VL Fab, демонстрировали полное расщепление (Фиг. 12) и высвобождение домена PD-L1 из легкой цепи. Это можно увидеть по уменьшению кажущейся молекулярной массы LC до ~ 25 кДа после обработки uPa, как и ожидалось для незащищенной легкой каппа-цепи. Вероятно, из-за гетерогенного гликозилирования (Li, C. W. *et al.* Glycosylation and stabilization of

programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nat Commun* 7, 12632, doi:10.1038/ncomms12632 (2016)) и небольшой молекулярной массы (~ 13 кДа) свободный фрагмент PD-L1 не был обнаружен для вариантов, нацеленных на EGFR и TF. Слабая полоса, указывающая на соединение с кажущейся молекулярной массой 15-20 кДа, была обнаружена для MSLN и CD19.

## ПРИМЕР 14 МАСКИРОВКА/ДЕМАСКИРОВКА ВАРИАНТОВ АНТИ-EGFR, АНТИ-МЕЗОТЕЛИНА, АНТИ-TF, АНТИ-CD19, АНТИ-СМЕТ И АНТИ-CDH3

**[00394]** Целевое связывание различных пар паратоп/эпитоп оценивали с помощью ППР и проточной цитометрии на образцах, полученных в Примере 11 и обработанных uPa в Примере 13, следующим образом.

***Способы***

**Нативное связывание с помощью проточной цитометрии**

**[00395]** Различные линии раковых клеток, экспрессирующие поверхностные белки, содержащие представляющие интерес вещества (MDA-MB231, OVCAR3, MDA-MB468, Raji), культивировали в рекомендуемой культуральной среде с добавлением L-глютамина и сыворотки соответствующей концентрации (полная среда) в инкубаторе с увлажнителем + 5% CO2 при 37°C.

**[00396]** Модифицированные варианты, направленные против различных эпитопов, разбавляли в 2 раза в полной среде с последующими трехкратными серийными разведениями в полной охлажденной среде в общей сложности от восьми до десяти точек концентрации, начиная с 300 нМ или 150 нМ.

**[00397]** Все среды хранили при 4°C, и все инкубации проводили на жидком льду. В день анализа экспоненциально растущие клетки собирали с использованием теплого неферментативного раствора для диссоциации клеток, центрифугировали и ресуспендировали в полной среде при плотности клеток 2E+06 клеток/мл. 50 мкл/лунку клеток распределяли в полипропиленовый 96-луночный планшет с V-образным дном (Corning, Корнинг, Нью-Йорк, США). К клеткам добавляли равные объемы 2X тестируемых антител или контролей и инкубировали в течение 2 часов. Затем клетки дважды промывали при помощи центрифугирования и удаляли супернатанты. Обнаружение связанных вариантов достигается путем дополнительной инкубации с флуоресцентно меченым Fc-специфическим вторичным антителом (Jackson ImmunoResearch, Уэст-Гроув, штат Пенсильвания, США) в течение часа. Клетки дважды

промывали при помощи центрифугирования, а клеточные осадки ресуспендировали в полной среде с йодидом пропидия (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния, США), фильтровали с использованием 96-луночного фильтрующего планшета с размером пор 0,60 мкм (MilliporeSigma, Берлингтон, штат Массачусетс, США) и анализировали методом проточной цитометрии с использованием автоматического пробоотборника HTS (устанавливается на BD-LSRII или BD-LSRFortessa). На образец было получено две тысячи событий в виде живых/отдельных клеток.

**[00398]** Удельную СИФ рассчитывали для каждой точки образца путем вычитания значения СИФ отрицательного контроля (фон). Кривые связывания (удельную СИФ по сравнению с линейной или логарифмической концентрацией антител) аппроксимировали с помощью GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Ла-Хойя, штат Калифорния, США) с использованием модели аппроксимации кривой нелинейной регрессии с четырьмя параметрами для одного участка с угловым коэффициентом Хилла для определения значений Bmax и кажущихся значений Kd для каждого исследуемого соединения.

**ППР**

**[00399]** Анализы связывания методом ППР (поверхностный плазмонный резонанс) для определения кинетики и аффинности подмножества различных антигенов (EGFR, TF, мезотелин) к модифицированным вариантам мкАт проводили на приборе Biacore™ T200 (GE Healthcare, Миссиссога, Онтарио, Канада) с рабочим буфером PBS-T (PBS + 0,05% (об./об.) Tween 20, pH 7,4) при температуре 25 °C. Сенсорный чип CM5 Series S, набор иммобилизации по аминогруппе Biacore (NHS, EDC и 1 M этаноламин) и 10 мМ буфер ацетата натрия были все приобретены в GE Healthcare. Рабочий буфер PBS с 0,05 % (об./об.) Tween 20 (PBS-T) был приобретен у Teknova Inc. (Холлистер, штат Калифорния). Козьи поликлональные антитела к Fc человека были приобретены в Jackson Immuno Research Laboratories Inc. (Уест-Гроув, штат Пенсильвания). Рекомбинантный белок внеклеточного домена EGFR человека (Genscript, кат. № Z03194-50) и зрелый мезотелин человека (R&D Systems, кат. № 3265-MS-050) были приобретены и очищены с помощью ЭХ перед анализом методом ППР для обеспечения чистоты и гомогенности аналитов. Рекомбинантный белок TF человека экспрессировали в клетках HEK293 и очищали с помощью анионного обмена (Q Sepharose HP, GE Healthcare) с последующей очисткой ЭХ перед использованием в ППР.

**[00400]** Скрининг вариантов мкАт на связывание с различными антигенами происходил

в две стадии: непрямой захват вариантов мкАт на поверхности с поликлональным антителом, специфичным к человеческому Fc, с последующей инъекцией пяти концентраций очищенного с помощью ЭХ антигена. Поверхность с антителом к Fc человека была приготовлена на сенсорном чипе CM5 Series S стандартными методами аминного сочетания, как описано производителем (GE Healthcare). Вкратце, сразу же после активации EDC/NHS вводили раствор 25 мкг/мл антитела к Fc человека в 10 мМ NaOAc, pH 4,5, со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 7 минут, пока приблизительно 4500 резонансных единиц (RU) не были иммобилизованы на всех четырех проточных ячейках. Оставшиеся активные группы гасили инъекцией 1 М этаноламина со скоростью 10 мкл/мин в течение 7 мин. мкАт для анализа захватывали непрямым способом на поверхностях с анти-Fc (проточные кюветы 2–4) путем введения растворов 2–20 мкг/мл со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 60 с, в результате чего уровни захвата мкАт находились в диапазоне от 130 до 470 RU в зависимости от варианта мкАт. Используя кинетику одиночного цикла, пять концентраций серии двукратных разведений антигенов последовательно вводили со скоростью 40 мкл/мин во все проточные кюветы, включая эталонную проточную кювету 1, а инъекция холостого буфера во все проточные кюветы служила контролем. Для получения подробной информации о диапазонах концентраций и времени контакта, и диссоциации аналитов см. таблицу 53. Поверхности с антителом к Fc человека регенерировали для подготовки к следующему циклу инъекции одним импульсом 10 мМ глицина/HCl, pH 1,5, в течение 120 с при 30 мкл/мин. Сенсограммы с вычитанием двух эталонных сигналов анализировали с использованием оценочного программного обеспечения Biacore™ T200 Evaluation версии 3.0, а затем аппроксимировали к модели связывания Ленгмюра 1:1.

**Таблица D: Параметры аналита по ППР**

| **Аналит** | **Диапазон концентраций [нМ]** | **Время контакта [с]** | **Время диссоциации [с]** |
|---|---|---|---|
| EGFR | 2,5 - 40 | 180 | 300 |
| TF | 0,125 - 2 | 300 | 1800 |
| Мезотелин | 0,125 – 2 / 1,25 - 20 | 300 / 180 | 1800 |

***Результаты***

**[00401]** На Фиг. 13 показано, что связывание антигена для всех нерасщепляемых вариантов (варианты 31722, 31728, 31736, 31732, 28647, 28664 для EGFR, MSLN, TF, CD19, cMet, CDH3, соответственно) было снижено в 30-190 раз по сравнению с

соответствующими незамаскированными контролями (вариантами 32474, 16417, 6323, 4372, 17606, 17214 для EGFR, MSLN, TF, CD19, cMet, CDH3, соответственно), как определено исследованиями связывания на клетках. Там, где были включены расщепляемые варианты, образцы тестировали без (-uPa) и с обработкой uPa (+uPa). В то время как нерасщепляемые варианты (31722, 31728, 31736, 31732 для EGFR, MSLN, TF, CD19, соответственно) показали лишь незначительные различия между нерасщепленными и обработанными uPa образцами, расщепляемые образцы (31723, 31729, 31737, 31733 для EGFR, MSLN, TF, CD19, соответственно) значительно восстановили связывание при обработке uPa. В частности, уровни связывания были аналогичны нерасщепляемым вариантам до воздействия протеазы, в то время как после расщепления uPa связывание восстанавливалось в пределах 1,3-85 раз по сравнению с незамаскированным контролем. Там, где это возможно (EGFR, TF, мезотелин), результаты связывания по ППР демонстрируют те же тенденции маскировки и восстановления связывания после расщепления.

## ПРИМЕР 15 ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЗАМАСКИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ АНТИ-EGFR

**[00402]** Для исследования в клеточном анализе влияния маски на функцию нацеленных на EGFR вариантов, полученных в Примере 11, обработанных uPa в Примере 13 и протестированных на связывание с мишенью в Примере 14, исследование ингибирования роста на клетках NCI-H292 проводили следующим образом.

***Способы***

**[00403]** Для этого анализа клетки NCI-H292, как правило, выращивали в колбах на 75 $см^2$ (T75) при 37°C +5% $CO_2$ и дважды в неделю пассировали в культуральной среде с FBS без добавления антибиотика. Клетки высевали за сутки до добавления антител по 300, 1000 и 125 клеток/25 мкл/лунку в 384-луночные планшеты (Corning 3570) в свои питательные среды с добавлением 1000 ЕД пенициллина, 1000 мкг стрептомицина и 2,5 мкг амфотерицина B на мл. В день анализа антитела и контроли серийно разбавляли по 11-точечным кривым доза-реакция при 6-кратном увеличении желаемых конечных концентраций, затем добавляли к высеянным клеткам для конечных инкубационных концентраций, описанных в Таблице 5: «Диапазоны концентраций вариантов». Их влияние на пролиферацию клеток измеряли через 5 дней инкубации при 37°C, 5% $CO_2$. Инкубацию с нерелевантным антителом (22277) использовали для оценки нецелевой цитотоксичности. Жизнеспособность клеток определяли с помощью CellTiterGlo™ (Promega, Мэдисон) на основе количественного определения АТФ, присутствующего в каждой лунке, что

свидетельствует о наличии метаболически активных клеток. Выход сигнала измеряли на люминесцентном планшетном ридере (Envision, Perkin Elmer), установленном на время интеграции 0,1 сек. Время интеграции регулируется для минимизации насыщения сигнала при высокой концентрации АТФ.

**[00404]** Данные, выраженные как относительная единица люминесценции (RLU), нормированы на необработанные контрольные лунки и выражены как % выживаемости, рассчитанный по формуле:
% выживаемости = RLU Ат / RLU «без обработки» X 100.

**[00405]** Используя программное обеспечение GraphPad Prism, были построены кривые доза-реакция для измерения эффективности (максимальная насыщаемая реакция ингибирования роста, наблюдаемая при высоких концентрациях) и эффективности (относительная IC50, концентрация, необходимая для достижения полумаксимальной эффективности).

**[00406]**

**Таблица E: Диапазоны концентраций вариантов**

| **Образцы** | **Концентрация вариантов** |
|---|---|
| Тестируемые образцы (31722, 31722 +uPa, 31723, 31723 +uPa) | 825нМ - 0,0008нМ |
| Контроли (32474, 32474 +uPa, 22277, 22277 +uPa) | 1000нМ - 0,001нМ |

***Результаты***

**[00407]** Как показано на Фиг. 14, антитело к EGFR на основе цетуксимаба (32474) ингибировало рост клеток NCI-H292 с IC50 0,11 нМ. Обработка uPa минимальна влияла на эту функцию. Замаскированные PD-1:PD-L1 варианты (31722, 31723) были менее активны (IC50 в 40-80 раз выше) без обработки uPa. При обработке uPa, в то время как функция нерасщепляемого варианта 31722 все еще значительно подавлялась (в 100 раз), функция расщепляемого варианта 31723 восстанавливалась в пределах 2,5 раз по сравнению с незамаскированным v32474. Нерелевантное антитело (22277) не показало никакой активности в тесте ингибирования роста

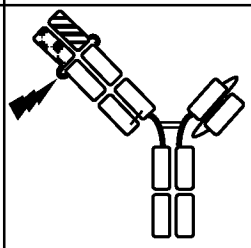
## ПРИМЕР 16 ПАРЫ РЕЦЕПТОРОВ ЛИГАНДОВ СЕМЕЙСТВА B7:CD28 В КАЧЕСТВЕ МАСОК – CTLA4:CD80

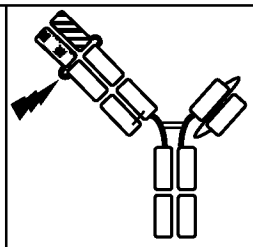
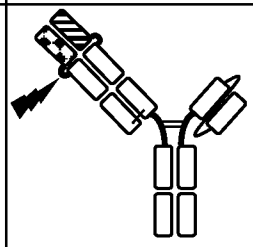
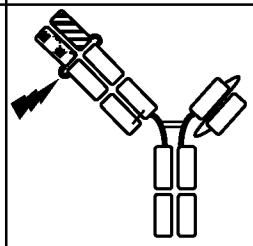
**[00408]** Чтобы определить, могут ли другие члены семейства B7:CD28 использоваться для эффективной маскировки Fab, была получена замаскированная CTLA4:CD80 версия антитела CD3 x Her2 Fab x scFv Fc из Примера 1 и оценена на связывание с CD3 следующим образом.

***Способы***

**[00409]** Маскированный CTLA4:CD80 Fab к CD3 был разработан таким образом, чтобы он был эквивалентен замаскированным PD1:PD-L1 вариантам в Примере 1. Вкратце, последовательности доменов IgV CD80 и CTLA4 человека (West, S. M. & Deng, X. A. Considering B7-CD28 as a family through sequence and structure. *Exp Biol Med (Maywood)*, 1535370219855970, doi:10.1177/1535370219855970 (2019); SEQ ID 25, 26) присоединяли к N-концам тяжелой и легкой цепей Fab к CD3, соответственно, с использованием одной из комбинаций линкеров, описанных в Примере 1 и Примере 10. В частности, домен IgV CTLA4 был слит с LC с последовательностью, расщепляемой uPa, в то время как фрагмент CD80 не мог быть удален протеазой. Схема архитектуры исследуемого варианта показана на Фиг. 15. Кроме того, для снижения описанной ранее гомодимеризации через CD80 (C. C. Stamper *et al.*, Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature* **410**, 608-611 (2001)) в некоторые варианты были введены мутации во фрагмент CD80. Последовательности отдельных цепей варианта перечислены в таблице F. Получали антитела, оценивали чистоту их образца и расщепление uPa, а связывание с клетками Jurkat, имеющими CD3, оценивали, как в Примере 2, Примере 3, Примере 5 и Примере 6, соответственно.

**Таблица F: Состав последовательности протестированных вариантов***

| Вариант, № | Схема | Описание | Клон H1 | Клон L1 | Клон H2 |
|---|---|---|---|---|---|
| 30444 |  | Замаскированный CTLA4 ДТ:CD80 ДТ CD3 x Her2 Fab x scFv Fc, расщепляемый CTLA4 | 22088 | 22105 | 21490 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| `33525 |  | Замаскированный CTLA4 ДТ:mut1 CD80 CD3 x Her2 Fab x scFv Fc, расщепляемый CTLA4 | 24659 | 22105 | 21490 |
| 33526 |  | Замаскированный CTLA4 ДТ: mut2 CD80 CD3 x Her2 Fab x scFv Fc, расщепляемый CTLA4 | 24660 | 22105 | 21490 |
| 33527 |  | Замаскированный CTLA4 ДТ:mut3 CD80 CD3 x Her2 Fab x scFv Fc, расщепляемый CTLA4 | 24661 | 22105 | 21490 |

* Домен IgV CD80, присоединенный к тяжелой цепи, обозначен полосатым узором на упрощенных изображениях, а домен IgV CTLA-4, присоединенный к легкой цепи, показан клетчатым узором.

***Результаты***

**[00410]** Получение модифицированного варианта CD3 x Her2 Fab x scFv Fc, имеющего маску на основе CTLA4:CD80 (30444), дало 6,7 мг после препаративной ЭХ, что аналогично количеству эквивалентных замаскированных PD-1:PD-L1 вариантов в Примере 2. Анализ методом СВЭЖХ-ЭХ после очистки белком А (Фиг. 16А) продемонстрировал димер в качестве основного соединения, что согласуется с поверхностями гомодимеризации на CD80 и CTLA4, которые удалены от поверхности взаимодействия гетеродимера (Trang, V. H. *et al.* A coiled-coil masking domain for selective activation of therapeutic antibodies. *Nat Biotechnol* **37**, 761-765, doi:10.1038/s41587-019-0135-x (2019)). Также наблюдали значительное количество высокомолекулярных соединений, таких как агрегаты и олигомеры, и для удаления этих нежелательных частиц проводили препаративную ЭХ. СВЭЖХ-ЭХ конечного образца, очищенного с помощью ЭХ, (Фиг. 16В), показала 84 % димерных и 9 % мономерных соединений. Кроме того, все еще присутствовало 7 % соединений с высокой молекулярной массой. КЭ-ДСН в невосстанавливающих условиях (Фиг. 16С) продемонстрировал профиль, соответствующий одному преобладающему соединению со значительно более высокой молекулярной массой, чем можно было бы ожидать для интактной молекулы. Полосы для модифицированных тяжелых и легких цепей

демонстрируют значительно более высокую, чем ожидалось, кажущуюся молекулярную массу в профиле КЭ-ДСН в восстанавливающих условиях. Подобно модификациям на основе PD-1:PD-L1 в Примере 3, это, вероятно, вызвано обширным гликозилированием CD80 и CTLA4 (Stamper, C. C. *et al.* Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature* **410**, 608-611, doi:10.1038/35069118 (2001)). Когда мутации были введены в поверхность гомодимеризации фрагмента CD80, количество димерных соединений, обнаруженных в СВЭЖХ-ЭХ после очистки белком А, уменьшилось до 19–59 %, а количество мономерных соединений увеличилось до 28–66% (Фиг. 16D-F).

**[00411]** При обработке uPa фрагмент CTLA4 эффективно удалялся из легкой цепи, как показано на Фиг. 17. В этом случае полоса, соответствующая модифицированной легкой цепи, исчезала при расщеплении, и появлялась полоса, соответствующая молекулярной массе незамаскированной легкой цепи. Высвобожденный компонент CTLA4 не был обнаружен после расщепления, вероятно, из-за небольшого размера и гетерогенности, вызванной гликозилированием.

**[00412]** Оценка связывания с CD3 на клетках Jurkat оценивали с помощью ELISA, как описано в Примере 6 (Фиг. 18), и показала, что модификация на основе CD80:CTLA4 (v30444) снижала связывание с мишенью примерно в 80 раз. Это похоже на то, что наблюдается для эквивалентного варианта с маской на основе PD-1:PD-L1 (Пример 6, v30430, включенный сюда для справки). После расщепления фрагмента CTLA4 uPa связывание CD3 частично восстанавливается (в пределах ~ 4-раз от ДТ).

## ПРИМЕР 17 УСЛОВНО АКТИВНЫЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ НА ОСНОВЕ ЗАМАСКИРОВАННЫХ СЛИТЫХ БЕЛКОВ ИММУНОМОДУЛЯТОР-FC

**[00413]** Иммуномодулирующие пары (например, PD-1:PD-L1 (таблица G), CD80:CTLA-4) используются в этом примере как ненацеленные, условно активированные молекулы. Здесь иммуномодулирующие пары не выполняют маскирующей функции по отношению к конкретному паратопу, а напрямую сливаются с Fc следующим образом.

***Способы***

**[00414]** Исследуемые в данном документе конструкции основаны на доменах IgV пар иммуномодуляторов, таких как PD-1:PD-L1, которые слиты на N-конце с шарниром гетеродимерной Fc IgG. Фрагмент Fc этих конструкций содержит мутации в домене CH3, которые управляют гетеродимерным объединением двух цепей, как описано ранее (например: Von Kreudenstein, T. S. *et al.* Improving biophysical properties of a bispecific

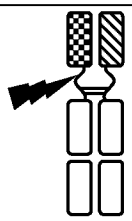
antibody scaffold to aid developability: quality by molecular design. *MAbs* **5**, 646-654, doi:10.4161/mabs.25632 (2013); SEQ ID 4,5; другие мутации, образующие гетеродимерные Fc, также доступны в литературе). В одном варианте осуществления мутации также вводят в оба домена CH2, чтобы отменить связывание с Fc-гамма-рецепторами (SEQ ID 6). В то время как один иммуномодулирующий домен IgV (например, высокоаффинная версия PD-1, Maute, R. L. *et al.* Engineering high-affinity PD-1 variants for optimized immunotherapy and immuno-PET imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E6506-6514, doi:10.1073/pnas.1519623112 (2015), SEQ ID 9) слит непосредственно с N-концом шарнира IgG, аминокислотная последовательность, которая распознается и расщепляется uPa (MSGRSANA), вводится между шарниром и другим иммуномодулирующим доменом IgV (например, PD-L1 ДТ, SEQ ID 8) на другой цепи.

**[00415]** Этот дизайн приводит к условно активной моновалентной молекуле, нацеленной на PD-L1, которая напрямую слита с Fc IgG через расщепляемый протеазой пептидный линкер (Фиг. 19). В отсутствие uPa высокоаффинный димер PD-1:PD-L1 образуется внутримолекулярно, и предотвращается нежелательное системное связывание с PD-L1. При воздействии uPa, например, в микроокружении опухоли (TME), PD-L1 высвобождается, и фрагмент PD-1 может связываться с PD-L1, экспрессируемым на опухолевых клетках. Таким образом, в TME селективно блокируется активность контрольных точек и повышается восприимчивость опухолевых клеток к цитотоксическим Т-клеткам. Другие иммунорегулирующие пары лиганд-рецептор, такие как CD80:CTLA-4 или SIRPa:CD47, также используются в качестве масок. Для CD80:CTLA-4 только в присутствии правильной ассоциированной с TME протеазы высвобождается CTLA-4, а оставшийся CD80 может связываться с CD28 или CTLA-4 на Т-клетках и, в свою очередь, проявлять свою иммуномодулирующую функцию. Для маски SIRPa:CD47 фрагмент CD47 высвобождается путем протеолитического расщепления в TME, оставляя SIRPα свободным для связывания с CD47 на макрофагах, тем самым ингибируя активность контрольной точки и усиливая фагоцитоз и уничтожение опухолевых клеток.

**[00416]** Варианты с обработкой uPa или без нее тестируют на связывание с PD-L1 с помощью проточной цитометрии, как описано в Примере 8. Те же образцы тестируют в анализе репортерного гена (RGA), чувствительном к ингибированию контрольной точки PD-1:PD-L1 (Promega, Мэдисон, штат Висконсин, США). RGA проводят аналогично RGA в Примере 9, за исключением того, что клетки CHO, экспрессирующие PD-L1 и направленные TCR, используют вместе с модифицированными Т-клетками Jurkat в

соответствии с протоколом производителей.

**Таблица G: Состав последовательности протестированных вариантов***

| **Вариант, №** | **Схема** | **Описание** | **SEQ ID H1** | **SEQ ID H2** |
|---|---|---|---|---|
| Fc1 ZW |  | HAC PD1:PD-L1 (MSGRSANA) IgG1 Fc | 28 | 29 |

* IgV PD-1 обозначен полосатым узором на упрощенных изображениях, а домен IgV PD-L1 показан клетчатым узором.

***Результаты***

**[00417]** Без обработки uPa Fc1 ZW не связывается с PD-L1 в анализе методом проточной цитометрии. Это связано с тесным внутримолекулярным взаимодействием высокоаффинной версии домена IgV PD-1 с PD-L1 в сборке Fc. При обработке uPa Fc1 ZW прочно связывает PD-L1 в анализах методом ППР и проточной цитометрии. Это ожидается, поскольку после расщепления uPa-специфичной последовательности в линкере фрагмент PD-L1 высвобождается, а домен PD-1, остающийся на Fc, свободен для связывания PD-L1 в анализах. Точно так же Fc1 ZW без расщепления uPa не проявляет активности в RGA PD-1:PD-L1, хотя проявляет устойчивую активность при обработке uPa.

## ПРИМЕР 18 ОЦЕНКА ТЕХНОЛОГИИ МАСКИРОВКИ В СИСТЕМЕ АНТИ-CD40

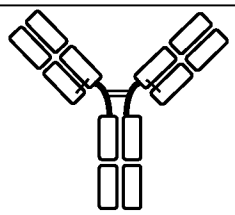
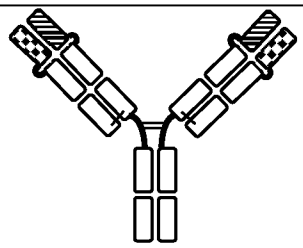
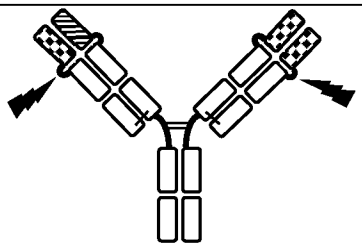
**[00418]** Маску на основе PD-1:PD-L1, описанную в примерах 1-15, наносили на паратоп, нацеленный на CD40, и качество образца полученных вариантов, связывание с мишенью и влияние маски на функцию оценивали следующим образом.

***Способы***

**Дизайн и производство варианта**

**[00419]** Замаскированные PD-1: PD-L1 версии полноразмерных антител, содержащие ранее описанный паратоп анти-CD40, (R. H. Vonderheide *et al.*, Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893, a novel CD40 agonist monoclonal antibody. *J Clin Oncol* **25**, 876-883 (2007)) конструировали, как описано в Примере 10. Полученные конструкции и их последовательности приведены в таблице H.

**Таблица H: Последовательности вариантов анти-CD40**

| Вариант, № | Упрощенное изображение | Описание | SEQ ID H1 | SEQ ID L1 |
|---|---|---|---|---|
| **CD40** | | | | |
| 32477 |  | Незамаскированное мкАт к CD40 | 23712 | 23713 |
| 32478 |  | Замаскированное HA PD-1: PD-L1 ДТ мкАт к CD40, нерасщепляемое | 23714 | 23715 |
| 32479 |  | Замаскированное HA PD-1: PD-L1 ДТ мкАт к CD40, расщепляемый PD-L1 | 23714 | 23716 |

**[00420]** Последовательности тяжелой и легкой цепей описанных вариантов переносили в векторы экспрессии, экспрессировали в клетках Expi293F™ и очищали с использованием 2-стадийного процесса очистки, описанного в Примере 11. Очищенные образцы затем оценивали на чистоту и гомогенность образцов с помощью СВЭЖХ-ЭХ и гель-электрофореза в невосстанавливающих условиях, как описано в Примере 3. После очистки образцы обрабатывали uPa, и их обработку оценивали с помощью КЭ-ДСН в невосстанавливающих условиях, как описано в Примере 5. Затем как необработанные, так и обработанные uPa образцы оценивали с помощью проточной цитометрии на предмет связывания мишени с клетками Raji, как описано в Примере 14.

**RGA CD40**

**[00421]** Для функциональной оценки необработанных uPa (-uPA) и обработанных uPa (+uPA) вариантов проводили анализ репортерного гена CD40 (RGA). Клетки HEK Blue CD40L (Invivogen, Сан-Диего, штат Калифорния, США, hkb-cd40 Lot 38-01-hkbcd40) отделяли с помощью PBS, затем ресуспендировали в концентрации 2,78 x $10^5$ клеток/мл в

предварительно нагретой среде для тестирования (Gibco™ DMEM (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс, США, 1195-040) плюс 10 % инактивированного нагреванием Gibco™ FBS (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс, США, 12483-020, партия 1996160) (56 °C, 30 мин) и 100 ед/мл пенициллина-стрептомицина Gibco™ (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс, США, 15070-063, партия 1989510)). Клетки CHOK1 ДТ (ATCC, Манассас, штат Вирджиния, США, ATCC CCL-61, партия 70014310) и FcgR2B-CHOK1 (BPS Bioscience, Сан-Диего, штат Калифорния, США, 79511, партия 191104-41) отделяли трипсином и ресуспендировали при 5,56 x $10^5$ клеток/мл со средой для тестирования. Затем 25000 клеток HEK Blue CD40 (90 мкл) добавляли к 20 мкл вариантов, серийно разведенных в среде для тестирования (10 мкг/мл – 0,000001 мкг/мл), с последующим добавлением 50000 клеток CHOK1 ДТ, FcYR2B-CHOK1 (90 мкл) или 90 мкл среды для тестирования. После инкубации в течение 20-24 часов при 37°C, 5% $CO_2$, 20 мкл супернатанта смешивали со 180 мкл раствора Quanti-Blue™ (Invivogen, Сан-Диего, штат Калифорния, США), инкубировали в течение 3 часов при 37°C, 5 % $CO_2$ и измеряли при $ОП_{620\ нм}$. Тестируемые соединения включали необработанные uPa и обработанные uPa варианты, нацеленные на CD40, а также нерелевантное контрольное антитело, направленное против RSV и CD40L (Invivogen, Сан-Диего, штат Калифорния, США), в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно.

***Результаты***

**[00422]** Как показано на Фиг. 20 A-C, после очистки ЭХ варианты анти-CD40 показали один преобладающее соединение в СВЭЖХ-ЭХ с чистотой от 92 % до 100 % с небольшим количеством более высокомолекулярных соединений (7-8 %), присутствующих в замаскированных вариантах v32478 и v32479. Анализ КЭ-ДСН в невосстанавливающих условиях (Фиг. 20D) также показало одно преобладающее соединение для всех вариантов. В то время как кажущаяся молекулярная масса основных соединений незамаскированного v32477, как и ожидалось, составляла ~ 150 кДа, замаскированные PD-1:PD-L1 варианты v32478 и v32479 показали значительно более высокую кажущуюся молекулярную массу (> 250 кДа), вероятно, из-за гликозилирования, как видно для конструкций, использующих одни и те же маскирующие домены в Примере 3 и Примере 12. КЭ-ДСН в восстанавливающих условиях (Фиг. 20D) показал два соединения с различной молекулярной массой, соответствующие тяжелым и легким цепям для всех вариантов. Для замаскированных вариантов v32478 и v32479 кажущаяся молекулярная масса как тяжелой, так и легкой цепи также была выше, чем ожидалось (~ 100 кДа против 63 кДа для HC, ~ 50 кДа против 37 кДа для LC), вероятно, из-за гликозилирования обоих PD-1 и PD-L1, как показано в Примере 3 и Примере 12.

**[00423]** Три исследованных в данном документе варианта анти-CD40 после продукции обрабатывали uPa, а расщепление контролировали путем КЭ-ДСН в восстанавливающих условиях (Фиг. 20E). В то время как v32477 и v32478 не показали каких-либо изменений при инкубации с uPa из-за отсутствия специфического сайта расщепления, процессинг наблюдали для легкой цепи v32479. Здесь фрагмент PD-L1 был удален путем расщепления специфичной для uPa последовательности в линкере между C-концом PD-L1 и N-концом домена VL. В результате были получены три фрагмента, обнаруженные в КЭ-ДСН в восстанавливающих условиях после расщепления: неизмененная замаскированная PD-1 тяжелая цепь, лишенная uPa-сайта, цепь, соответствующая VL-CL легкой каппа-цепи, и фрагмент, соответствующий высвобожденному фрагменту PD-L1.

**[00424]** Образцы с обработкой uPa и без нее тестировали на связывание с CD40 на клетках Raji с помощью проточной цитометрии. Как показано на Фиг. 20F, незамаскированный v32477 показал кривые связывания со значениями EC50, равными 1 нМ, в то время как связывание было снижено в 40-70 раз для замаскированного v32478. В обоих вариантах отсутствовал сайт расщепления uPa, и, следовательно, обработка uPa не влияла на связывание. Связывание было снижено в 14 раз для необработанного v32479, но восстанавливалось в пределах 5 раз при обработке uPa.

**[00425]** Эти тенденции были воспроизведены, когда те же образцы были исследованы на предмет их функциональности в специфичном для RGA CD40 (Фиг. 20G). В то время как v32477 продемонстрировал устойчивую независимую активность, которая могла быть дополнительно усилена FcγR2B-CHOK1, для v32478 можно было наблюдать снижение функции в 90-110 раз. Поскольку в обоих вариантах отсутствует сайт расщепления uPa, они показали одинаковую активность в эксперименте RGA с обработкой uPa или без нее. Маскировка активности, сходной с уровнем v32478, наблюдалось для v32479, не обработанного uPa (в 55 раз). Активность в 2 раза выше, чем у v32477, может быть обнаружена у v32487, обработанного uPa. Положительный контроль CD40L индуцировал активность CD40 независимо от присутствия FcγR2B, а отрицательный контроль (v22277) не мог активировать CD40 в анализе. Максимальные уровни активности, наблюдаемые для тестируемых вариантов в анализе ($B_{max}$), были выше в присутствии FcgR2B-положительной линии клеток по сравнению с отсутствием FcgR2B на вторичной линии клеток. Обработка CD40L вызывала такое же увеличение $B_{max}$ даже в отсутствие FcgR2B-положительной линии клеток.

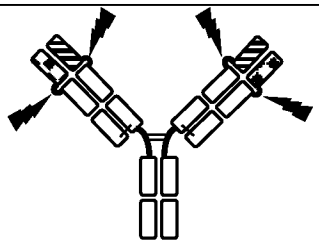
## ПРИМЕР 19: ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ПАРЫ SIRPA:CD47 КАК МАСКИ

**[00426]** Чтобы определить, можно ли использовать иммуномодулирующие пары, не относящиеся к семейству B7:CD28, для эффективной маскировки Fab, была получена замаскированная CD47:SIRPα версия антител к EGFR, описанная в примере 10, и оценена на связывание с EGFR следующим образом.

***Способы***

**[00427]** Замаскированное CD47:SIRPα антитело к EGFR, было сконструировано так, чтобы быть эквивалентным замаскированным PD1:PD-L1 вариантам, описанным в Примере 10. Вкратце, последовательности доменов IgV CD47 человека и модифицированного варианта SIRPα человека с повышенной аффинностью (K. Weiskopf *et al.*, Engineered SIRPalpha variants as immunotherapeutic adjuvants to anticancer antibodies. *Science* **341**, 88-91 (2013)) присоединяли к N-концам тяжелой и легкой цепей анти-EGFR Fab, соответственно, с использованием расщепляемых линкеров uPa, описанных в Примере 1 и Примере 10. Схема архитектуры исследуемого варианта показана на Фиг. 27. Последовательности отдельных цепей варианта перечислены в таблице I. Были получены антитела, чистоту их образцов и расщепление uPa оценивали, как в Примере 2, Примере 3 и Примере 5, соответственно. Связывание с клетками H292, имеющими EGFR, затем оценивали с помощью количественной флуоресцентной микроскопии

**Таблица I: Состав последовательности протестированных вариантов***

| Вариант, № | Схема | Описание | Клон H1 | Клон L1 |
|---|---|---|---|---|
| 34164 |  | Замаскированное CD47:SIRPα CV1 мкАт к EGFR, расщепляемый PD-L1 | 25321 | 25325 |

*Домен IgV SIRPα, присоединенный к тяжелой цепи, обозначен полосатым узором на упрощенных изображениях, а домен IgV CD47, присоединенный к легкой цепи, показан клетчатым узором.

**Нативное связывание с клетками H292 с помощью флуоресцентной микроскопии**

**[00428]** Линию клеток NCI-H292, экспрессирующую EGFR, поддерживали в среде

RPMI-1640 с добавлением L-глутамина и 10% FBS (полная среда) в инкубаторе с увлажнителем + 5% CO2 при 37°C. За день до анализа экспоненциально растущие клетки собирали с использованием 0,05% трипсина (Gibco®), ресуспендировали в полной среде при плотности клеток $1,2\times10^5$ клеток/мл. 50 мкл клеток распределяли на лунку в 96-луночные, черные, полистирольные, с прозрачным плоским дном, обработанные тканевой культурой микропланшеты Corning® (код 3882, Corning, Корнинг, штат Нью-Йорк, США) до конечной концентрации 6000 клеток/лунку и инкубировали в течение ночи в инкубаторе с увлажнителем + 5% $CO_2$ при 37°C. В день эксперимента планшетам с клетками давали остыть до 4°C в течение 30 минут перед проведением анализа. Модифицированные варианты разбавляли до 2-кратной их конечной концентрации в холодном DPBS, содержащем $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$ (Wisent Bioproduct,Сен-Бруно, Квебек, Канада), с последующими трехкратными серийными разведениями в общей сложности для одиннадцати точек концентрации, начиная с 100 нМ. Все растворы хранили при 4°C, и все инкубации проводили при 4°C. К клеткам добавляли равные объемы 2X тестируемых вариантов или контролей и инкубировали в течение 2 часов. Затем клетки промывали холодным DPBS, содержащим $Ca^{2+}$ и $Mg^{2+}$, в устройстве для промывки планшетов BioTek EL405 select (BioTek, Винуски, штат Вирджиния, США) в течение 3 циклов промывки по 150 мкл на лунку за цикл с остаточным конечным объемом 25 мкл. Обнаружение связанных вариантов было достигнуто путем дополнительной инкубации со смесью для флуоресцентной маркировки, содержащей меченое AF488, Fc-специфическое вторичное антитело человека (Jackson ImmunoResearch, Уэст-Гроув, штат Пенсильвания, США), Deep Red CellMask (Molecular Probes, Юджин, штат Орегон, США) и Hoechst33342 (Molecular probes, Юджин, штат Орегон, США) в присутствии FBS (Wisent Bioproduct, Сен-Бруно, Квебек, Канада) в течение часа. Клетки дважды промывали (3 цикла, каждый раз по 150 мкл на лунку) в устройстве для промывки планшетов BioTek EL405 select (BioTek, Винуски, штат Вирджиния, США). Изображения были захвачены в ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices, Сан-Хосе, штат Калифорния, США) с использованием проходящего света, DAPI (синий канал), Cy5 (дальний красный канал) и FITC (зеленый канал). Анализ изображений был выполнен с помощью программного обеспечения для анализа MetaXpress Custom Module Editor (CME) (Molecular Devices, Сан-Хосе, штат Калифорния, США). Для каждой лунки измеряли общую интенсивность зеленой флуоресценции в области лунки, покрытой клетками, а затем нормализовали к площади клеток. Это нормализованное значение «Общая интенсивность на площадь клетки» использовалось для аппроксимации кривой в GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Ла-Хойя, штат Калифорния, США). Исходные значения рассчитывали по среднему нормализованному зеленому флуоресцентному

сигналу фона контрольных лунок (это лунки, которые инкубировали только со смесью вторичных антител для флуоресцентной маркировки). Исходные значения в каждом планшете были вычтены из всех данных перед применением модели нелинейной аппроксимации. Удельная общая интенсивность на площадь клетки (с поправкой на исходный уровень) по сравнению с логарифмом концентрации антител аппроксимаровали с помощью модели аппроксимации кривой нелинейной регрессии для одного участка с угловым коэффициентом Хилла для каждого тестируемого соединения.

***Результаты***

**[00429]** Получение модифицированного варианта анти-EGFR с маской на основе CD47:SIRPα (34164) дало 0,33 мг после препаративной ЭХ. Анализ СВЭЖХ-ЭХ после очистки белком А показал значительное количество соединений с высокой молекулярной массой, таких как агрегаты и олигомеры, в дополнение к основным соединениям, и для удаления этих нежелательных соединений была проведена препаративная ЭХ. СВЭЖХ-ЭХ конечного образца, очищенного с помощью ЭХ (Фиг. 28A), показала 91 % желаемых соединений. КЭ-ДСН в невосстанавливающих условиях (Фиг. 28B) продемонстрировал профиль, соответствующий одному преобладающему соединению со значительно более высокой молекулярной массой, чем можно было бы ожидать для интактной молекулы. Полоса для легкой цепи, модифицированной CD47, демонстрирует значительно более высокую, чем ожидалось, кажущуюся молекулярную массу в профиле КЭ-ДСН в восстанавливающих условиях, перекрывающемся с модифицированной тяжелой цепью. Подобно модификациям на основе PD-1:PD-L1 в Примере 3, это, вероятно, вызвано обширным гликозилированием CD47 (W. J. Mawby, C. H. Holmes, D. J. Anstee, F. A. Spring, M. J. Tanner, Isolation and characterization of CD47 glycoprotein: a multispanning membrane protein which is the same as integrin-associated protein (IAP) and the ovarian tumour marker OA3. *Biochem J* **304 ( Pt 2)**, 525-530 (1994)).

**[00430]** При обработке uPa как CD47, так и фрагмент SIRPα эффективно удалялись из легкой цепи, как показано на Фиг. 29. При этом полосы, соответствующие модифицированным тяжелым и легким цепям, исчезали при расщеплении и появлялись полосы, соответствующие молекулярной массе незамаскированных тяжелой и легкой цепей. Высвобожденные компоненты CD47 и SIRPα не могли быть однозначно идентифицированы после расщепления, вероятно, из-за их небольшого размера и гетерогенности, вызванной гликозилированием.

**[00431]** Связывание с EGFR на клетках H292, оцененное с помощью

многопараметрического анализа (Фиг. 30), показало, что маска на основе CD47:SIRPα в v34164 снижала связывание с мишенью в 37 раз. Это похоже на то, что наблюдалось в Примере 14 для эквивалентного варианта с маской на основе PD-1:PD-L1. После расщепления uPa обоих компонентов маски связывание EGFR восстанавливалось в пределах 1,1 раза от ДТ.

## ПРИМЕР 20: СОВМЕСТНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ И ОБРАЗОВАНИЕ МОСТИКОВ МИШЕНЕЙ С ПОМОЩЬЮ ТРИСПЕЦИФИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ АНТИ-CD3

**[00432]** Чтобы определить, могут ли PD-L1, Her2 и CD3 одновременно задействоваться вариантами анти-CD3, описанными в Примерах 1-9, исследования совместного взаимодействия Her2-PD-L1, а также образования мостиков Т-клетками проводили следующим образом.

***Способы***

**Оценка одновременного связывания Her2 и PD-L1 с помощью проточной цитометрии**

**[00433]** JIMT-1 (Институт Лейбница, Брауншвейг, Германия), культивируемые в питательной среде, состоящей из среды DMEM (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), поддерживали горизонтально в колбах T-175 (Corning, Корнинг, штат Нью-Йорк) в инкубаторе при 37 °C с 5 % углекислого газа. Антитела титровали в 96-луночном планшете с V-образным дном (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) от 100 нМ до 1,7 пМ при разведении 1:3, всего 20 мкл/лунка в буфере для FACS - PBS, содержащем 2% FBS (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс). Опухолевые клетки промывали PBS (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), собирали с помощью TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), разводили в среде и подсчитывали с использованием автоматического счетчика клеток Countess (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс). Опухолевые клетки промывали и ресуспендировали в буфере для FACS и добавляли в 96-луночный планшет по 50000 клеток на лунку. Клетки инкубировали с вариантами при 4°C в течение 1 часа. После инкубации клетки дважды промывали буфером для FACS и 1 мг/мл козьего вторичного антитела AF647 к Fc IgG человека (Jackson ImmunoResearch, Уэст-Гроув, Пенсильвания) вместе с 1000-кратно разбавленным красителем для оценки жизнеспособности (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) добавляли в лунки. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Клетки дважды

промывали буфером для FACS и ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS. Для считывания результатов анализа среднее геометрическое значение флуоресценции APC измеряли с помощью проточной цитометрии на приборе BD Celesta (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния). Исходные данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo, LLC (Becton, Dickinson & Company, Эшленд, штат Орегон). Графики были созданы с помощью GraphPad Prism версии 8.1.2 для Mac OS X (GraphPad Software, Ла-Хойя, штат Калифорния).

**Анализ образования мостиков CD3/Her2/PD-L1**

**[00434]** JIMT-1 (Институт Лейбница, Брауншвейг, Германия), культивируемые в питательной среде, состоящей из среды DMEM (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), поддерживали горизонтально в колбах T-175 (Corning, Корнинг, штат Нью-Йорк) в инкубаторе при 37 °C с 5 % углекислого газа. Опухолевые клетки промывали PBS (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), собирали с помощью TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), разводили в PBS и дважды промывали в PBS. Флакон с первичными клетками пан-Т человека (BioIVT, Вестбери, штат Нью-Йорк) оттаивали на водяной бане при 37 °C, промывали питательной средой, состоящей из RPMI-1640 с модификацией ATCC (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, затем промывали в PBS и ресуспендировали в PBS. Т-клетки и опухолевые клетки подсчитывали с использованием автоматического счетчика клеток Countess (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) и ресуспендировали в концентрации 5 М/мл в PBS. Краситель для пролиферации клеток eF670 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) добавляли к опухолевым клеткам в концентрации 1,25 мкМ. Cell Tracker Green (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) добавляли к Т-клеткам в концентрации 2 мкМ. Т-клетки и опухолевые клетки инкубировали при 37 ° С в течение 20 минут в темноте и дважды промывали в буфере для FACS - PBS, содержащем 2% FBS (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс). Антитела титровали в 96-луночном планшете с V-образным дном (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) от 10 нМ до 0,2 пМ при разведении 1:6, всего 50 мкл/лунку в буфере для FACS. Пан-Т-клетки смешивали с опухолевыми клетками при соотношении эффектора к мишени 5:1 при 1,44 клеток E6/мл. 50 мкл смешанной клеточной суспензии добавляли в планшет, содержащий титрованные варианты. Клетки инкубировали с вариантами при 4°C в течение 1 часа. Для считывания анализа двойную положительную популяцию клеток измеряли с помощью

проточной цитометрии на BD Celesta (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния). Исходные данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo, LLC (Becton, Dickinson & Company, Эшленд, штат Орегон). Графики были созданы с помощью GraphPad Prism версии 8.1.2 для Mac OS X (GraphPad Software, Ла-Хойя, штат Калифорния).

***Результаты***

**[00435]** Связывание с эндогенной Her2+/PD-L1+ линией раковых клеток (JIMT-1, см. Пример 7 для количественного определения рецепторов Her2 и PD-L1) измеряли с помощью проточной цитометрии (Фиг. 30A). Триспецифический (PD-1-CD3-Her2) вариант, который имеет только PD-1, присоединенный к тяжелой цепи (31929), и представляет собой полностью демаскированную версию замаскированного варианта 30430, демонстрирует более высокую СИФ по сравнению с биспецифическим контролем (v32497 (CD3-Her2), v33551 (PD-L1-CD3)). Для достижения биспецифических контролей в том же формате в v32497 были введены мутации в фрагменте PD-1, которые отменяют связывание PD-L1, в то время как нерелевантный scFv, нацеленный на гемагглютинин, заменил scFv, нацеленный на Her2, в v33551. Это свидетельствует о том, что и PD-L1, и Her2 одновременно взаимодействуют с раковой клеткой триспецифическим вариантом.

**[00436]** Кроме того, антителозависимое образование мостиков между Her2+/PDL1+ линией раковых клеток и пан-Т-клетками оценивали по наличию двойного положительного сигнала (флуоресцентный сигнал как для Т-клетки, так и для клетки-мишени одновременно) в проточной цитометрии (Фиг. 30B). Более высокий процент двойного положительного сигнала для триспецифического (PD-1-CD3-Her2) варианта (v31929) по сравнению с биспецифическим контролем (v32497 (CD3-Her2), v33551 (PD-L1-CD3)) демонстрирует, что описанные в данном документе варианты способны образовывать мостики между Т-клетками и раковыми клетками, и что одновременное взаимодействие со всеми тремя мишенями с помощью v31929 увеличивает это образование мостиков между Т-клетками.

## ПРИМЕР 21: IN VIVO ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА СЛИТЫХ БЕЛКОВ АНТИ-CD3 X АНТИ-HER2 ПРИВЛЕКАЮЩЕГО Т-КЛЕТКИ АКТИВАТОРА

**[00437]** Функциональное влияние маски на основе PD-1:PD-L1 на способность вариантов CD3 x Her2 Fab x scFv Fc, описанных в Примерах 1-9, привлекать и активировать Т-клетки для уничтожения опухолевых клеток, имеющих Her2. оценивали в исследовании in vivo на модели гуманизированных мышей следующим образом.

***Способы***

**[00438]** Мышам (NSG [NOD SCID гамма]) подкожно имплантировали 5×106 Her2+ клеток линии опухоли человека (JIMT-1) и одновременно внутривенно прививали 1×107 PBMC от здоровых доноров-людей. После образования и начального роста опухоли примерно до 150-200 мм3 мышам внутривенно вводили дозы вариантов антител, описанных и полученных в примерах 1-9. На протяжении всего исследования дважды в неделю у мышей контролировали массу тела и рост опухоли (измеряли штангенциркулем).

***Результаты***

**[00439]** Тенденции, наблюдаемые для замаскированных и незамаскированных вариантов CD3 x Her2 Fab x scFv Fc в связывании с CD3 и функциональных исследованиях в примерах 6-9, повторяются, когда те же образцы исследуются на противоопухолевую активность в исследовании in vivo с использованием гуманизированной модели мыши с PBMC от здоровых доноров, а также с трансплантацией Her2-положительной линии раковых клеток человека. В то время как опухоль быстро растет у животных, которых лечили без лекарственного средства или нерелеватным контрольным антителом (22277), вариантом с нефункциональным доменом PD-L1, присоединенным к тяжелой цепи (32497), демонстрирует надежное ингибирование роста опухоли благодаря своей способности рекрутировать Т-клетки для уничтожения. Когда тот же вариант сочетается с антителом к PD-L1 (32497 + 33449), можно наблюдать дополнительное ингибирование из-за дополнительной активности контрольной точки. Вариант с функциональным доменом PD-1 (31929) также демонстрирует дополнительное ингибирование роста опухоли по сравнению с эквивалентной конструкцией с нефункциональным доменом PD-1 (32497). При оценке вариантов с полными масками на основе PD-1:PD-L1 конструкция с нерасщепляемыми линкерами на обоих присоединенных доменах (30423) демонстрируют быстрый рост опухоли. И наоборот, конструкция с расщепляемым линкером между Fab и PD-L1 (30430) проявляет высокую противоопухолевую активность, аналогичную незамаскированному триспецифическому контролю (31929), при использовании линии опухолевых клеток с высокой экспрессией соответствующей протеазы в модели. При использовании линии опухолевых клеток с низкой экспрессией протеазы тот же расщепляемый вариант (30430) демонстрирует быстрый рост опухоли, как и нерасщепляемая конструкция (30430).

## ПРИМЕР 22: ПАРЫ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОР CD80-CTLA-4, CD80-CD28, И CD80-PD-L1 В КАЧЕСТВЕ МАСОК

**[00440]** Аффинность CD80 к CTLA-4, CD28 и PD-L1 составляет 0,2 мкМ, 4 мкМ и 1,7 мкМ, соответственно, (Butte, M. J. *et al*, Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with

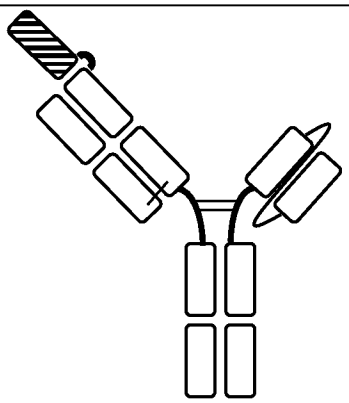
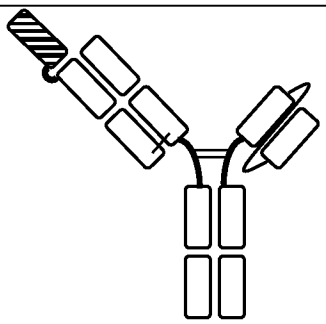
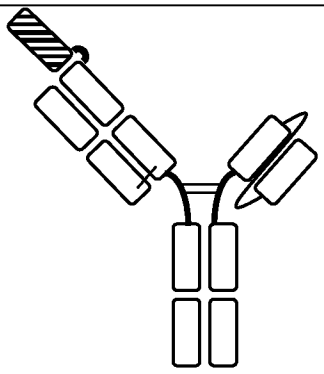
the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*, **27**, 111-122, doi:10.1016/j.immuni.2007.05.016 (2007)). Для обеспечения предпочтительного связывания CD80 с CD28 в домене IgV CD80 вводят мутации, которые, как известно, избирательно повышают аффинность к CD28 (патент: US20210155668A1). В формате «односторонней» маски CD80 было разработано несколько конструкций для оценки того, какая геометрия оптимальным образом усиливает активацию Т-клеток. Вкратце, домен IgV CD80 человека с мутациями, которые предотвращают гомодимеризацию CD80 (как описано выше), и/или CD80 с мутациями, которые, как предполагается, повышают аффинность к CD28, присоединяются к N-концам тяжелой или легкой цепи анти-CD3 Fab с помощью линкера (EAAAK)2 и объединяются в формат гетеродимерной Fc с анти-TAA scFv x Fc. Альтернативно, домен IgV CD80 присоединяют к N-концу тяжелой или легкой цепи анти-TAA Fab с использованием линкера (EAAAK)2 и объединяются в формат гетеродимерной Fc с анти-CD3 scFv x Fc. Форматы, описанные выше, проиллюстрированы в Таблице J.

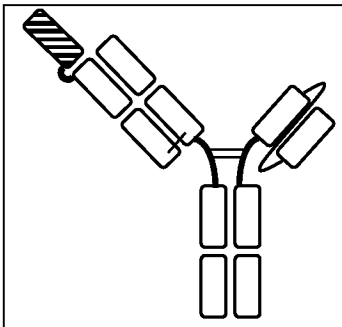
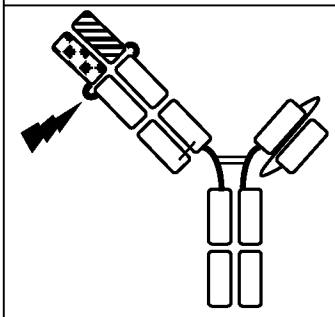
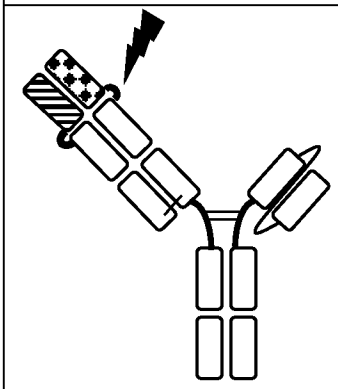
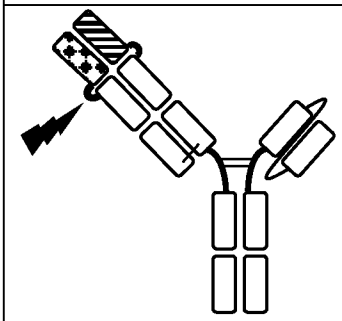
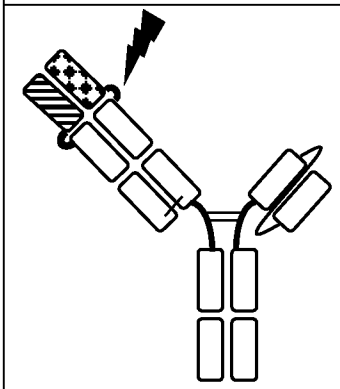
**[00441]** Поскольку CD80 может связываться с CTLA-4, CD28 и PD-L1, все три используются в качестве партнеров димерной маски (CD80:CTLA-4, CD80:CD28, CD80:PD-L1). Полученные замаскированные конструкции были сконструированы с использованием домена IgV CD80 с мутациями, предотвращающими гомодимеризацию CD80, и известно, что они повышают аффинность к CD28. Во всех случаях домены IgV CTLA-4, CD28 или PD-L1 сливаются с тяжелой или легкой цепью с расщепляемой протеазой последовательностью, тогда как фрагмент CD80 сливается с легкой или тяжелой цепью с помощью альфа-спиральной пептидной линкерной последовательности, которая не удаляется эндогенной протеазой. Для создания маски CD80:CTLA-4 высокоаффинная версия домена IgV CD80 и домен IgV человеческого CTLA-4 дикого типа присоединяют к N-концам тяжелой и легкой цепей анти-CD3 Fab, соответственно, с помощью пептидных линкеров и соединяют с анти-TAA scFv Fc. Для маски CD80:CD28 высокоаффинная версия домена IgV CD80 и домен IgV CD28 человека дикого типа присоединяют к N-концам тяжелой и легкой цепей анти-CD3 Fab, соответственно, с использованием пептидных линкеров и соединяют с анти-TAA scFv Fc. Наконец, для маски CD80:PD-L1 домен IgV CD80 с мутациями предотвращает гомодимеризацию CD80 и, как предполагается, увеличивает аффинность к CD28 и PD-L1 (патент: US20210155668A1) и домен IgV PD-L1 человека дикого типа присоединяют к N-концам тяжелой и легкой цепей анти-CD3 Fab, соответственно, с использованием пептидных линкеров и соединяют с анти-TAA scFv Fc. Кроме того, разработаны молекулы, в которых маска, содержащая CD80 (CD80:CTLA-4, CD80:CD28 или CD80:PD-L1), используется для блокирования паратопа анти-TAA Fab, а

цепь соединяют с анти-CD3 scFv. Описанные выше замаскированные варианты проиллюстрированы в Таблице J.

**[00442]** В приведенных выше примерах описаны конструкции с односторонними или димерными масками на основе CD80 (CD80:CTLA-4, CD80:CD28, CD80:PD-L1), используемыми в молекуле, которая включает анти-CD3 плечо (Fab или scFv) и анти-TAA плечо (Fab или scFv). Эти конструкции могут служить платформой для ряда паратопов анти-CD3 и любого паратопа анти-TAA.

**Таблица J. Схемы вариантов с односторонней маской CD80 и полностью замаскированных CD80 вариантов.**

| Схема | Описание |
|---|---|
|  | CD80 (HC) анти-CD3 Fab x анти-TAA scFv |
|  | CD80 (LC) анти-CD3 Fab x анти-TAA scFv |
|  | CD80 (HC) анти-TAA Fab x анти-CD3 scFv |

| | |
|---|---|
|  | CD80 (LC) анти-TAA Fab x анти-CD3 scFv |
|  | CD80 (HC) и CTLA-4, CD28, или PD-L1 (LC) анти-CD3 Fab x анти-TAA scFv |
|  | CTLA-4, CD28, или PD-L1 (HC) и CD80 (LC) анти-CD3 Fab x анти-TAA scFv |
|  | CD80 (HC) и CTLA-4, CD28, или PD-L1 (LC) анти-TAA Fab x анти-CD3 scFv |
|  | CTLA-4, CD28, или PD-L1 (HC) и CD80 (LC) анти-TAA Fab x анти-CD3 scFv |

* Анти-CD3 плечи заштрихованы темно-серым, а анти-TAA плечи заштрихованы светло-серым. Домен IgV CD80 обозначен полосатым узором на упрощенных изображениях, а

домены IgV CTLA-4, CD28 или PD-L1 показаны клетчатым узором. Стрелка молнии указывает на линкерную последовательность, расщепляемую протеазой.

**[00443]** Предполагается, что модификации конкретных вариантов осуществления, описанные в данном документе, которые могут быть очевидны специалистам в данной области техники, должны быть включены в рамки объема следующей формулы изобретения.

**[00444]** Все ссылки, выданные патенты и заявки на патенты, цитируемые в тексте данного описания, включены в данный документ посредством ссылки во полном объеме для всех целей.

## ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

**Таблица AA, часть 1**

| SEQ ID | ОПИСАНИЕ | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|---|---|---|
| SEQ ID NO:1 | VL к CD3 CRIS7 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCSASSSVSYM NWYQQKPGKAPKRWIYDSSKLASGVPARFSG SGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSRNPPT FGGGTKLQIT |
| SEQ ID NO:2 | VH к CD3 CRIS7 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRS TMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSSAYTNYNQK FKDRFTISADKSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYF CARPQVHYDYNGFPYWGQGTPVTVSS |
| SEQ ID NO:3 | scFv трастузумаба | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG SRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPT FGQGTKVEIKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTY IHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO:4 | Область CH3 цепи A | GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF ALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG |

| | | |
|---|---|---|
| SEQ ID NO:5 | Область CH3 цепи B | GQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG |
| SEQ ID NO:6 | Область CH2 с мутациями L234A-L235A_D265S | APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAK |
| SEQ ID NO:7 | PD-1 дикого типа | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVL NWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFR VTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISL APKAQIKESLRAELRVTE |
| SEQ ID NO:8 | PD-L1 дикого типа | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLD LAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSY RQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVY RCMISYGGADYKRITVKVNA |
| SEQ ID NO:9 | Высокоаффинный PD-1 | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFHV VWHRESPSGQTDTLAAFPEDRSQPGQDARFR VTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYVCGVIS LAPKIQIKESLRAELRVTE |
| SEQ ID NO:10 | Высокоаффинный PD-L1 | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLD LAALQVFWMMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSS YRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGV YTCLIAYKGADYKRITVKVNA |
| SEQ ID NO:11 | PD-1 CÞS ДТ | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVL NWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDSRFR VTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISL APKAQIKESLRAELRVTE |
| SEQ ID NO:12 | Область CH3 дикого типа | GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG |
| SEQ ID NO:13 | VL к EGFR | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIH WYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSG |

| | | |
|---|---|---|
| | | TDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGA GTKLELK |
| SEQ ID NO:14 | VH κ EGFR | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYG VHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFT SRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCA RALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA |
| SEQ ID NO:15 | VL κ MSLN | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMH WYQQKSGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSG SGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQWSKHPLTFGQGTKLEIK |
| SEQ ID NO:16 | VH κ MSLN | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTG YTMNWVRQAPGQGLEWMGLITPYNGASSYN QKFRGKATMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCARGGYDGRGFDYWGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO:17 | VL κ TF | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRDIKSYL NWYQQKPGKAPKVLIYYATSLAEGVPSRFSGS GSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQHGESPWTF GQGTKVEIK |
| SEQ ID NO:18 | VH κ TF | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKEY YMHWVRQAPGKGLEWVGLIDPEQGNTIYDPK FQDRATISADNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCARDTAAYFDYWGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO:19 | VL κ CD19A | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMH WYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCFQGSVYPFTFG QGTKLEIK |
| SEQ ID NO:20 | VH κ CD19A | QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSG MGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKRYNP ALKSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTAA YYCARMELWSYYFDYWGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO:21 | VL κ cMET | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVDSYA NSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDR FSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKE DPLTFGGGTKVEIK |

| | | |
|---|---|---|
| SEQ ID NO:22 | VH к cMET | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTA YTMHWVRQAPGQGLEWMGWIKPNNGLANY AQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTA VYYCARSEITTEFDYWGQGTLVTVSS |
| SEQ ID NO:23 | VL к CDH3 | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSNDVGAYN YVSWYQQHPGKAPKLMISEVNKRPSGVSNRF SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSFTSGL PWVVFGGGTKLTVL |
| SEQ ID NO:24 | VH CDH3 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKWGDGTLNPWGQGTMVTVSS |
| SEQ ID NO:25 | CD80 ДТ | VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYW QKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITN NLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREH LAEVTLSVKA |
| SEQ ID NO:26 | CTLA4 ДТ | MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEV RVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDD SICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVEL MYPPPYYLGIGNGTQIYVIDPE |
| SEQ ID NO:27 | Сигнальный пептид | EFATMRPTWAWWLFLVLLLALWAPARG |
| SEQ ID NO: 28 | Сайт расщепления протеазой | MSGRSANA |
| SEQ ID NO: 29 | Последовательность Fc IgG1 человека 231–447 (EU-нумерация) | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| SEQ ID NO: 30 | Сайт расщепления протеазой | TSGRSANP |
| SEQ ID NO: 31 | Сайт расщепления протеазой | LSGRSDNH |

| | | |
|---|---|---|
| SEQ ID NO: 32 | Сайт расщепления протеазой | GSGRSAQV |
| SEQ ID NO: 33 | Сайт расщепления протеазой | GSSRNADV |
| SEQ ID NO: 34 | Сайт расщепления протеазой | GTARSDNV |
| SEQ ID NO: 35 | Последовательность расщепления протеазой | GGGRVNNV |
| SEQ ID NO: 36 | Сайт расщепления протеазой | MSARILQV |
| SEQ ID NO: 37 | Сайт расщепления протеазой | GKGRSANA |
| SEQ ID NO: 38 | Линкер | EAAAKEAAAK |
| SEQ ID NO: 39 | Линкер | EAAAK |
| SEQ ID NO: 40 | Линкер | PPPP |
| SEQ ID NO: 41 | Линкер | PPP |
| SEQ ID NO: 42 | Линкер | GGGGS |
| SEQ ID NO: 43 | Линкер с С-концевым сайтом расщепления протеазой | EAAAKEAAAKMSGRSANA |
| SEQ ID NO: 44 | Линкер с N-концевым сайтом расщепления протеазой | MSGRSANAEAAAKEAAAK |
| SEQ ID NO: 45 | Линкер с N-концевой последовательност | MSGRSANAEAAAK |

| | | |
|---|---|---|
| | ью расщепления протеазой | |

**Таблица AA, часть 2**

***Последовательности клонов***

| **ID клона** | **Тип последовательности** | **Последовательность** | **Название** | **Мишень** | **SEQ ID NO:** |
|---|---|---|---|---|---|
| 787 | Полная | GDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRDIKSYLNWYQQKPGKAPKVLIYYATSLAEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQHGESPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | | | 46 |
| | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRDIKSYLNWYQQKPGKAPKVLIYYATSLAEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQHGESPWTFGQGTKVEIK | D3H44 | TF | 47 |
| | LCDR1 | RASRDIKSYLN | | | 48 |
| | LCDR2 | YATSLAE | | | 49 |
| | LCDR3 | LQHGESPWT | | | 50 |
| 1380 | Полная | GEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQ | | | 51 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK | | | |
| 2932 | Полная | GEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFNIKEYYMHWVRQAPGKGLEWV GLIDPEQGNTIYDPKFQDRATISADNS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARD TAAYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG | | | 52 |
| | VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFNIKEYYMHWVRQAPGKGLEWVG LIDPEQGNTIYDPKFQDRATISADNSK NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDT AAYFDYWGQGTLVTVSS | D3H44 | TF | 53 |
| | HCDR1 | EYYMH | | | 54 |
| | HCDR2 | LIDPEQGNTIYDPKFQD | | | 55 |
| | HCDR3 | DTAAYFDY | | | 56 |
| 3232 | Полная | GDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRAS QSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYAS ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESE DIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLEL KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS | | | 57 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS<br>KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK<br>SFNRGEC | | | |
| | VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQS<br>IGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESI<br>SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDI<br>ADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELK | Цетук<br>симаб | EGFR | 58 |
| | LCDR1 | RASQSIGTNIH | | | 59 |
| | LCDR2 | YASESIS | | | 60 |
| | LCDR3 | QQNNNWPTT | | | 61 |
| 3345 | Полная | GQVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFS<br>GFSLSTSGMGVGWIRQPPGKALEWL<br>AHIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDT<br>SKNQVVLTMTNMDPVDTAAYYCAR<br>MELWSYYFDYWGQGTLVTVSSAST<br>KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV<br>KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP<br>AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT<br>YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<br>TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF<br>NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST<br>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV<br>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY<br>VLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPS<br>DIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDS<br>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC<br>SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK | | | 62 |
| | VH | QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSG<br>FSLSTSGMGVGWIRQPPGKALEWLA<br>HIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTS<br>KNQVVLTMTNMDPVDTAAYYCAR<br>MELWSYYFDYWGQGTLVTVSS | SGN-<br>CD19a | CD19 | 63 |
| | HCDR1 | TSGMGVG | | | 64 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | HCDR2 | HIWWDDDKRYNPALKS | | | 65 |
| | HCDR3 | MELWSYYFDY | | | 66 |
| 3357 | Полная | GDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRAS<br>QSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYAS<br>ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESE<br>DIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLEL<br>KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS<br>GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS<br>KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK<br>SFNRGEC | | | 57 |
| | VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQS<br>IGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESI<br>SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDI<br>ADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELK | Цетук<br>симаб | EGFR | 58 |
| | LCDR1 | RASQSIGTNIH | | | 59 |
| | LCDR2 | YASESIS | | | 60 |
| | LCDR3 | QQNNNWPTT | | | 61 |
| 10564 | Полная | GQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK<br>ASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEW<br>MGLITPYNGASSYNQKFRGKATMTV<br>DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR<br>GGYDGRGFDYWGQGTLVTVSSAST<br>KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV<br>KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP<br>AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT<br>YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK<br>THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK<br>DTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVK<br>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS<br>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK<br>VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLD | | | 67 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | | | |
| | VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWM GLITPYNGASSYNQKFRGKATMTVD TSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARG GYDGRGFDYWGQGTLVTVSS | huRG 7787 | Мезотелин | 68 |
| | HCDR1 | GYTMN | | | 69 |
| | HCDR2 | LITPYNGASSYNQKFRG | | | 70 |
| | HCDR3 | GGYDGRGFDY | | | 71 |
| 10565 | Полная | GDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS SSVSYMHWYQQKSGKAPKLLIYDTS KLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQWSKHPLTFGQGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC | | | 72 |
| | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASS SVSYMHWYQQKSGKAPKLLIYDTSK LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQWSKHPLTFGQGTKLE IK | huRG 7787 | Мезотелин | 73 |
| | LCDR1 | SASSSVSYMH | | | 74 |
| | LCDR2 | DTSKLAS | | | 75 |
| | LCDR3 | QQWSKHPLT | | | 76 |
| 10567 | Полная | GQSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTS NDVGAYNYVSWYQQHPGKAPKLMI SEVNKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTI SGLQAEDEADYYCSSFTSGLPWVVF GGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSE ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA | | | 77 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEG<br>STVEKTVAPTECS | | | |
| | VL | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSN<br>DVGAYNYVSWYQQHPGKAPKLMIS<br>EVNKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTIS<br>GLQAEDEADYYCSSFTSGLPWVVFG<br>GGTKLTVL | PF037<br>32010 | CDH3 | 78 |
| | LCDR1 | TGTSNDVGAYNYVS | | | 79 |
| | LCDR2 | EVNKRPS | | | 80 |
| | LCDR3 | SSFTSGLPWVV | | | 81 |
| 10606 | Полная | GQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVS<br>GFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLG<br>VIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSK<br>SQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALT<br>YYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGP<br>SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ<br>SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV<br>NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP<br>PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS<br>RTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYV<br>DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL<br>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSR<br>DELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFF<br>LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPG | | | 82 |
| | VH | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSG<br>FSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVI<br>WSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQ<br>VFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYY<br>DYEFAYWGQGTLVTVSA | Цетук<br>симаб | EGFR | 83 |
| | HCDR1 | NYGVH | | | 84 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | HCDR2 | VIWSGGNTDYNTPFTS | | | 85 |
| | HCDR3 | ALTYYDYEFAY | | | 86 |
| 11274 | Полная | GEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS<br>GFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS<br>AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNS<br>KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKW<br>GDGTLNPWGQGTMVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS<br>SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN<br>HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP<br>CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR<br>TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV<br>LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP<br>APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD<br>ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS<br>KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSLSPG | | | 87 |
| | VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG<br>FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI<br>SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWGD<br>GTLNPWGQGTMVTVSS | PF037<br>32010 | CDH3 | 88 |
| | HCDR1 | SYAMS | | | 89 |
| | HCDR2 | AISGSGGSTYYADSVKG | | | 90 |
| | HCDR3 | WGDGTLNP | | | 91 |
| 11462 | Полная | GDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKS<br>SESVDSYANSFLHWYQQKPGQPPKL<br>LIYRASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL<br>TISSLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFG<br>GGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK<br>SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD | | | 92 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC | | | |
| | VL | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS ESVDSYANSFLHWYQQKPGQPPKLLI YRASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGG GTKVEIK | Телизотузумаб | c-Met | 93 |
| | LCDR1 | KSSESVDSYANSFLH | | | 94 |
| | LCDR2 | RASTRES | | | 95 |
| | LCDR3 | QQSKEDPLT | | | 96 |
| 11509 | Полная | GQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYIFTAYTMHWVRQAPGQGLEW MGWIKPNNGLANYAQKFQGRVTMT RDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCA RSEITTEFDYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVEPKSCDCHCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG | | | 97 |
| | VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYIFTAYTMHWVRQAPGQGLEWMG WIKPNNGLANYAQKFQGRVTMTRD TSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARS EITTEFDYWGQGTLVTVSS | Телизотузумаб | c-Met | 98 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | HCDR1 | AYTMH | | | 99 |
| | HCDR2 | WIKPNNGLANYAQKFQG | | | 100 |
| | HCDR3 | SEITTEFDY | | | 101 |
| 12985 | Полная | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCSAS<br>SSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDSS<br>KLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLQ<br>PEDFATYYCQQWSRNPPTFGGGTKL<br>QITRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS<br>VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ<br>SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS<br>KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK<br>SFNRGEC | | | 102 |
| | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCSAS<br>SSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDSS<br>KLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLQ<br>PEDFATYYCQQWSRNPPTFGGGTKL<br>QIT | hCris7 | CD3 | 103 |
| | LCDR1 | SASSSVSYMN | | | 104 |
| | LCDR2 | DSSKLAS | | | 105 |
| | LCDR3 | QQWSRNPPT | | | 106 |
| 12989 | Полная | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCKAS<br>GYTFTRSTMHWVRQAPGQGLEWIG<br>YINPSSAYTNYNQKFKDRFTISADKS<br>KSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARPQ<br>VHYDYNGFPYWGQGTPVTVSSASTK<br>GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK<br>DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA<br>VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI<br>CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH<br>TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL<br>MISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY<br>RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS<br>NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYV | | | 107 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | YPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD<br>IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD<br>GSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS<br>VMHEALHNHYTQKSLSLSPG | | | |
| | VH | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCKAS<br>GYTFTRSTMHWVRQAPGQGLEWIG<br>YINPSSAYTNYNQKFKDRFTISADKS<br>KSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARPQ<br>VHYDYNGFPYWGQGTPVTVSS | hCris7 | CD3 | 108 |
| | HCDR1 | RSTMH | | | 109 |
| | HCDR2 | YINPSSAYTNYNQKFKD | | | 110 |
| | HCDR3 | PQVHYDYNGFPY | | | 111 |
| 20855 | Полная | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP<br>VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV<br>HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS<br>LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY<br>GGADYKRITVKVNAEAAAKEAAAK<br>DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS<br>ESVDSYANSFLHWYQQKPGQPPKLLI<br>YRASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI<br>SSLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGG<br>GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS<br>GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD<br>NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS<br>TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS<br>SPVTKSFNRGEC | | | 112 |
| | Маска | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP<br>VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV<br>HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS<br>LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY<br>GGADYKRITVKVNA | 18-132<br>PD-L1 | PD-1 | 113 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VL | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS | Телиз | c-Met | 93 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ESVDSYANSFLHWYQQKPGQPPKLLI<br>YRASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI<br>SSLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGG<br>GTKVEIK | отузу<br>маб | | |
| | LCDR1 | KSSESVDSYANSFLH | | | 94 |
| | LCDR2 | RASTRES | | | 95 |
| | LCDR3 | QQSKEDPLT | | | 96 |
| 20859 | Полная | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT<br>SESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPED<br>RSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSV<br>VRARRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKE<br>SLRAELRVTEEAAAKEAAAKQVQLV<br>QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFT<br>AYTMHWVRQAPGQGLEWMGWIKP<br>NNGLANYAQKFQGRVTMTRDTSIST<br>AYMELSRLRSDDTAVYYCARSEITTE<br>FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL<br>APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV<br>TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL<br>YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK<br>PSNTKVDKRVEPKSCDCHCPPCPAPE<br>LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL<br>HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK<br>TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK<br>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT<br>VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH<br>YTQKSLSLSPG | | | 115 |
| | Маска | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT<br>SESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPED<br>RSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSV<br>VRARRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKE<br>SLRAELRVTE | 33-146<br>PD-1 | PD-L1 | 116 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYIFTAYTMHWVRQAPGQGLEWMG WIKPNNGLANYAQKFQGRVTMTRD TSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARS EITTEFDYWGQGTLVTVSS | Телизотузумаб | c-Met | 98 |
| | HCDR1 | AYTMH | | | 99 |
| | HCDR2 | WIKPNNGLANYAQKFQG | | | 100 |
| | HCDR3 | SEITTEFDY | | | 101 |
| 20871 | Полная | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNAEAAAKEAAAK QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSN DVGAYNYVSWYQQHPGKAPKLMIS EVNKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSFTSGLPWVVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEE LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK ADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAA SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS TVEKTVAPTECS | | | 117 |
| | Маска | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNA | 18-132 PD-L1 | PD-1 | 113 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VL | QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSN DVGAYNYVSWYQQHPGKAPKLMIS EVNKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTIS | PF03732010 | CDH3 | 78 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | GLQAEDEADYYCSSFTSGLPWVVFG<br>GGTKLTVL | | | |
| | LCDR1 | TGTSNDVGAYNYVS | | | 79 |
| | LCDR2 | EVNKRPS | | | 80 |
| | LCDR3 | SSFTSGLPWVV | | | 81 |
| 20875 | Полная | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT<br>SESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPED<br>RSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSV<br>VRARRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKE<br>SLRAELRVTEEAAAKEAAAKEVQLL<br>ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS<br>YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG<br>GSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL<br>QMNSLRAEDTAVYYCAKWGDGTLN<br>PWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPS<br>SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS<br>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT<br>KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL<br>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ<br>DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS<br>KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK<br>SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ<br>KSLSLSPG | | | 118 |
| | Маска | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT<br>SESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPED<br>RSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSV<br>VRARRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKE<br>SLRAELRVTE | 33-146<br>PD-1 | PD-L1 | 116 |
| | Линкер | EAAAKEAAAK | | | 114 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | маски | | | | |
| | VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG<br>FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI<br>SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKN<br>TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWGD<br>GTLNPWGQGTMVTVSS | PF037<br>32010 | CDH3 | 88 |
| | HCDR1 | SYAMS | | | 89 |
| | HCDR2 | AISGSGGSTYYADSVKG | | | 90 |
| | HCDR3 | WGDGTLNP | | | 91 |
| 21490 | Полная | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS<br>QDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSA<br>SFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQ<br>PEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKV<br>EIKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGEV<br>QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF<br>NIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIY<br>PTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT<br>AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGD<br>GFYAMDYWGQGTLVTVSSEPKSSDK<br>THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK<br>DTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVK<br>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS<br>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK<br>VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV<br>YVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYP<br>SDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLD<br>SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | | | 119 |
| | VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS<br>GFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR<br>IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK<br>NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG<br>GDGFYAMDYWGQGTLVTVSS | Траст<br>узума<br>б | HER2 | 120 |
| | HCDR1 | DTYIH | | | 121 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | HCDR2 | RIYPTNGYTRYADSVKG | | | 122 |
| | HCDR3 | WGGDGFYAMDY | | | 123 |
| | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS QDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSA SFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKV EIK | Траст узума б | HER2 | 124 |
| | LCDR1 | RASQDVNTAVA | | | 125 |
| | LCDR2 | SASFLYS | | | 126 |
| | LCDR3 | QQHYTTPPT | | | 127 |
| 21496 | Полная | EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCGAS GFTFSDYYMAWVRQAPKKGLEWVA SISYEGRSTYYGDSVKGRFTISRDNA KSTLYLQMNSLRSEDTATYYCARRA EGMDFDYWGQGVMVTVSSAKTTPP SVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKG YFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVL ESDLYTLSSSVTVPSSPRPSETVTCNV AHPASSTKVDKKIVPRDCGCPPCICT VPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVT CVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVH TAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQ DWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIS KTKGRPKAPQVYVIPPSKEQMAKDK VSLLCMITDFFPEDITVEWQWNGQPA ENYLTWPPIMDTDGSYFVYSKLNVQ KSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTE KSLSHSPGGGSGGGSGGGSGGGSGG GSDIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQ ASQSIYSSLAWYQQKPGQSPKLLIYD ASHLASGVPSRFSGSRYGTEFTLTISG VQCDDAATYYCQGGWYSSAATYVP NTFGGGTEVVVKGGGGSGGGGSGG GGSQEQLVESGGGLVQPEGSLTLTCK | | | 128 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ASGFTISNNYYMCWVRQAPGKGLE<br>WIACIYGGISGRTYYASWAKGRFTIS<br>KTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCVR<br>GYVGTSNLWGPGTLVTVSS | | | |
| | VH | EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCGAS<br>GFTFSDYYMAWVRQAPKKGLEWVA<br>SISYEGRSTYYGDSVKGRFTISRDNA<br>KSTLYLQMNSLRSEDTATYYCARRA<br>EGMDFDYWGQGVMVTVSS | 15832<br>1 | 4-1BB | 129 |
| | HCDR1 | DYYMA | | | 130 |
| | HCDR2 | SISYEGRSTYYGDSVKG | | | 131 |
| | HCDR3 | RAEGMDFDY | | | 132 |
| | VH | QEQLVESGGGLVQPEGSLTLTCKASG<br>FTISNNYYMCWVRQAPGKGLEWIAC<br>IYGGISGRTYYASWAKGRFTISKTSST<br>TVTLQMTSLTAADTATYFCVRGYVG<br>TSNLWGPGTLVTVSS | 8K22 | FRa | 133 |
| | HCDR1 | NNYYMC | | | 134 |
| | HCDR2 | CIYGGISGRTYYASWAKG | | | 135 |
| | HCDR3 | GYVGTSNL | | | 136 |
| | VL | DIVMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQAS<br>QSIYSSLAWYQQKPGQSPKLLIYDAS<br>HLASGVPSRFSGSRYGTEFTLTISGVQ<br>CDDAATYYCQGGWYSSAATYVPNT<br>FGGGTEVVVK | 8K22 | FRa | 137 |
| | LCDR1 | QASQSIYSSLA | | | 138 |
| | LCDR2 | DASHLAS | | | 139 |
| | LCDR3 | QGGWYSSAATYVPNT | | | 140 |
| 22080 | Полная | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT<br>SESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPED<br>RSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSV<br>VRARRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKE<br>SLRAELRVTEEAAAKEAAAKQVQLV<br>ESGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTR | | | 141 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | STMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSSA YTNYNQKFKDRFTISADKSKSTAFLQ MDSLRPEDTGVYFCARPQVHYDYNG FPYWGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG | | | |
| | Маска | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT SESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPED RSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSV VRARRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKE SLRAELRVTE | 33-146 PD-1 | PD-L1 | 116 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VH | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCKAS GYTFTRSTMHWVRQAPGQGLEWIG YINPSSAYTNYNQKFKDRFTISADKS KSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARPQ VHYDYNGFPYWGQGTPVTVSS | hCris7 | CD3 | 108 |
| | HCDR1 | RSTMH | | | 109 |
| | HCDR2 | YINPSSAYTNYNQKFKD | | | 110 |
| | HCDR3 | PQVHYDYNGFPY | | | 111 |
| 22082 | Полная | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT SESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPE | | | 142 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | DRSQPGQDSRFRVTQLPNGRDFHMS<br>VVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIK<br>ESLRAELRVTEEAAAKEAAAKQVQL<br>VESGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFT<br>RSTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSS<br>AYTNYNQKFKDRFTISADKSKSTAFL<br>QMDSLRPEDTGVYFCARPQVHYDYN<br>GFPYWGQGTPVTVSSASTKGPSVFPL<br>APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV<br>TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL<br>YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK<br>PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA<br>PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGV<br>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI<br>EKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDEL<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN<br>GQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKL<br>TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN<br>HYTQKSLSLSPG | | | |
| | Маска | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT<br>SESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPE<br>DRSQPGQDSRFRVTQLPNGRDFHMS<br>VVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIK<br>ESLRAELRVTE | 33-146<br>PD-1 | PD-L1 | 143 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VH | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCKAS<br>GYTFTRSTMHWVRQAPGQGLEWIG<br>YINPSSAYTNYNQKFKDRFTISADKS<br>KSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARPQ<br>VHYDYNGFPYWGQGTPVTVSS | hCris7 | CD3 | 108 |
| | HCDR1 | RSTMH | | | 109 |
| | HCDR2 | YINPSSAYTNYNQKFKD | | | 110 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | HCDR3 | PQVHYDYNGFPY | | | 111 |
| 22083 | Полная | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT<br>SESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPE<br>DRSQPGQDSRFRVTQLPNGRDFHMS<br>VVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIK<br>ESLRAELRVTEMSGRSANAEAAAKQ<br>VQLVESGGGVVQPGRSLRLSCKASG<br>YTFTRSTMHWVRQAPGQGLEWIGYI<br>NPSSAYTNYNQKFKDRFTISADKSKS<br>TAFLQMDSLRPEDTGVYFCARPQVH<br>YDYNGFPYWGQGTPVTVSSASTKGP<br>SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ<br>SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV<br>NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP<br>PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS<br>RTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYV<br>DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL<br>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSR<br>DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFA<br>LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPG | | | 144 |
| | Маска | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT<br>SESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPE<br>DRSQPGQDSRFRVTQLPNGRDFHMS<br>VVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIK<br>ESLRAELRVTE | 33-146<br>PD-1 | PD-L1 | 143 |
| | Линкер маски | MSGRSANAEAAAK | | | 145 |
| | VH | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCKAS<br>GYTFTRSTMHWVRQAPGQGLEWIG<br>YINPSSAYTNYNQKFKDRFTISADKS<br>KSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARPQ | hCris7 | CD3 | 108 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | VHYDYNGFPYWGQGTPVTVSS | | | |
| | HCDR1 | RSTMH | | | 109 |
| | HCDR2 | YINPSSAYTNYNQKFKD | | | 110 |
| | HCDR3 | PQVHYDYNGFPY | | | 111 |
| 22086 | Полная | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT<br>SESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPE<br>DRSQPGQDSRFRVTQLPNGRDFHMS<br>VVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIK<br>ESLRAELRVTEEAAAKEAAAKMSGR<br>SANAQVQLVESGGGVVQPGRSLRLS<br>CKASGYTFTRSTMHWVRQAPGQGLE<br>WIGYINPSSAYTNYNQKFKDRFTISA<br>DKSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCA<br>RPQVHYDYNGFPYWGQGTPVTVSSA<br>STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC<br>LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT<br>FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ<br>TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD<br>KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP<br>KDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEV<br>KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN<br>STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC<br>KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ<br>VYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL<br>DSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVF<br>SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | | | 146 |
| | Маска | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT<br>SESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPE<br>DRSQPGQDSRFRVTQLPNGRDFHMS<br>VVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIK<br>ESLRAELRVTE | 33-146<br>PD-1 | PD-L1 | 143 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAKMSGRSANA | | | 147 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | VH | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCKAS GYTFTRSTMHWVRQAPGQGLEWIG YINPSSAYTNYNQKFKDRFTISADKS KSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARPQ VHYDYNGFPYWGQGTPVTVSS | hCris7 | CD3 | 108 |
| | HCDR1 | RSTMH | | | 109 |
| | HCDR2 | YINPSSAYTNYNQKFKD | | | 110 |
| | HCDR3 | PQVHYDYNGFPY | | | 111 |
| 22088 | Полная | VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEEL AQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNI WPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSD EGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVT LSVKAEAAAKEAAAKQVQLVESGG GVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRSTM HWVRQAPGQGLEWIGYINPSSAYTN YNQKFKDRFTISADKSKSTAFLQMDS LRPEDTGVYFCARPQVHYDYNGFPY WGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG | | | 148 |
| | Маска | VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEEL AQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNI WPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSD EGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVT | Вариабельный иммун | | 149 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | LSVKA | оглобулиноподобный домен CD-80 | | |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VH | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCKAS GYTFTRSTMHWVRQAPGQGLEWIG YINPSSAYTNYNQKFKDRFTISADKS KSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARPQ VHYDYNGFPYWGQGTPVTVSS | hCris7 | CD3 | 108 |
| | HCDR1 | RSTMH | | | 109 |
| | HCDR2 | YINPSSAYTNYNQKFKD | | | 110 |
| | HCDR3 | PQVHYDYNGFPY | | | 111 |
| 22091 | Полная | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNAEAAAKEAAAK DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCSAS SSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDSS KLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCQQWSRNPPTFGGGTKL QITRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC | | | 150 |
| | Маска | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY | 18-132 PD-L1 | PD-1 | 113 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | GGADYKRITVKVNA | | | |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCSAS SSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDSS KLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCQQWSRNPPTFGGGTKL QIT | hCris7 | CD3 | 103 |
| | LCDR1 | SASSSVSYMN | | | 104 |
| | LCDR2 | DSSKLAS | | | 105 |
| | LCDR3 | QQWSRNPPT | | | 106 |
| 22092 | Полная | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALQVFWMMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYTCLIAY KGADYKRITVKVNAEAAAKEAAAK DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCSAS SSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDSS KLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCQQWSRNPPTFGGGTKL QITRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC | | | 151 |
| | Маска | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALQVFWMMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYTCLIAY KGADYKRITVKVNA | 18-132 PD-L1 | PD-1 | 152 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCSAS SSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDSS | hCris7 | CD3 | 103 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | KLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCQQWSRNPPTFGGGTKL QIT | | | |
| | LCDR1 | SASSSVSYMN | | | 104 |
| | LCDR2 | DSSKLAS | | | 105 |
| | LCDR3 | QQWSRNPPT | | | 106 |
| 22094 | Полная | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNAEAAAKMSGRS ANADIQMTQSPSSLSASVGDRVTMT CSASSSVSYMNWYQQKPGKAPKRWI YDSSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLT ISSLQPEDFATYYCQQWSRNPPTFGG GTKLQITRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC | | | 153 |
| | Маска | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNA | 18-132 PD-L1 | PD-1 | 113 |
| | Линкер маски | EAAAKMSGRSANA | | | 154 |
| | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCSAS SSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDSS KLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCQQWSRNPPTFGGGTKL QIT | hCris7 | CD3 | 103 |
| | LCDR1 | SASSSVSYMN | | | 104 |
| | LCDR2 | DSSKLAS | | | 105 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | LCDR3 | QQWSRNPPT | | | 106 |
| 22105 | Полная | MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASP GKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAAT YMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVN LTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPY YLGIGNGTQIYVIDPEEAAAKEAAAK MSGRSANADIQMTQSPSSLSASVGDR VTMTCSASSSVSYMNWYQQKPGKA PKRWIYDSSKLASGVPARFSGSGSGT DYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSRNP PTFGGGTKLQITRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC | | | 155 |
| | Маска | MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASP GKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAAT YMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVN LTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPY YLGIGNGTQIYVIDPE | CTLA 4 38-155 IgV | | 156 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAKMSGRSANA | | | 147 |
| | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTMTCSAS SSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDSS KLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCQQWSRNPPTFGGGTKL QIT | hCris7 | CD3 | 103 |
| | LCDR1 | SASSSVSYMN | | | 104 |
| | LCDR2 | DSSKLAS | | | 105 |
| | LCDR3 | QQWSRNPPT | | | 106 |
| 23246 | Полная | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT SESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPED RSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSV VRARRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKE | | | 157 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | SLRAELRVTEEAAAKEAAAKQVQLK<br>QSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNY<br>GVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGN<br>TDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKM<br>NSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFA<br>YWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAP<br>SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV<br>SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN<br>TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL<br>LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT<br>ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN<br>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP<br>ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD<br>KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT<br>QKSLSLSPG | | | |
| | Маска | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT<br>SESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPED<br>RSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSV<br>VRARRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKE<br>SLRAELRVTE | 33-146<br>PD-1 | PD-L1 | 116 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VH | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSG<br>FSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVI<br>WSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQ<br>VFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYY<br>DYEFAYWGQGTLVTVSA | Цетук симаб | EGFR | 83 |
| | HCDR1 | NYGVH | | | 84 |
| | HCDR2 | VIWSGGNTDYNTPFTS | | | 85 |
| | HCDR3 | ALTYYDYEFAY | | | 86 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 23247 | Полная | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNAEAAAKEAAAK DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQS IGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESI SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDI ADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC | | | 158 |
| | Маска | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNA | 18-132 PD-L1 | PD-1 | 113 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQS IGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESI SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDI ADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELK | Цетук симаб | EGFR | 58 |
| | LCDR1 | RASQSIGTNIH | | | 59 |
| | LCDR2 | YASESIS | | | 60 |
| | LCDR3 | QQNNNWPTT | | | 61 |
| 23248 | Полная | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNAEAAAKEAAAK MSGRSANADILLTQSPVILSVSPGERV | | | 159 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | SFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPR<br>LLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTL<br>SINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFG<br>AGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQL<br>KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV<br>DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS<br>STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL<br>SSPVTKSFNRGEC | | | |
| | Маска | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP<br>VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV<br>HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS<br>LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY<br>GGADYKRITVKVNA | 18-132<br>PD-L1 | PD-1 | 113 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAKMSGRSANA | | | 147 |
| | VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQS<br>IGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESI<br>SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDI<br>ADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELK | Цетук симаб | EGFR | 58 |
| | LCDR1 | RASQSIGTNIH | | | 59 |
| | LCDR2 | YASESIS | | | 60 |
| | LCDR3 | QQNNNWPTT | | | 61 |
| 23253 | Полная | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT<br>SESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPED<br>RSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSV<br>VRARRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKE<br>SLRAELRVTEEAAAKEAAAKQVQLV<br>QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT<br>GYTMNWVRQAPGQGLEWMGLITPY<br>NGASSYNQKFRGKATMTVDTSTSTV<br>YMELSSLRSEDTAVYYCARGGYDGR<br>GFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP<br>LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG | | | 160 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH<br>KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP<br>APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP<br>EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG<br>VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL<br>TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA<br>PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE<br>LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES<br>NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK<br>LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH<br>NHYTQKSLSLSPG | | | |
| | Маска | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT<br>SESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPED<br>RSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSV<br>VRARRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKE<br>SLRAELRVTE | 33-146<br>PD-1 | PD-L1 | 116 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS<br>GYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWM<br>GLITPYNGASSYNQKFRGKATMTVD<br>TSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARG<br>GYDGRGFDYWGQGTLVTVSS | huRG<br>7787 | Мезот<br>елин | 68 |
| | HCDR1 | GYTMN | | | 69 |
| | HCDR2 | LITPYNGASSYNQKFRG | | | 70 |
| | HCDR3 | GGYDGRGFDY | | | 71 |
| 23256 | Полная | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP<br>VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV<br>HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS<br>LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY<br>GGADYKRITVKVNAEAAAKEAAAK<br>MSGRSANADIQMTQSPSSLSASVGDR<br>VTITCSASSSVSYMHWYQQKSGKAP<br>KLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDF | | | 161 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | TLTISSLQPEDFATYYCQQWSKHPLT FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC | | | |
| | Маска | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNA | 18-132 PD-L1 | PD-1 | 113 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAKMSGRSANA | | | 147 |
| | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASS SVSYMHWYQQKSGKAPKLLIYDTSK LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQWSKHPLTFGQGTKLE IK | huRG 7787 | Мезот елин | 73 |
| | LCDR1 | SASSSVSYMH | | | 74 |
| | LCDR2 | DTSKLAS | | | 75 |
| | LCDR3 | QQWSKHPLT | | | 76 |
| 23257 | Полная | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT SESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPED RSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSV VRARRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKE SLRAELRVTEEAAAKEAAAKQVTLR ESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTS GMGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWD DDKRYNPALKSRLTISKDTSKNQVVL TMTNMDPVDTAAYYCARMELWSYY FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK | | | 162 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG | | | |
| | Маска | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT SESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPED RSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSV VRARRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKE SLRAELRVTE | 33-146 PD-1 | PD-L1 | 116 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VH | QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSG FSLSTSGMGVGWIRQPPGKALEWLA HIWWDDDKRYNPALKSRLTISKDTS KNQVVLTMTNMDPVDTAAYYCAR MELWSYYFDYWGQGTLVTVSS | SGN-CD19a | CD19 | 63 |
| | HCDR1 | TSGMGVG | | | 64 |
| | HCDR2 | HIWWDDDKRYNPALKS | | | 65 |
| | HCDR3 | MELWSYYFDY | | | 66 |
| 23258 | Полная | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNAEAAAKEAAAK EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSS VSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKL ASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCFQGSVYPFTFGQGTKLEIKR | | | 163 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL<br>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS<br>QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD<br>YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN<br>RGEC | | | |
| | Маска | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP<br>VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV<br>HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS<br>LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY<br>GGADYKRITVKVNA | 18-132<br>PD-L1 | PD-1 | 113 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VL | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSS<br>VSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKL<br>ASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED<br>FAVYYCFQGSVYPFTFGQGTKLEIK | SGN-<br>CD19a | CD19 | 164 |
| | LCDR1 | SASSSVSYMH | | | 74 |
| | LCDR2 | DTSKLAS | | | 75 |
| | LCDR3 | FQGSVYPFT | | | 165 |
| 23260 | Полная | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP<br>VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV<br>HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS<br>LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY<br>GGADYKRITVKVNAEAAAKEAAAK<br>MSGRSANAEIVLTQSPATLSLSPGER<br>ATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAP<br>RLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDF<br>TLTISSLEPEDFAVYYCFQGSVYPFTF<br>GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL<br>KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV<br>DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS<br>STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL<br>SSPVTKSFNRGEC | | | 166 |
| | Маска | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP | 18-132 | PD-1 | 113 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV<br>HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS<br>LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY<br>GGADYKRITVKVNA | PD-L1 | | |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAKMSGRSANA | | | 147 |
| | VL | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSS<br>VSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKL<br>ASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED<br>FAVYYCFQGSVYPFTFGQGTKLEIK | SGN-CD19a | CD19 | 164 |
| | LCDR1 | SASSSVSYMH | | | 74 |
| | LCDR2 | DTSKLAS | | | 75 |
| | LCDR3 | FQGSVYPFT | | | 165 |
| 23261 | Полная | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT<br>SESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPED<br>RSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSV<br>VRARRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKE<br>SLRAELRVTEEAAAKEAAAKEVQLV<br>ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKE<br>YYMHWVRQAPGKGLEWVGLIDPEQ<br>GNTIYDPKFQDRATISADNSKNTAYL<br>QMNSLRAEDTAVYYCARDTAAYFD<br>YWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS<br>SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS<br>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT<br>KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL<br>GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<br>AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ<br>DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS<br>KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ<br>VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK | | | 167 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG | | | |
| | Маска | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT SESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPED RSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSV VRARRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKE SLRAELRVTE | 33-146 PD-1 | PD-L1 | 116 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFNIKEYYMHWVRQAPGKGLEWVG LIDPEQGNTIYDPKFQDRATISADNSK NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDT AAYFDYWGQGTLVTVSS | D3H4 4 | TF | 53 |
| | HCDR1 | EYYMH | | | 54 |
| | HCDR2 | LIDPEQGNTIYDPKFQD | | | 55 |
| | HCDR3 | DTAAYFDY | | | 56 |
| 23262 | Полная | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNAEAAAKEAAAK DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASR DIKSYLNWYQQKPGKAPKVLIYYAT SLAEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCLQHGESPWTFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC | | | 168 |
| | Маска | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS | 18-132 PD-L1 | PD-1 | 113 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNA | | | |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASR DIKSYLNWYQQKPGKAPKVLIYYAT SLAEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCLQHGESPWTFGQGTKV EIK | D3H44 | TF | 47 |
| | LCDR1 | RASRDIKSYLN | | | 48 |
| | LCDR2 | YATSLAE | | | 49 |
| | LCDR3 | LQHGESPWT | | | 50 |
| 23264 | Полная | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNAEAAAKEAAAK MSGRSANADIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASRDIKSYLNWYQQKPGKAP KVLIYYATSLAEGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCLQHGESPW TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC | | | 169 |
| | Маска | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNA | 18-132 PD-L1 | PD-1 | 113 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAKMSGRSANA | | | 147 |
| | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASR | D3H4 | TF | 47 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | DIKSYLNWYQQKPGKAPKVLIYYAT SLAEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCLQHGESPWTFGQGTKV EIK | 4 | | |
| | LCDR1 | RASRDIKSYLN | | | 48 |
| | LCDR2 | YATSLAE | | | 49 |
| | LCDR3 | LQHGESPWT | | | 50 |
| 23567 | Полная | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSG FSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVI WSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQ VFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYY DYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG | | | 170 |
| | VH | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSG FSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVI WSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQ VFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYY DYEFAYWGQGTLVTVSA | Цетук симаб | EGFR | 83 |
| | HCDR1 | NYGVH | | | 84 |
| | HCDR2 | VIWSGGNTDYNTPFTS | | | 85 |
| | HCDR3 | ALTYYDYEFAY | | | 86 |
| 23712 | Полная | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS | | | 171 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | GYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWM<br>GWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTR<br>DTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCA<br>RDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTL<br>VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT<br>AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT<br>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS<br>SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV<br>EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH<br>EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR<br>EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG<br>KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ<br>PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL<br>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT<br>TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ<br>GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS<br>PG | | | |
| | VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS<br>GYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWM<br>GWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTR<br>DTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCA<br>RDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTL<br>VTVSS | CP-870\|893 | CD40 | 172 |
| | HCDR1 | GYYMH | | | 173 |
| | HCDR2 | WINPDSGGTNYAQKFQG | | | 174 |
| | HCDR3 | DQPLGYCTNGVCSYFDY | | | 175 |
| 23713 | Полная | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRAS<br>QGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTA<br>STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL<br>QPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKV<br>EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS<br>VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ<br>SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS<br>KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK | | | 176 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | SFNRGEC | | | |
| | VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRAS QGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKV EIK | CP-870\|893 | CD40 | 177 |
| | LCDR1 | RASQGIYSWLA | | | 178 |
| | LCDR2 | TASTLQS | | | 179 |
| | LCDR3 | QQANIFPLT | | | 180 |
| 23714 | Полная | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT SESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPED RSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSV VRARRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKE SLRAELRVTEEAAAKEAAAKQVQLV QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT GYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINP DSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIST AYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPL GYCTNGVCSYFDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | | | 181 |
| | Маска | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT SESFHVVWHRESPSGQTDTLAAFPED | 33-146 PD-1 | PD-L1 | 116 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | RSQPGQDARFRVTQLPNGRDFHMSV VRARRNDSGTYVCGVISLAPKIQIKE SLRAELRVTE | | | |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWM GWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTR DTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCA RDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQGTL VTVSS | CP-870\|893 | CD40 | 172 |
| | HCDR1 | GYYMH | | | 173 |
| | HCDR2 | WINPDSGGTNYAQKFQG | | | 174 |
| | HCDR3 | DQPLGYCTNGVCSYFDY | | | 175 |
| 23715 | Полная | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNAEAAAKEAAAK DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRAS QGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC | | | 182 |
| | Маска | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNA | 18-132 PD-L1 | PD-1 | 113 |
| | Линкер | EAAAKEAAAK | | | 114 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | маски | | | | |
| | VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRAS QGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKV EIK | CP-870\|893 | CD40 | 177 |
| | LCDR1 | RASQGIYSWLA | | | 178 |
| | LCDR2 | TASTLQS | | | 179 |
| | LCDR3 | QQANIFPLT | | | 180 |
| 23716 | Полная | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNAEAAAKEAAAK MSGRSANADIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGK APNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQANIFPL TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC | | | 183 |
| | Маска | AFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFP VEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFV HGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISY GGADYKRITVKVNA | 18-132 PD-L1 | PD-1 | 113 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAKMSGRSANA | | | 147 |
| | VL | DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRAS QGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKV | CP-870\|893 | CD40 | 177 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | EIK | | | |
| | LCDR1 | RASQGIYSWLA | | | 178 |
| | LCDR2 | TASTLQS | | | 179 |
| | LCDR3 | QQANIFPLT | | | 180 |
| 24659 | Полная | VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEEL<br>AQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNI<br>WPEYKNRTSFDITNNLSISISALRPSD<br>EGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVT<br>LSVKAEAAAKEAAAKQVQLVESGG<br>GVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRSTM<br>HWVRQAPGQGLEWIGYINPSSAYTN<br>YNQKFKDRFTISADKSKSTAFLQMDS<br>LRPEDTGVYFCARPQVHYDYNGFPY<br>WGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSS<br>KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS<br>WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS<br>SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT<br>KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA<br>AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH<br>NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT<br>ISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKN<br>QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP<br>ENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVD<br>KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT<br>QKSLSLSPG | | | 184 |
| | Маска | VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEEL<br>AQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNI<br>WPEYKNRTSFDITNNLSISISALRPSD<br>EGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVT<br>LSVKA | Вариабельный иммуноглобулиноподобный | | 185 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | домен CD-80 | | |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VH | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCKAS GYTFTRSTMHWVRQAPGQGLEWIG YINPSSAYTNYNQKFKDRFTISADKS KSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARPQ VHYDYNGFPYWGQGTPVTVSS | hCris7 | CD3 | 108 |
| | HCDR1 | RSTMH | | | 109 |
| | HCDR2 | YINPSSAYTNYNQKFKD | | | 110 |
| | HCDR3 | PQVHYDYNGFPY | | | 111 |
| 24660 | Полная | VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEEL AQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDSNI WPEYKNRTIFDSTNNLSIVILALRPSD EGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVT LSVKAEAAAKEAAAKQVQLVESGG GVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRSTM HWVRQAPGQGLEWIGYINPSSAYTN YNQKFKDRFTISADKSKSTAFLQMDS LRPEDTGVYFCARPQVHYDYNGFPY WGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT | | | 186 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | QKSLSLSPG | | | |
| | Маска | VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDSNIWPEYKNRTIFDSTNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLSVKA | Вариабельный иммуноглобулиноподобный домен CD-80 | | 187 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VH | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRSTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSSAYTNYNQKFKDRFTISADKSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARPQVHYDYNGFPYWGQGTPVTVSS | hCris7 | CD3 | 108 |
| | HCDR1 | RSTMH | | | 109 |
| | HCDR2 | YINPSSAYTNYNQKFKD | | | 110 |
| | HCDR3 | PQVHYDYNGFPY | | | 111 |
| 24661 | Полная | VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSSEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLSVKAEAAAKEAAAKQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFTRSTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSSAYTNYNQKFKDRFTISADKSKSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARPQVHYDYNGFPYWGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV | | | 188 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG | | | |
| | Маска | VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSSEELA QTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIW PEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEG TYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLS VKA | Вариабельный иммуноглобулиноподобный домен CD-80 | | 189 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VH | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCKAS GYTFTRSTMHWVRQAPGQGLEWIG YINPSSAYTNYNQKFKDRFTISADKS KSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARPQ VHYDYNGFPYWGQGTPVTVSS | hCris7 | CD3 | 108 |
| | HCDR1 | RSTMH | | | 109 |
| | HCDR2 | YINPSSAYTNYNQKFKD | | | 110 |
| | HCDR3 | PQVHYDYNGFPY | | | 111 |
| 23734 | Полная | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSN TSESFVLNWYRMSPSNQTDALAAFP EDRSQPGQDSRFRVTQLPNGRDFHM SVVRARRNDSGTYLCGAASLAPKAQ | | | 190 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | IKESLRAELRVTEEAAAKEAAAKQV<br>QLVESGGGVVQPGRSLRLSCKASGY<br>TFTRSTMHWVRQAPGQGLEWIGYIN<br>PSSAYTNYNQKFKDRFTISADKSKST<br>AFLQMDSLRPEDTGVYFCARPQVHY<br>DYNGFPYWGQGTPVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS<br>SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV<br>NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP<br>PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS<br>RTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYV<br>DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL<br>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSR<br>DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFA<br>LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH<br>EALHNHYTQKSLSLSPG | | | |
| | Маска | NPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSN<br>TSESFVLNWYRMSPSNQTDALAAFP<br>EDRSQPGQDSRFRVTQLPNGRDFHM<br>SVVRARRNDSGTYLCGAASLAPKAQ<br>IKESLRAELRVTE | 33-146<br>PD-1 | PD-L1 | 191 |
| | Линкер маски | EAAAKEAAAK | | | 114 |
| | VH | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCKAS<br>GYTFTRSTMHWVRQAPGQGLEWIG<br>YINPSSAYTNYNQKFKDRFTISADKS<br>KSTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARPQ<br>VHYDYNGFPYWGQGTPVTVSS | hCris7 | CD3 | 108 |
| | HCDR1 | RSTMH | | | 109 |
| | HCDR2 | YINPSSAYTNYNQKFKD | | | 110 |
| | HCDR3 | PQVHYDYNGFPY | | | 111 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | LCDR2 | RSYQRPS | | | 199 |
| | LCDR3 | ATWDDSLDGWV | | | 200 |
| 11018 | Полная | GQVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCRASGYIFTESGITWVRQAPGQGLEWMGWISGYSGDTKYAQKLQGRVTMTKDTSTTTAYMELRSLRYDDTAVYYCARDVQYSGSYLGAYYFDYWSPGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGTNYVYWYQQFPGTAPKLLIYRSYQRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLDGWVFGGGTKLTVLAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | | | 192 |
| | VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCRASGYIFTESGITWVRQAPGQGLEWMGWISGYSGDTKYAQKLQGRVTMTKDTSTTTAYMELRSLRYDDTAVYYCARDVQYSGSYLGAYYFDYWSPGTLVTVSS | CR8071 | Гемаглютинин | 193 |
| | VL | QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGTNYVYWYQQFPGTAPKLLIYRSYQRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLDGWVFGGGTKLTVL | CR8071 | Гемаглютинин | 194 |
| | HCDR1 | ESGIT | | | 195 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | HCDR2 | WISGYSGDTKYAQKLQG | | | 196 |
| | HCDR3 | DVQYSGSYLGAYYFDY | | | 197 |
| | LCDR1 | SGSSSNIGTNYVY | | | 198 |
| | LCDR2 | RSYQRPS | | | 199 |
| | LCDR3 | ATWDDSLDGWV | | | 200 |
| 25321 | Полная | EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTI<br>TSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQR<br>QGPFPRVTTVSETTKRENMDFSISISN<br>ITPADAGTYYCIKFRKGSPDTEFKSG<br>AGTELSVRAMSGRSANAQVQLKQSG<br>PGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGV<br>HWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTD<br>YNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNS<br>LQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYW<br>GQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSK<br>STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS<br>VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK<br>VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG<br>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA<br>KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK<br>AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS<br>LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN<br>NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK<br>SLSLSPG | | | 201 |
| | Маска | EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTI<br>TSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQR<br>QGPFPRVTTVSETTKRENMDFSISISN<br>ITPADAGTYYCIKFRKGSPDTEFKSG<br>AGTELSVRA | SIRPa<br>_d1_v<br>2 | CD47 | 202 |
| | Линкер | MSGRSANA | | | 203 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | маски | | | | |
| | VH | QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSG FSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVI WSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQ VFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYY DYEFAYWGQGTLVTVSA | Цетук симаб | EGFR | 83 |
| | HCDR1 | NYGVH | | | 84 |
| | HCDR2 | VIWSGGNTDYNTPFTS | | | 85 |
| | HCDR3 | ALTYYDYEFAY | | | 86 |
| 25325 | Полная | QLLFNKTKSVEFTFGNDTVVIPCFVT NMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTF DGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKG DASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIELKYRVMSGRSANADILLT QSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNI HWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPS RFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYY CQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C | | | 204 |
| | Маска | QLLFNKTKSVEFTFGNDTVVIPCFVT NMEAQNTTEVYVKWKFKGRDIYTF DGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKG DASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTEL TREGETIIELKYRV | CD47 | | 205 |
| | Линкер маски | MSGRSANA | | | 203 |
| | VL | DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASE SISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESE DIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLEL | Цетук симаб | EGFR | 58 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | K | | | |
| | LCDR1 | RASQSIGTNIH | | | 59 |
| | LCDR2 | YASESIS | | | 60 |
| | LCDR3 | QQNNNWPTT | | | 61 |

**Таблица BB. Последовательности паратопа анти-CD3**

| **Паратоп анти-CD3** | **Тип последовательности** | **Последовательность** | **SEQ ID NO:** |
|---|---|---|---|
| 1 | VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG VTFNYYGMSWIRQAPGKGLEWVASIT SSGGRIYYPDSVKGRFTISRENTQKTLY LQMNSLRAEDTAVYYCTLDGRDGWV AYWGQGTLVTVSS | 206 |
| | HCDR1 по Kabat | YYGMS | 207 |
| | HCDR2 по Kabat | SITSSGGRIYYPDSVKG | 208 |
| | HCDR3 по Kabat | DGRDGWVAY | 209 |
| | VL | NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCKRNTG NIGSNYVNWYQQHEGSSPTTIIYRNDK RPDGVSDRFSGSIDRSSKSASLTISNLK TEDEADYFCQSYSSGFIFGGGTKLTVL | 210 |
| | LCDR1 по Kabat | KRNTGNIGSNYVN | 211 |
| | LCDR2 по Kabat | RNDKRPD | 212 |
| | LCDR3 по Kabat | QSYSSGFI | 214 |
| 2 | | | |
| | VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG VTFNYYGMSWIRQAPGKGLEWVASIT RSGGRIYYPDSVKGRFTISRENTQKTLY | 215 |

| **Паратоп анти-CD3** | **Тип последовательности** | **Последовательность** | **SEQ ID NO:** |
|---|---|---|---|
| | | LQMNSLRAEDTAVYYCTLDGRDGWV AYWGQGTLVTVSS | |
| | HCDR1 по Kabat | YYGMS | 216 |
| | HCDR2 по Kabat | SITRSGGRIYYPDSVKG | 217 |
| | HCDR3 по Kabat | DGRDGWVAY | 218 |
| | VL | NFMLTQPSSVSGVPGQRVTISCTGNTG NIGSNYVNWYQQLPGTAPKLLIYRDD KRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGFQA EDEADYYCQSYSSGFIFGGGTKLTVL | 219 |
| | LCDR1 по Kabat | TGNTGNIGSNYVN | 220 |
| | LCDR2 по Kabat | RDDKRPS | 221 |
| | LCDR3 по Kabat | QSYSSGFI | 222 |
| 3 | | | |
| | VH | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSK NTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS | 223 |
| | HCDR1 по Kabat | KYAMN | 224 |
| | HCDR2 по Kabat | RIRSKYNNYATYYADSVKD | 225 |
| | HCDR3 по Kabat | HGNFGNSYISYWAY | 226 |
| | VL | QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTG | 227 |

| **Паратоп анти-CD3** | **Тип последовательности** | **Последовательность** | **SEQ ID NO:** |
|---|---|---|---|
| | | AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTK LTVL | |
| | LCDR1 по Kabat | GSSTGAVTSGNYPN | 228 |
| | LCDR2 по Kabat | GTKFLAP | 229 |
| | LCDR3 по Kabat | VLWYSNRWV | 230 |
| 4 | | | |
| | VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRS KYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFG NSYVSWFAYWGQGTLVTVSS | 231 |
| | HCDR1 по Kabat | TYAMN | 232 |
| | HCDR2 по Kabat | RIRSKYNNYATYYADSVKG | 233 |
| | HCDR3 по Kabat | HGNFGNSYVSWFAY | 234 |
| | VL | QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTG AVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGT NKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGA QPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTK LTVL | 235 |
| | LCDR1 по Kabat | GSSTGAVTTSNYAN | 236 |
| | LCDR2 по Kabat | GTNKRAP | 237 |

| **Паратоп анти-CD3** | **Тип последовательности** | **Последовательность** | **SEQ ID NO:** |
|---|---|---|---|
| | LCDR3 по Kabat | ALWYSNLWV | 238 |
| 5 | VH | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTRSTMHWVRQAPGQGLEWIGYIN PSSAYTNYNQKFKDRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCASPQVHYDY NGFPYWGQGTLVTVSS | 239 |
| | HCDR1 по Kabat | RSTMH | 240 |
| | HCDR2 по Kabat | YINPSSAYTNYNQKFKD | 241 |
| | HCDR3 по Kabat | PQVHYDYNGFPY | 242 |
| | VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSS VSYMNWYQQKPGKAPKRLIYDSSKLA SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFA TYYCQQWSRNPPTFGGGTKVEIK | 243 |
| | LCDR1 по Kabat | SASSSVSYMN | 244 |
| | LCDR2 по Kabat | DSSKLAS | 245 |
| | LCDR3 по Kabat | QQWSRNPPT | 246 |

**Таблица CC Последовательности IgV IgSF**

| **Название члена IgSF** | **Идентификатор Uniprot** | **Остатки** | **Аминокислотная последовательность домена IgV** | **SEQ ID NO** |
|---|---|---|---|---|
| CD80 | P33681 | 35-135 | VIHVTK EVKEVATLSC GHNVSVEELA | 247 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | | QTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMN IWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRP SD EGTYECVVLK YEKDAFKREH LAEVT | |
| CD86 | P42081 | 33-131 | NETADLPC QFANSQNQSLSELVVFWQDQ ENLVLNEVYL GKEKFDSVHS KYMGRTSFDS DSWTLRLHNLQIKDKGLYQC IIHHKKPTGM IRIHQMNSEL S | 248 |
| PD-L1 | Q9NZQ 7 | 19-127 | FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDLAALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRIT | 249 |
| PD-L2 | Q9BQ51 | 21-118 | FTVTVPKELY IIEHGSNVTL ECNFDTGSHV NLGAITASLQ KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASFHIP QVQVRDEGQYQCIIIYGVAW DYKYLTLK | 250 |
| CTLA-4 | P16410 | 39-140 | HV AQPAVVLASSRGIASFVCEY ASPGKATEVR VTVLRQADSQ VTEVCAATYM MGNELTFLDDSICTGTSSGN QVNLTIQGLR AMDTGLYICK VELMYPPPYY | 251 |
| PD-1 | Q15116 | 35-145 | PTFSPA LLVVTEGDNATFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQLPNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVT | 252 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| CD28 | P10747 | 28-137 | MLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSRE FRASLHKGLDSAVEVCVVYGNYS QQLQVYSKTGFNCDGKL GNESVTFYLQNLYVNQTDIY FCKIEVMYPP PYLDNEKSNG TIIHVKG | 253 |
| CD47 | Q08722 | 19-127 | QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCF VTNMEAQNTTEVYVKWKFKGRDI YTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVS QLLKGDASLKMDKSDAVSHTGN YTCEVTELTREGETII | 254 |
| SIRPa | P78324 | 32-137 | EELQVIQPDKSVLVAAGETATLRC TATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIY NQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMD FSIRIGNITPADAGTYYCVKFRKGS PDDVEFKSG | 255 |
| ICOSL | O75144 | 19-129 | DTQEKEVRAMVGSDVELSCACPE GSRFDLNDVYVYWQTSESKTVVT YHIPQNSSLENVDSRYRNRALMSP AGMLRGDFSLRLFNVTPQDEQKF HCLVLSQSLGFQEVLSVE | 256 |
| ICOS | Q9Y6W 8 | 30-132 | MFIFHNGGVQILCKYPDIVQQFKM QLLKGGQILCDLTKTKGSGNTVSI KSLKFCHSQLSNNSVSFFLYNLDH SHANYYFCNLSIFDPPPFKVTLTG GYLHIYE | 257 |
| CD276 | Q5ZPR3 | 29-139 | LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSF SPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLV HSFAEGQDQGSAYANRTALFPDL LAQGNASLRLQRVRVADEGSFTC FVSIRDFGSAAVSLQVA | 258 |
| 35-146 VTCN1 | Q7Z7D3 | 35-146 | HSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFE PDIKLSDIVIQWLKEGVLGLVHEF KEGKDELSEQDEMFRGRTAVFAD | 259 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | | QVIVGNASLRLKNVQLTDAGTYK CYIITSKGKGNANLEYK | |
| VISTA | Q9H7M9 | 33-168 | FKVATPYSLYVCPEGQNVTLTCRL LGPVDKGHDVTFYKTWYRSSRGE VQTCSERRPIRNLTFQDLHLHHGG HQAANTSHDLAQRHGLESASDHH GNFSITMRNLTLLDSGLYCCLVVE IRHHHSEHRVHGAMELQV | 260 |
| NCR3LG1 | Q68D85 | 27-138 | KVEMMAGGTQITPLNDNVTIFCNI FYSQPLNITSMGITWFWKSLTFDK EVKVFEFFGDHQEAFRPGAIVSPW RLKSGDASLRLPGIQLEEAGEYRC EVVVTPLKAQGTVQLE | 261 |
| HHLA2 | Q9UM44 | 61-131 | IHWKYQDSYKVHSYYKGSDHLES QDPRYANRTSLFYNEIQNGNASLF FRRVSLLDEGIYTCYVGTAIQVIT | 262 |
| CD28H | Q96BF3 | 23-129 | LSVQQGPNLLQVRQGSQATLVCQ VDQATAWERLRVKWTKDGAILC QPYITNGSLSLGVCGPQGRLSWQA PSHLTLQLDPVSLNHSGAYVCWA AVEIPELEEAEGNIT | 263 |
| NKp30 | O14931 | 19-126 | LWVSQPPEIRTLEGSSAFLPCSFNA SQGRLAIGSVTWFRDEVVPGKEV RNGTPEFRGRLAPLASSRFLHDHQ AELHIRDVRGHDASIYVCRVEVLG LGVGTGNGTRLV | 264 |
| Линкер маски | | | GPPPG | 265 |
| Линкер маски | | | GGPPPGG | 266 |
| Линкер маски | | | GPPPPG | 267 |
| Линкер маски | | | GGPPPGG | 268 |

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

**1.** Слитый белок, содержащий:

биологически функциональный белок, пару лиганд-рецептор, первый пептидный линкер и второй пептидный линкер; причем

биологически функциональный белок содержит по меньшей мере первый полипептид и второй полипептид; и

пара лиганд-рецептор содержит внеклеточную часть рецептора суперсемейства иммуноглобулинов и его родственный лиганд или его рецептор-связывающий фрагмент; при этом

лиганд слит с концом первого полипептида посредством первого пептидного линкера;

рецептор слит с тем же соответствующим концом второго полипептида посредством второго пептидного линкера; а первый и второй пептидные линкеры имеют достаточную длину, чтобы обеспечить спаривание лиганда и рецептора, и по меньшей мере один из первого и второго пептидных линкеров содержит сайт расщепления протеазой.

**2.** Слитый белок по п. 1, в котором лиганд и рецептор содержат внеклеточную часть полипептида суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF – англ.: immunoglobulin superfamily).

**3.** Слитый белок по п. 1, в котором лиганд и рецептор содержат внеклеточную часть полипептида вариабельного домена иммуноглобулина (IgV – англ.: immunoglobulin variable).

**4.** Слитый белок по любому из пп. 1-3, в котором биологически функциональный белок содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела.

**5.** Слитый белок по п. 1, в котором биологически функциональный белок состоит из полипептидного каркаса.

**6.** Слитый белок по п. 5, в котором полипептидный каркас представляет собой димерную область Fc, причем первый полипептид состоит из первого полипептида Fc, а второй полипептид состоит из второго полипептида Fc, при этом первый и второй полипептиды Fc образуют димерную область Fc.

**7.** Слитый белок по п. 1, в котором биологически функциональный белок содержит полипептидный каркас.

**8.** Слитый белок по п. 7, в котором полипептидный каркас содержит димерную область Fc.

**9.** Слитый белок по одному из пп. 6 или 8, в котором димерная область Fc представляет собой гетеродимерную Fc.

**10.** Слитый белок по любому из вышеуказанных пунктов, в котором по меньшей мере один из лиганда или рецептора в паре лиганд-рецептор способен связываться с иммуномодулирующей мишенью.

**11.** Слитый белок по любому из вышеуказанных пунктов, в котором пара лиганд-рецептор участвует в клеточном ответе, выбранном из группы, состоящей из: модуляции иммунной контрольной точки, модуляции активности иммунных клеток, модуляции сигналинга Т-клеточного рецептора, модуляции зависимой от Т-клеток цитотоксичности (TDCC), модуляции антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и модуляции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

**12.** Слитый белок по любому из вышеуказанных пунктов, в котором рецептор содержит одну или более мутаций, которые увеличивают или уменьшают аффинность связывания рецептора с его родственным лигандом по сравнению с рецептором дикого типа.

**13.** Слитый белок по любому из вышеуказанных пунктов, в котором лиганд содержит одну или более мутаций, которые увеличивают или уменьшают аффинность связывания лиганда с его родственным рецептором по сравнению с лигандом дикого типа.

**14.** Слитый белок по любому из вышеуказанных пунктов, в котором пара лиганд-рецептор выбрана из группы, состоящей из: PD1-PDL1, PD1-PDL2, CTLA4-CD80, CD28-CD80, CD28-CD86, CTLA4-CD86, PDL1-CD80, ICOS-ICOSL, NCRSRLG1-NKp30 и CD47-SIRPa.

**15.** Слитый белок по п. 14, в котором пара лиганд-рецептор представляет собой PD1-PDL1.

**16.** Слитый белок по п. 15, в котором лиганд PDL1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 8.

**17.** Слитый белок по п. 15 или п. 16, в котором рецептор PD1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 9.

**18.** Слитый белок по п. 14, в котором пара лиганд-рецептор представляет собой CTLA4-CD80.

**19.** Слитый белок по п. 18, в котором лиганд CD80 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 187 или SEQ ID NO: 189.

**20.** Слитый белок по п. 18 или п. 19, в котором рецептор CTLA4 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 26.

**21.** Слитый белок по п. 14, в котором пара лиганд-рецептор выбрана из группы, состоящей из: CTLA4-CD80, PDL1-CD80 и CD28-CD80, и при этом лиганд CD80 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 25, которая имеет мутации, выбранные из группы, состоящей из:

(a) H18Y, A26E, E35D, M47S, I61S и D90G; (b) E35D, M47S, N48K, I61S, K89N; (c) E35D, D46V, M47S, I61S, D90G, K93E; или (d) H18Y, A26E, E35D, M47S, I61S, V68M, A71G, D90G; (e) I58S, V68S, L70S; (f) M47S, I61S или (g) V22S.

**22.** Слитый белок по любому из вышеуказанных пунктов, в котором рецептор и лиганд слиты с соответствующими N-концами первого и второго полипептидов.

**23.** Слитый белок по любому из вышеуказанных пунктов, в котором один из первого или второго пептидных линкеров содержит более одного сайта расщепления протеазой.

**24.** Слитый белок по любому из вышеуказанных пунктов, в котором один из пептидных линкеров, слитых с лигандом или рецептором, сконструирован таким образом, чтобы он содержал один или более дополнительных сайтов расщепления протеазой, и при этом один или более сайтов расщепления протеазой в лиганде или рецепторе и сайт расщепления протеазой в первом или втором пептидном линкере расщепляются одной и той же протеазой или разными протеазами.

**25.** Слитый белок по любому из вышеуказанных пунктов, в котором протеаза выбрана из группы, состоящей из: сериновой протеазы, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP18 (коллагеназы 4), MMP19, MMP20, MMP21, адамализина, серрализина, астацина, каспазы 1, каспазы 2, каспазы 3, каспазы 4, каспазы 5, каспазы 6, каспазы 7, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, каспазы 11, каспазы 12, каспазы 13, каспазы 14, катепсина A, катепсина B, катепсина D, катепсина E, катепсина K, катепсина S, гранзима B, гуанидинобензоатазы (GB), гепсина, эластазы, легумаина, матриптазы, матриптазы 2, меприна, нейрозина, MT-SP1, неприлизина, плазмина, PSA, PSMA, TACE, TMPRSS3, TMPRSS4, uPA, кальпаина, FAP и KLK.

**26.** Слитый белок по п. 25, в котором протеаза представляет собой uPA или матриптазу.

**27.** Слитый белок по любому из вышеуказанных пунктов, в котором пептидный линкер имеет длину 3–50 или 5–20 аминокислот.

**28.** Слитый белок по любому из вышеуказанных пунктов, в котором один из первого или второго пептидных линкеров не имеет сайта расщепления протеазой.

**29.** Слитый белок по любому из вышеуказанных пунктов, в котором пептидный линкер представляет собой линкер ($Gly_nSer$), причем линкер ($Gly_nSer$) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из $(Gly_3Ser)_n(Gly_4Ser)_1$, $(Gly_3Ser)_1(Gly_4Ser)_n$, $(Gly_3Ser)_n(Gly_4Ser)_n$ и $(Gly_4Ser)_n$, где n является целым числом от 1 до 5.

**30.** Слитый белок по любому из вышеуказанных пунктов, в котором пептидный линкер представляет собой линкер $(EAAAK)_n$, где n является целым числом от 1 до 5.

**31.** Слитый белок по п. 30, в котором пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность EAAAKEAAAK (SEQ ID. NO: 38).

**32.** Слитый белок по любому из вышеуказанных пунктов, в котором пептидный линкер представляет собой полипролиновый линкер, необязательно PPP или PPPP, или глицин-пролиновый линкер, необязательно GPPPG. GGPPPGG, GPPPPG или GGPPPPGG.

**33.** Слитый белок по любому из вышеуказанных пунктов, в котором пептидный линкер содержит последовательность шарнирной области иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую до 30 процентов различий в идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью шарнирной области иммуноглобулина дикого типа.

**34.** Слитый белок по любому из вышеуказанных пунктов, в котором пептидный линкер содержит сайт расщепления протеазой, содержащий аминокислотную последовательность MSGRSANA (SEQ ID NO: 28).

**35.** Слитый белок по любому из пп. 1–4, в котором по меньшей мере один из первого и второго полипептидов содержит первый полипептид VH и первый полипептид VL, причем первые полипептиды VH и VL образуют первый антигенсвязывающий домен антитела, где лиганд слит с одним из первых полипептидов VH или VL посредством первого пептидного линкера, а рецептор слит с другим из первых полипептидов VH или VL посредством второго пептидного линкера, и где пара лиганд-рецептор стерически препятствует связыванию первого антигенсвязывающего домена с его родственным антигеном.

**36.** Слитый белок по п. 35, в котором первый и второй полипептиды дополнительно содержат димерную Fc.

**37.** Слитый белок по п. 36, в котором димерная область Fc представляет собой

гетеродимерную Fc.

**38.** Слитый белок по любому из пп. 35–37, в котором по меньшей мере один из лиганда или рецептора пары лиганд-рецептор способен связываться с иммуномодулирующей мишенью.

**39.** Слитый белок по любому из пп. 35–38, в котором пара лиганд-рецептор участвует в клеточном ответе, выбранном из группы, состоящей из: модуляции иммунной контрольной точки, модуляции активности иммунных клеток, модуляции сигналинга Т-клеточного рецептора, модуляции зависимой от Т-клеток цитотоксичности (TDCC), модуляции антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и модуляции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

**40.** Слитый белок по любому из пп. 35–38, в котором рецептор содержит одну или более мутаций, которые увеличивают или уменьшают аффинность связывания рецептора с его родственным лигандом по сравнению с рецептором дикого типа.

**41.** Слитый белок по любому из пп. 35–40, в котором лиганд содержит одну или более мутаций, которые увеличивают или уменьшают аффинность связывания лиганда с его родственным рецептором по сравнению с лигандом дикого типа.

**42.** Слитый белок по любому из пп. 35–41, в котором пара лиганд-рецептор выбрана из группы, состоящей из: PD1-PDL1, PD1-PDL2, CTLA4-CD80, CD28-CD80, CD28-PDL1, CD28-CD86, CTLA4-CD86, PDL1-CD80, ICOS-ICOSL, NCRSRLG1-NKp30 и CD47-SIRPa.

**43.** Слитый белок по п. 42, в котором пара лиганд-рецептор представляет собой PD1-PDL1.

**44.** Слитый белок по п. 43, в котором лиганд PD-L1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 8.

**45.** Слитый белок по п. 43 или п. 44, в котором рецептор PD1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 9.

**46.** Слитый белок по п. 42, в котором пара лиганд-рецептор представляет собой CTLA4-CD80.

**47.** Слитый белок по п. 46, в котором лиганд CD80 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 25.

**48.** Слитый белок по п. 42, в котором пара лиганд-рецептор выбрана из группы, состоящей из: CTLA4-CD80, PDL1-CD80 и CD28-CD80, при этом лиганд CD80 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 25, которая имеет мутации, выбранные из группы, состоящей из:

(a) H18Y, A26E, E35D, M47S, I61S и D90G; (b) E35D, M47S, N48K, I61S, K89N; (c) E35D,

D46V, M47S, I61S, D90G, K93E; (d) H18Y, A26E, E35D, M47S, I61S, V68M, A71G, D90G; (e) I58S, V68S, L70S; (f) M47S, I61S или (g) V22S.

**49.** Слитый белок по любому из пп. 46–48, в котором рецептор CTLA4 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 26.

**50.** Слитый белок по п. 48, в котором пара лиганд-рецептор представляет собой PDL1-CD80, а PDL1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 8.

**51.** Слитый белок по п. 48, в котором пара лиганд-рецептор представляет собой CD28-CD80, а CD28 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 254.

**52.** Слитый белок по п. 43, в котором пара лиганд-рецептор представляет собой CD28-PDL1.

**53.** Слитый белок по п. 52, в котором CD28 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 254.

**54.** Слитый белок по п. 52 или п. 53, в котором PDL1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 8.

**55.** Слитый белок по п. 42, в котором пара лиганд-рецептор представляет собой CD47-SIRPa.

**56.** Слитый белок по п. 55, в котором SIRPa содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 255.

**57.** Слитый белок по п. 55 или п. 56, в котором CD47 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 254.

**58.** Слитый белок по любому из пп. 35–57, в котором рецептор и лиганд слиты с соответствующими N-концами первого и второго полипептидов.

**59.** Слитый белок по любому из пп. 35–58, в котором один из первого или второго пептидных линкеров содержит более одного сайта расщепления протеазой.

**60.** Слитый белок по любому из пп. 35–59, в котором один из лиганда или рецептора сконструирован таким образом, чтобы он содержал один или более дополнительных сайтов расщепления протеазой, и при этом один или более сайтов расщепления протеазой в лиганде или рецепторе и сайт расщепления протеазой в первом или втором пептидном линкере расщепляются одной и той же протеазой или разными протеазами.

**61.** Слитый белок по любому из пп. 35–60, в котором протеаза выбрана из группы, состоящей из: сериновой протеазы, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP11, MMP12, MMP13, MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP18 (коллагеназы 4), MMP19, MMP20, MMP21, адамализина, серрализина, астацина, каспазы 1, каспазы 2, каспазы 3, каспазы 4, каспазы 5, каспазы 6, каспазы 7, каспазы 8, каспазы 9, каспазы 10, каспазы 11, каспазы 12, каспазы 13, каспазы 14, катепсина A, катепсина B, катепсина D, катепсина E, катепсина K, катепсина S, гранзима B, гуанидинобензоатазы (GB), гепсина, эластазы, легумаина, матриптазы, матриптазы 2, меприна, нейрозина, MT-SP1, неприлизина, плазмина, PSA, PSMA, TACE, TMPRSS3, TMPRSS4, uPA, кальпаина, FAP и KLK.

**62.** Слитый белок по п. 61, в котором протеаза представляет собой uPA или матриптазу.

**63.** Слитый белок по любому из пп. 35–62, в котором пептидный линкер имеет длину 3–50 или 5–20 аминокислот.

**64.** Слитый белок по любому из пп. 35–63, в котором один из первого или второго пептидных линкеров не имеет сайта расщепления протеазой.

**65.** Слитый белок по любому из пп. 35–64, в котором пептидный линкер представляет собой линкер $(Gly_nSer)$, причем линкер $(Gly_nSer)$ содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из $(Gly_3Ser)_n(Gly_4Ser)_1$, $(Gly_3Ser)_1(Gly_4Ser)_n$, $(Gly_3Ser)_n(Gly_4Ser)_n$ и $(Gly_4Ser)_n$, где n является целым числом от 1 до 5.

**66.** Слитый белок по любому из пп. 35–64, в котором пептидный линкер представляет собой линкер $(EAAAK)_n$, где n является целым числом от 1 до 5.

**67.** Слитый белок по п. 64, в котором пептидный линкер, не имеющий сайта расщепления протеазой, содержит аминокислотную последовательность EAAAKEAAAK (SEQ ID. NO: 38).

**68.** Слитый белок по п. 51 или п. 52, в котором пептидный линкер представляет собой полипролиновый линкер, необязательно PPP или PPPP, или глицин-пролиновый линкер, необязательно GPPPG. GGPPPGG, GPPPPG или GGPPPPGG.

**69.** Слитый белок по любому из пп. 35–64, в котором пептидный линкер содержит последовательность шарнирной области иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую до 30 процентов различий в идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью шарнирной области иммуноглобулина дикого типа.

**70.** Слитый белок по любому из пп. 35–69, в котором пептидный линкер, содержащий сайт расщепления протеазой, содержит аминокислотную последовательность MSGRSANA (SEQ ID NO: 28).

**71.** Слитый белок по любому из пп. 35–70, в котором связывание первого антигенсвязывающего домена с его родственным антигеном снижено в 10 раз или более по сравнению с исходным антигенсвязывающим доменом, который не слит с парой лиганд-рецептор.

**72.** Слитый белок по любому из пп. 35–71, в котором расщепление сайта расщепления протеазой в клеточной среде высвобождает один член пары лиганд-рецептор из слитого белка, тем самым позволяя антигенсвязывающему домену связываться с его родственным антигеном.

**73.** Слитый белок по любому из пп. 35–72, в котором первый антигенсвязывающий домен представляет собой Fab.

**74.** Слитый белок по любому из пп. 35–73, в котором первый антигенсвязывающий домен связывает антиген, который экспрессируется на раковой клетке или иммунной клетке.

**75.** Слитый белок по любому из пп. 35–74, в котором первый антигенсвязывающий домен связывает антиген, который экспрессируется на Т-клетке.

**76.** Слитый белок по любому из пп. 35–74, в котором первый антигенсвязывающий домен связывается с опухоль-ассоциированным антигеном (TAA).

**77.** Слитый белок по любому из пп. 35–74, в котором первый антигенсвязывающий домен связывается с TAA и при этом по меньшей мере один из лиганда или рецептора в паре лиганд-рецептор способен связываться с иммуномодулирующей мишенью.

**78.** Слитый белок по любому из пп. 35–77, в котором первый антигенсвязывающий домен связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из: кластера дифференцировки 3 (CD3), рецептора эпидермального фактора роста 2 человека (HER2), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), мезотелина (MSLN), тканевого фактора (TF), кластера дифференцировки 19 (CD19), тирозин-протеинкиназы Met (c-Met) и кадгерина 3 (CDH3).

**79.** Слитый белок по любому из пп. 32–78, в котором антитело или фрагмент антитела содержит второй антигенсвязывающий домен, содержащий второй полипептид VH и второй полипептид VL.

**80.** Слитый белок по п. 79, причем слитый белок содержит вторую пару лиганд-рецептор,

где лиганд второй пары лиганд-рецептор слит с одним из вторых полипептидов VH или VL посредством третьего пептидного линкера и рецептор второй пары лиганд-рецептор слит с другим из вторых полипептидов VH или VL посредством четвертого пептидного линкера, при этом по меньшей мере один из третьего и четвертого пептидных линкеров содержит сайт расщепления протеазой, и при этом пара лиганд-рецептор стерически препятствует связыванию второго антигенсвязывающего домена с его родственным антигеном.

**81.** Слитый белок по п. 79 или п. 80, причем слитый белок связывается с двумя различными антигенами.

**82.** Слитый белок по п. 81, в котором один антиген представляет собой антиген, экспрессируемый Т-клетками, а другой антиген представляет собой антиген, экспрессируемый раковыми клетками.

**83.** Слитый белок по п. 82, в котором антиген, экспрессируемый Т-клетками, представляет собой CD3.

**84.** Слитый белок по п. 83, содержащий (a) паратоп анти-CD3, содержащий VH и VL, где VH содержит три CDR HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а VL содержит три CDR LCDR1, LCDR2 и LCDR3, при этом

(a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 207, 208 и 209, соответственно, а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой 211, 212 и 214, соответственно;

(b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 224, 225 и 226, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой 228, 229 и 230, соответственно;

(c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 232, 233 и 234, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой 236, 237 и 238, соответственно; или

(d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой SEQ ID NO: 240, 241 и 242, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой 244, 245 и 246, соответственно.

**85.** Слитый белок по любому из пп. 81–84, причем слитый белок связывается с CD3 и HER2.

**86.** Слитый белок, содержащий:

область Fc, содержащую первый полипептид Fc и второй полипептид Fc, и

пару лиганд-рецептор, содержащую внеклеточную часть рецептора суперсемейства

иммуноглобулинов и его родственный лиганд или его рецептор-связывающий фрагмент; при этом

лиганд слит с концом первого полипептида Fc посредством первого пептидного линкера, а рецептор слит с таким же соответствующим концом второго полипептида Fc посредством второго пептидного линкера; при этом

первый и второй пептидные линкеры имеют достаточную длину, чтобы обеспечить спаривание лиганда и рецептора; и при этом

по меньшей мере один из первого и второго пептидных линкеров содержит сайт расщепления протеазой.

**87.** Слитый белок, содержащий:

биологически функциональный белок, пару лиганд-рецептор, первый пептидный линкер и второй пептидный линкер; причем

биологически функциональный белок содержит по меньшей мере первый полипептид и второй полипептид; и

пара лиганд-рецептор содержит внеклеточную часть рецептора суперсемейства иммуноглобулинов и его родственный лиганд или его рецептор-связывающий фрагмент; при этом

лиганд слит с концом первого полипептида посредством первого пептидного линкера;

рецептор слит с тем же соответствующим концом второго полипептида посредством второго пептидного линкера; а первый и второй пептидные линкеры имеют достаточную длину, чтобы обеспечить спаривание лиганда и рецептора.

**88.** Слитый белок по п. 86, в котором лиганд и рецептор слиты с соответствующими N-концами первого и второго полипептидов Fc.

**89.** Слитый белок, содержащий:

область Fab и область Fc; при этом

область Fab содержит полипептид VH и полипептид VL, которые образуют антигенсвязывающий домен, и

пару лиганд-рецептор, содержащую внеклеточную часть рецептора суперсемейства иммуноглобулинов и его родственный лиганд или его рецептор-связывающий фрагмент; при этом лиганд слит с N-концом одного из полипептидов VH или VL посредством первого

пептидного линкера, а рецептор слит с N-концом другого полипептида VH или VL посредством второго пептидного линкера; при этом

первый и второй пептидные линкеры имеют достаточную длину, чтобы обеспечить спаривание лиганда и рецептора; при этом

по меньшей мере один из первого и второго пептидных линкеров содержит сайт расщепления протеазой; и при этом

пара лиганд-рецептор стерически препятствует связыванию антигенсвязывающего домена с его родственным антигеном.

**90.** Слитый белок по п. 89, дополнительно содержащий дополнительную область Fab или scFv.

**91.** Способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту достаточного количества слитого белка по любому из вышеуказанных пунктов.

**92.** Способ модулирования иммунного ответа, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту достаточного количества слитого белка по любому из вышеуказанных пунктов.

**93.** Способ по п. 92, в котором иммунный ответ выбран из группы, состоящей из: ингибирования иммунной контрольной точки, стимуляции иммунной контрольной точки, активации иммунных клеток, стимуляции сигналинга Т-клеточного рецептора, зависимой от Т-клеток цитотоксичности (TDCC), антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) и стимуляции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

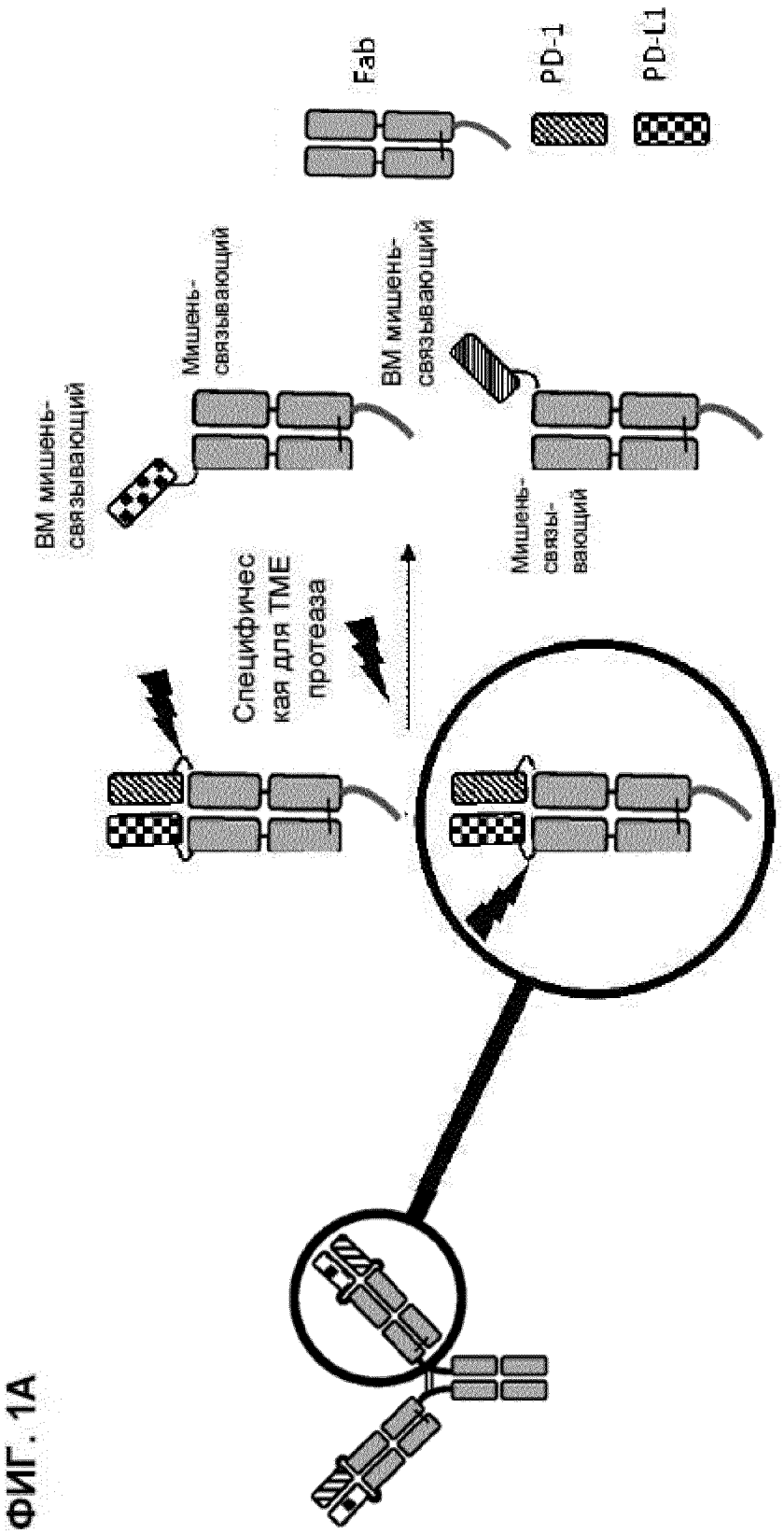
**94.** Способ по любому из пп. 91–93, причем слитый белок вводят внутривенно.

**95.** Вектор, кодирующий аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере один полипептид слитого белка по любому из пп. 1–90.

**96.** Клетка, содержащая вектор по п. 95.

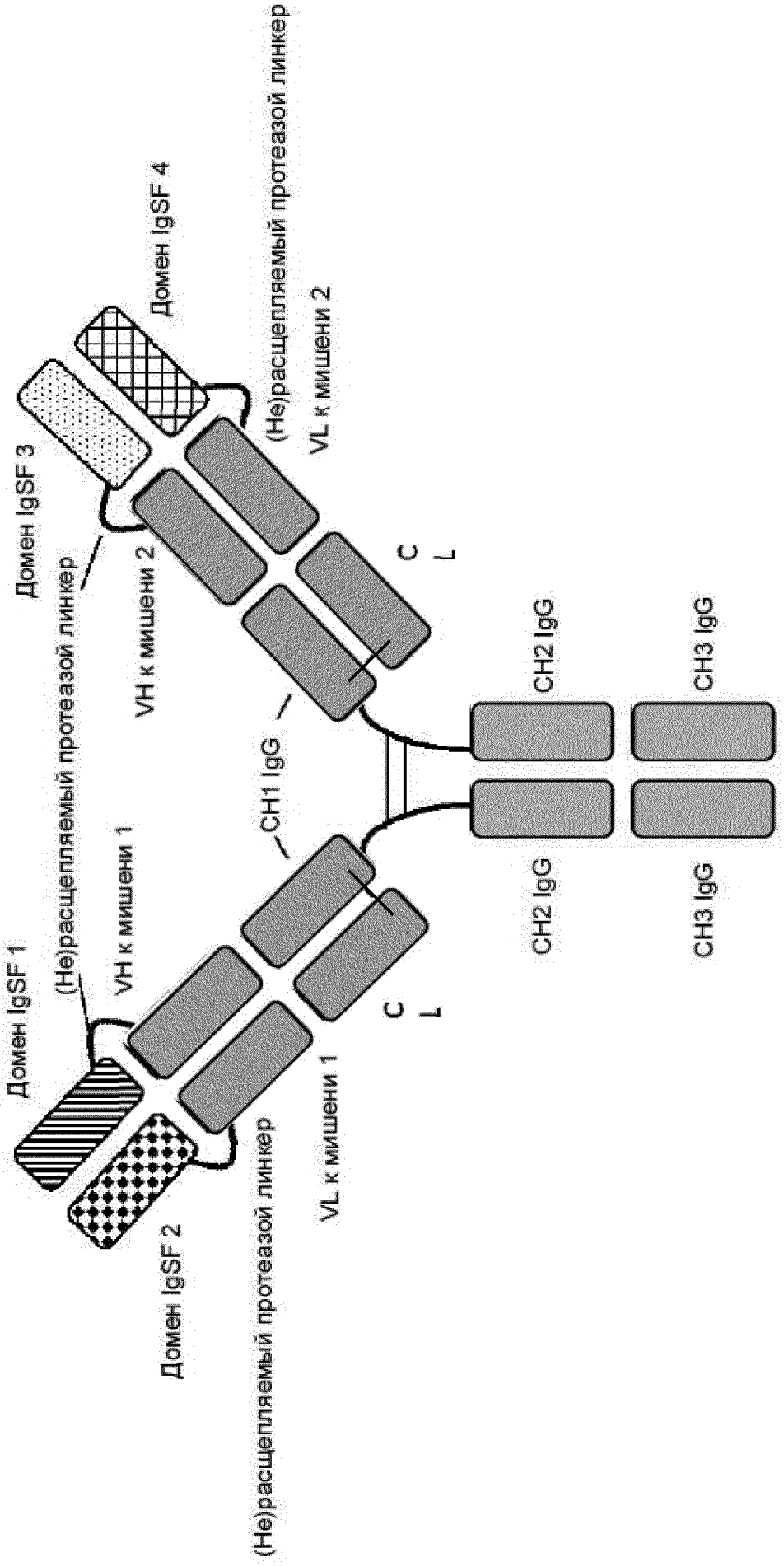
**97.** Набор, содержащий вектор по п. 95, клетку по п. 96, очищенный слитый белок по любому из пп. 1–90 или их комбинации, а также инструкции по применению.

**98.** Слитый белок по любому из пп. 1–90, в котором расщепление сайта расщепления протеазой в клеточной среде высвобождает один член пары лиганд-рецептор из слитого белка, тем самым позволяя другому члену пары лиганд-рецептор связываться с его родственным партнером на клеточной поверхности.

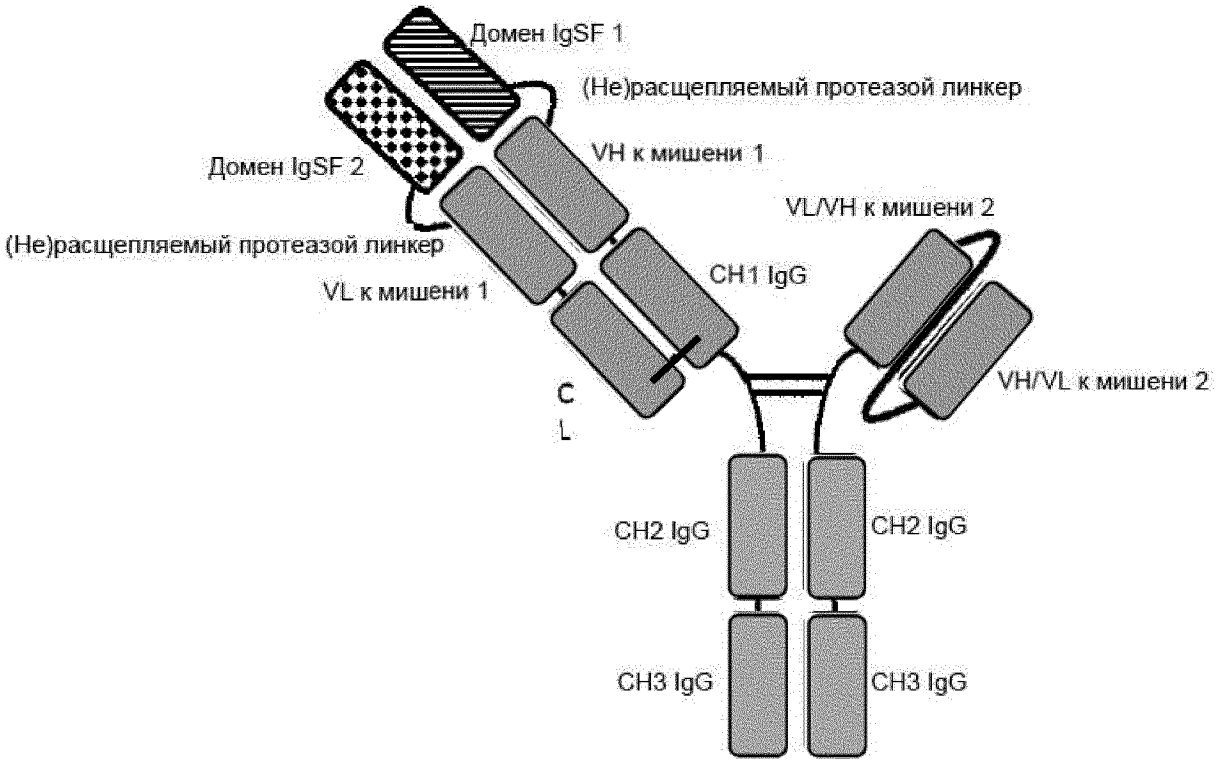

Fab
PD-1
PD-L1
ВМ мишень-связывающий
Мишень-связывающий
ВМ мишень-связывающий
Мишень-связы-вающий
Специфическая для ТМЕ протеаза

ФИГ. 1А

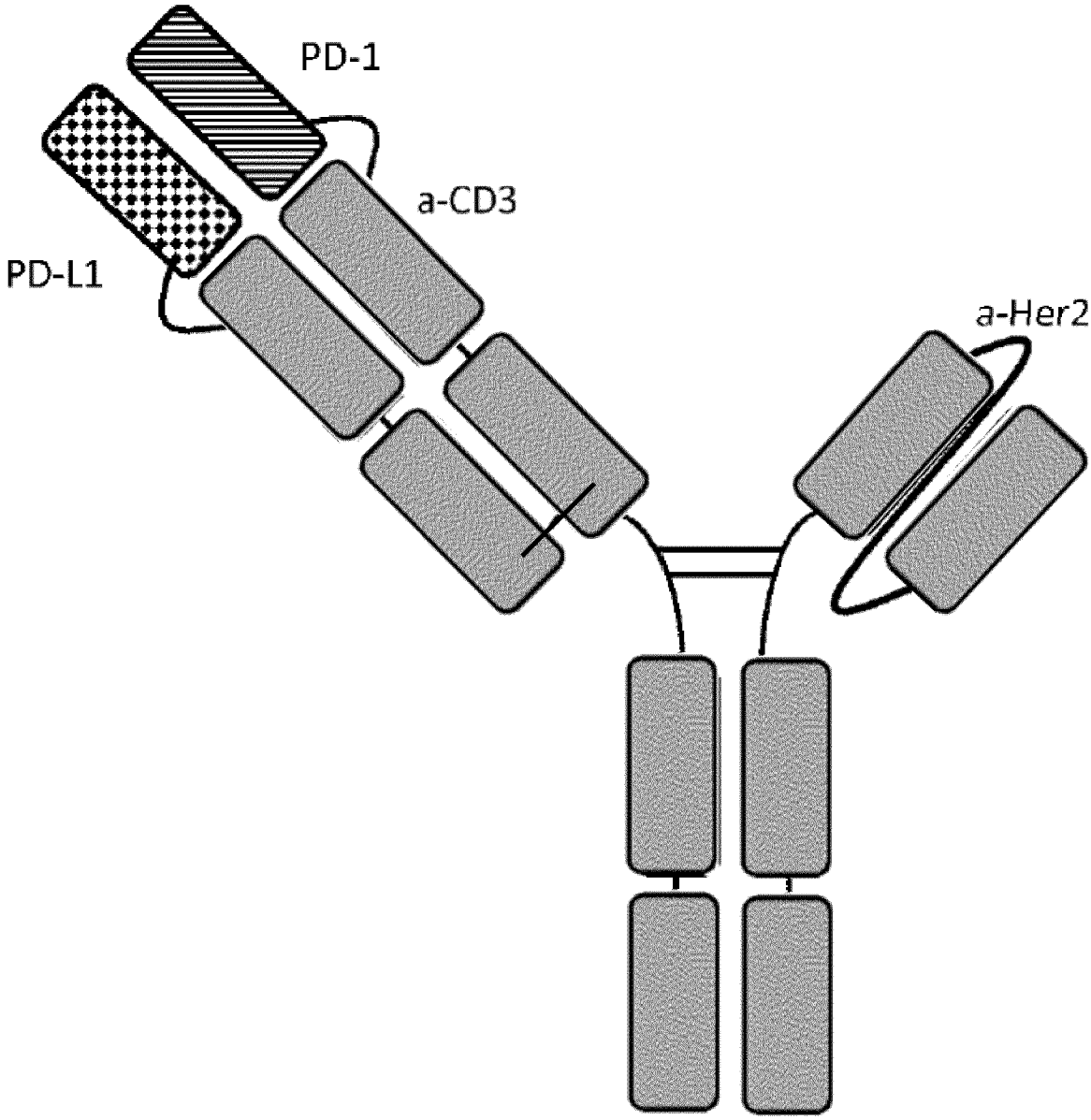
ФИГ. 1B


Домен IgSF 1
(Не)расщепляемый протеазой линкер
VH к мишени 1
CH1 IgG
C
L
VL к мишени 1
(Не)расщепляемый протеазой линкер
Домен IgSF 2
Домен IgSF 3
(Не)расщепляемый протеазой линкер
VH к мишени 2
C
L
VL к мишени 2
Домен IgSF 4
CH2 IgG
CH2 IgG
CH3 IgG
CH3 IgG

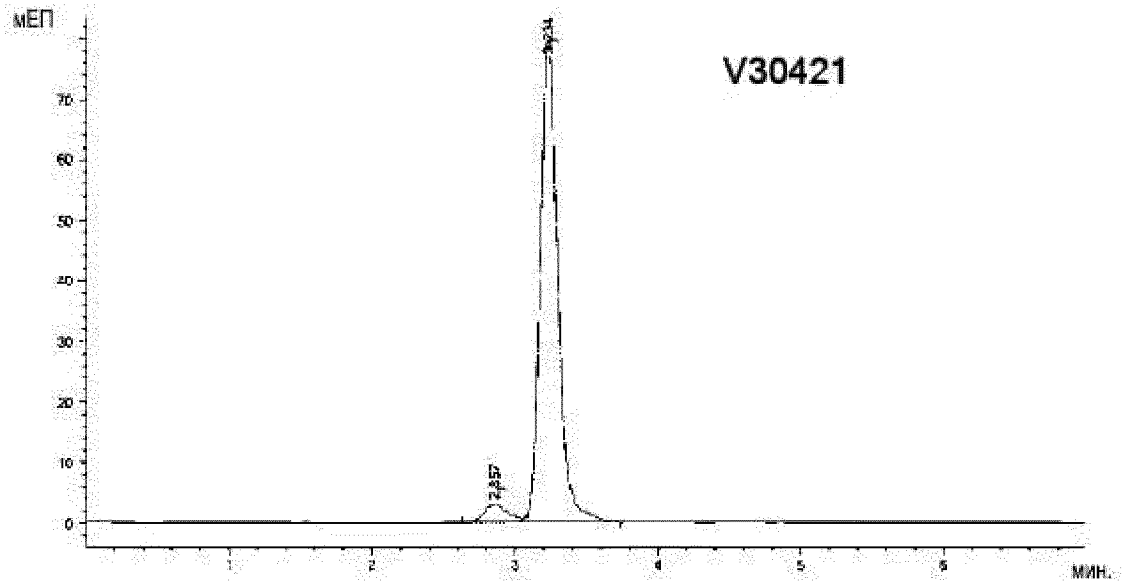
ФИГ. 1C


Домен IgSF 1
(Не)расщепляемый протеазой линкер
Домен IgSF 2
VH к мишени 1
VL/VH к мишени 2
(Не)расщепляемый протеазой линкер
CH1 IgG
VL к мишени 1
VH/VL к мишени 2
C
L
CH2 IgG
CH2 IgG
CH3 IgG
CH3 IgG

ФИГ. 2

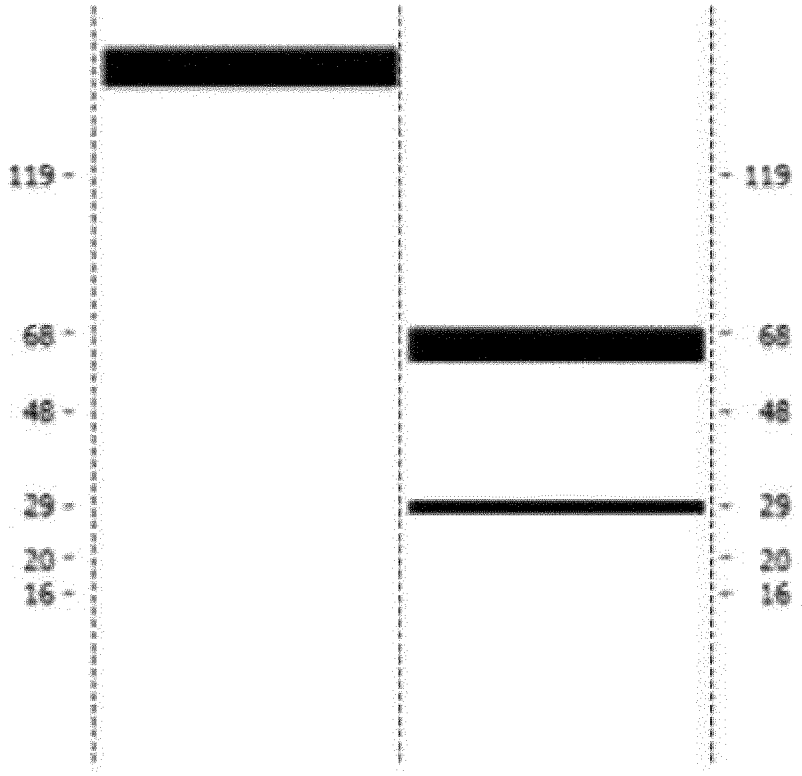


ФИГ. 3А

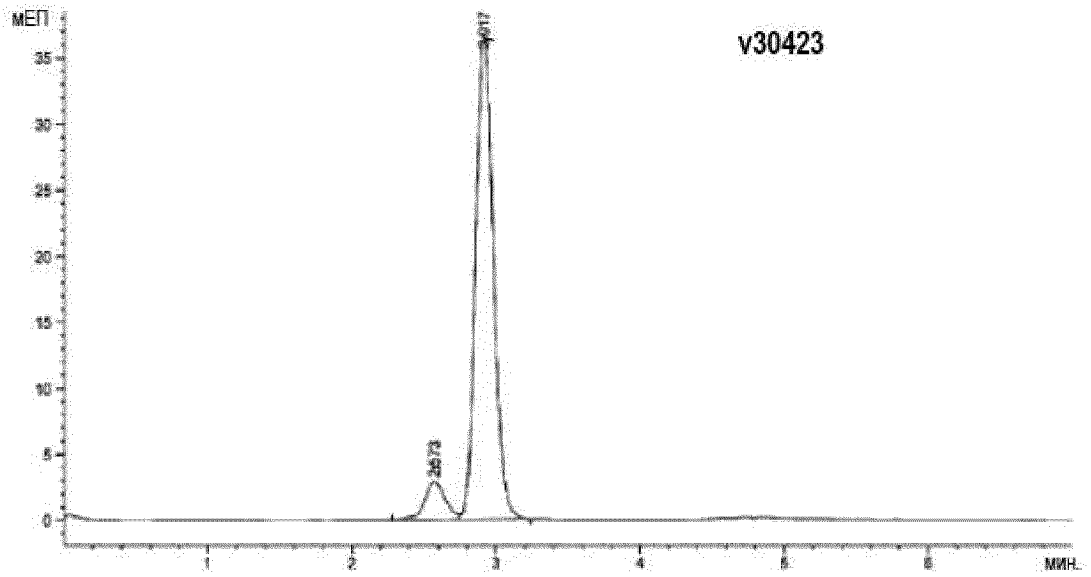



| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,579 | MF | 0,1673 | 13,28671 | 1,32349 | 6,0047 |
| 2 | 2,924 | FM | 0,1440 | 207,98589 | 24,06448 | 93,9953 |

ФИГ. 3В

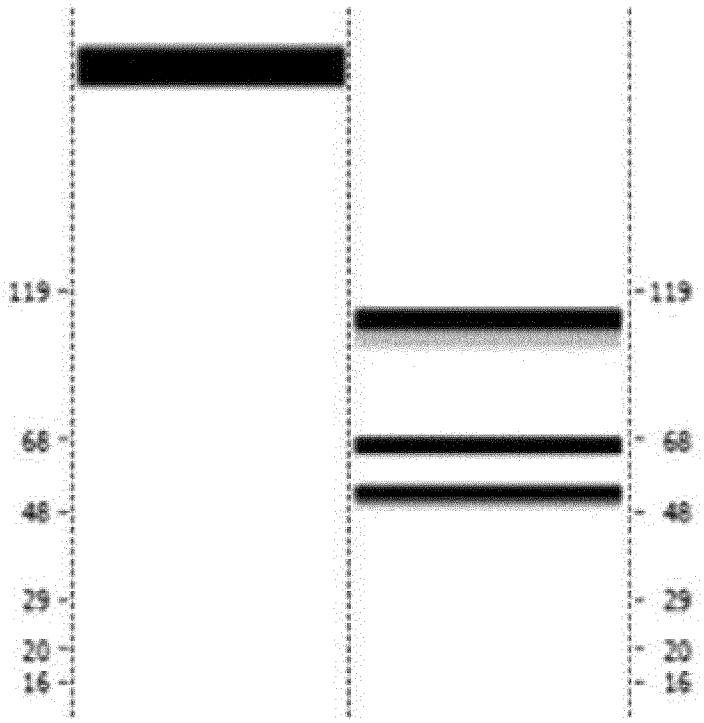


ФИГ. 3C

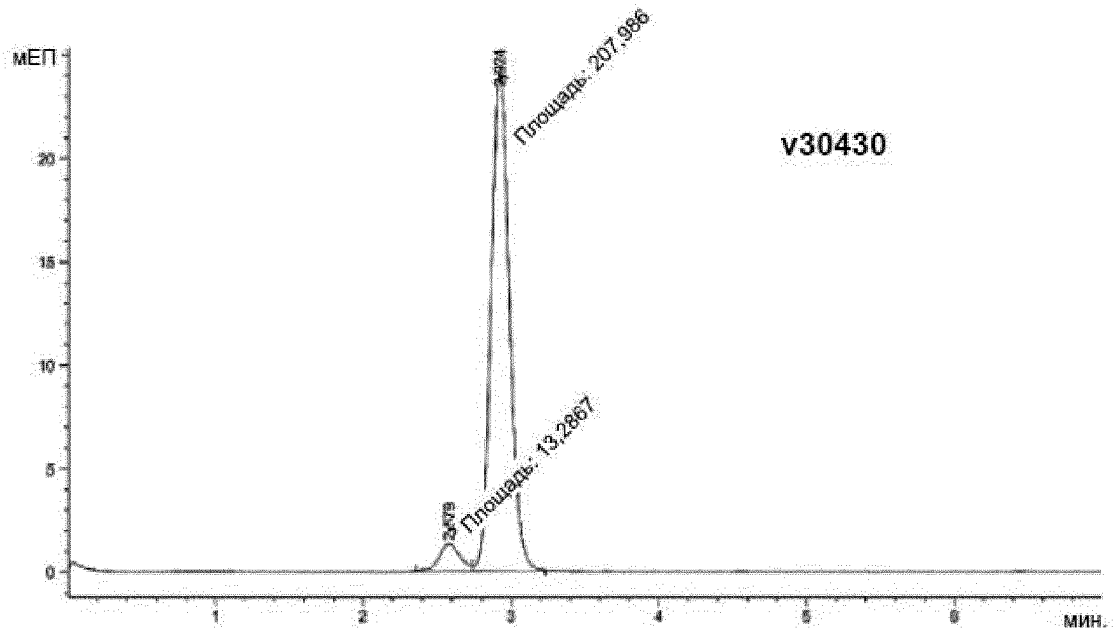



| Пик # | Время удер-живания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,573 | BV E | 0,1530 | 29,16205 | 2,88209 | 8,5463 |
| 2 | 2,917 | VB R | 0,1323 | 312,06305 | 36,67598 | 91,4537 |

ФИГ. 3D

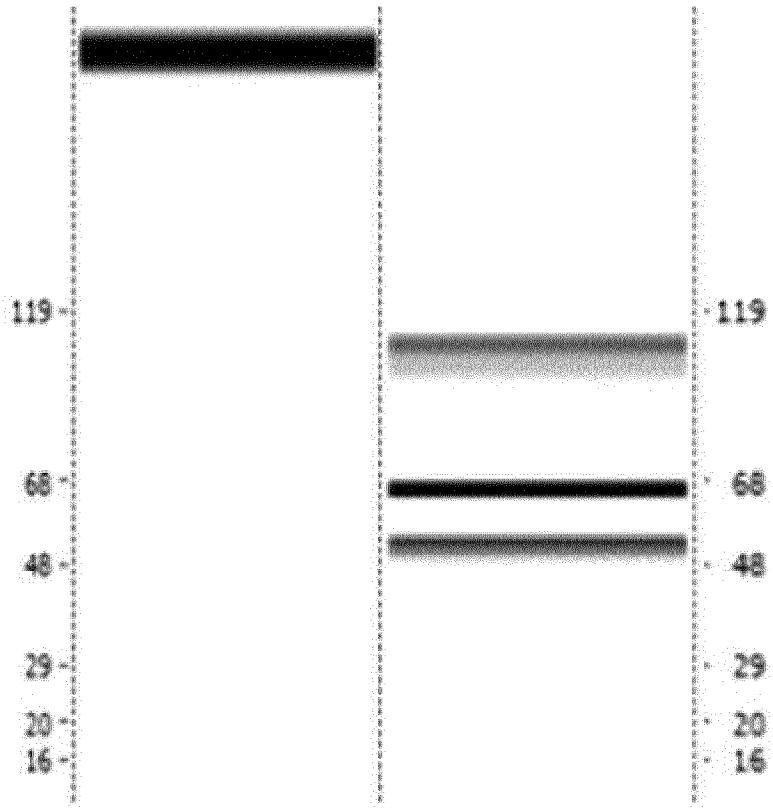


**ФИГ. 3E**

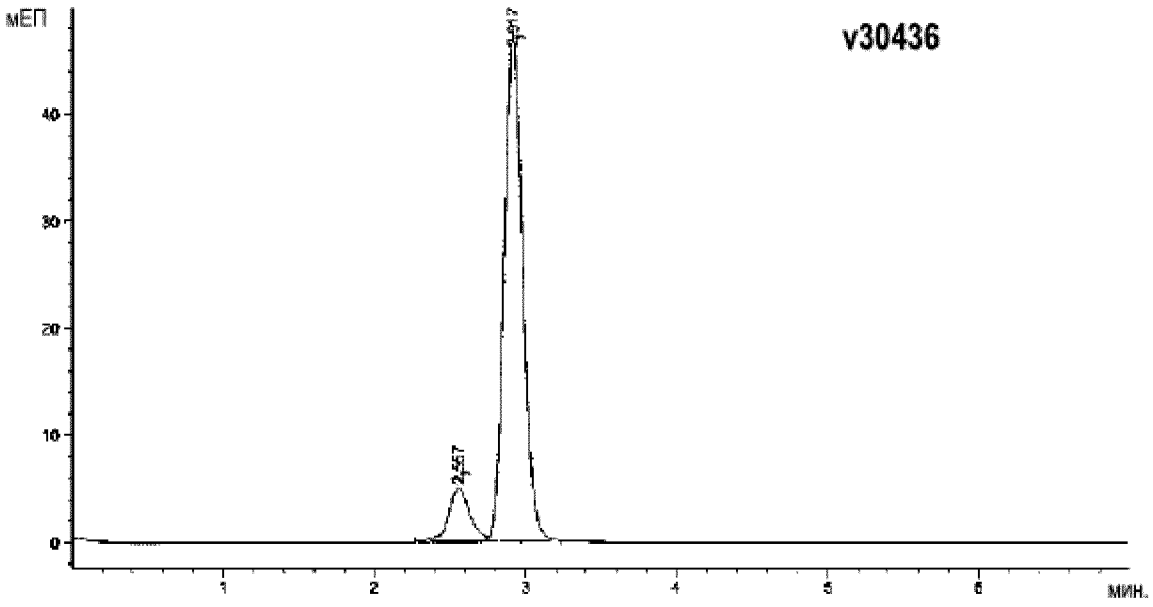



| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,579 | MF | 0,1673 | 13,28671 | 1,32349 | 6,0047 |
| 2 | 2,924 | FM | 0,1440 | 207,98589 | 24,06448 | 93,9953 |

ФИГ. 3F

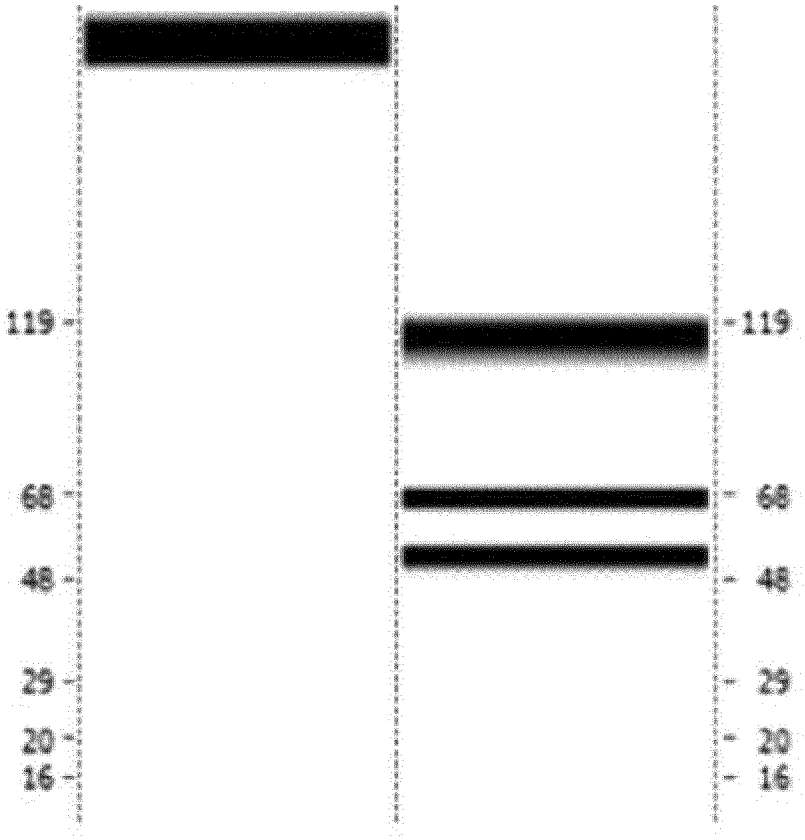


ФИГ. 3G

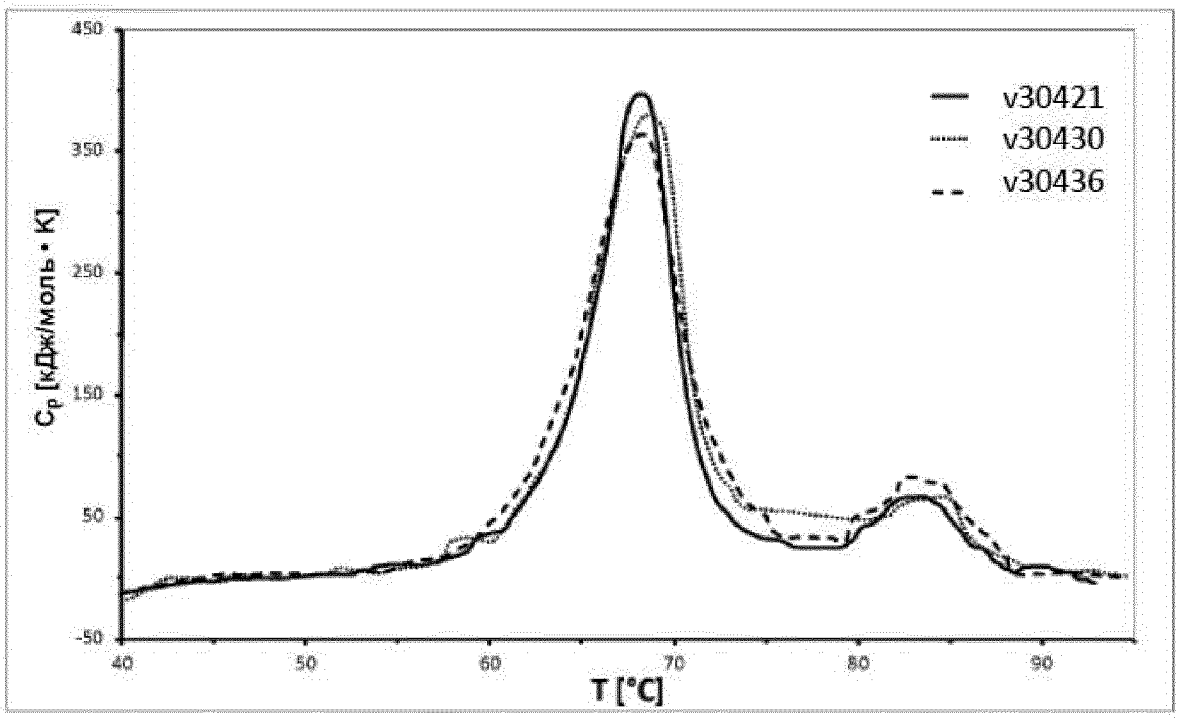



| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,557 | BV E | 0,1492 | 48,67016 | 4,93004 | 10,8344 |
| 2 | 2,917 | VB R | 0,1305 | 400,54706 | 47,45745 | 89,1656 |

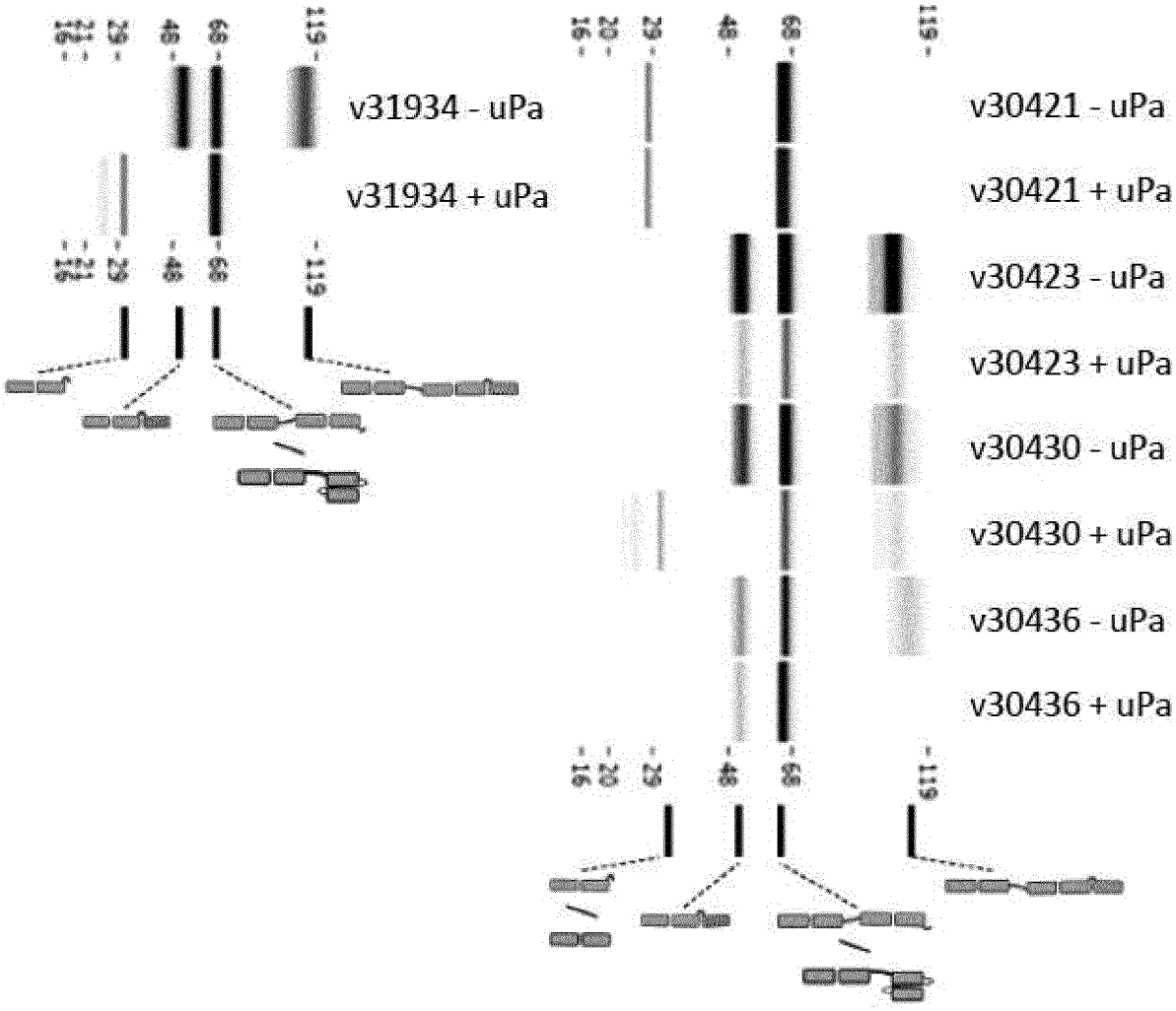
ФИГ. 3H



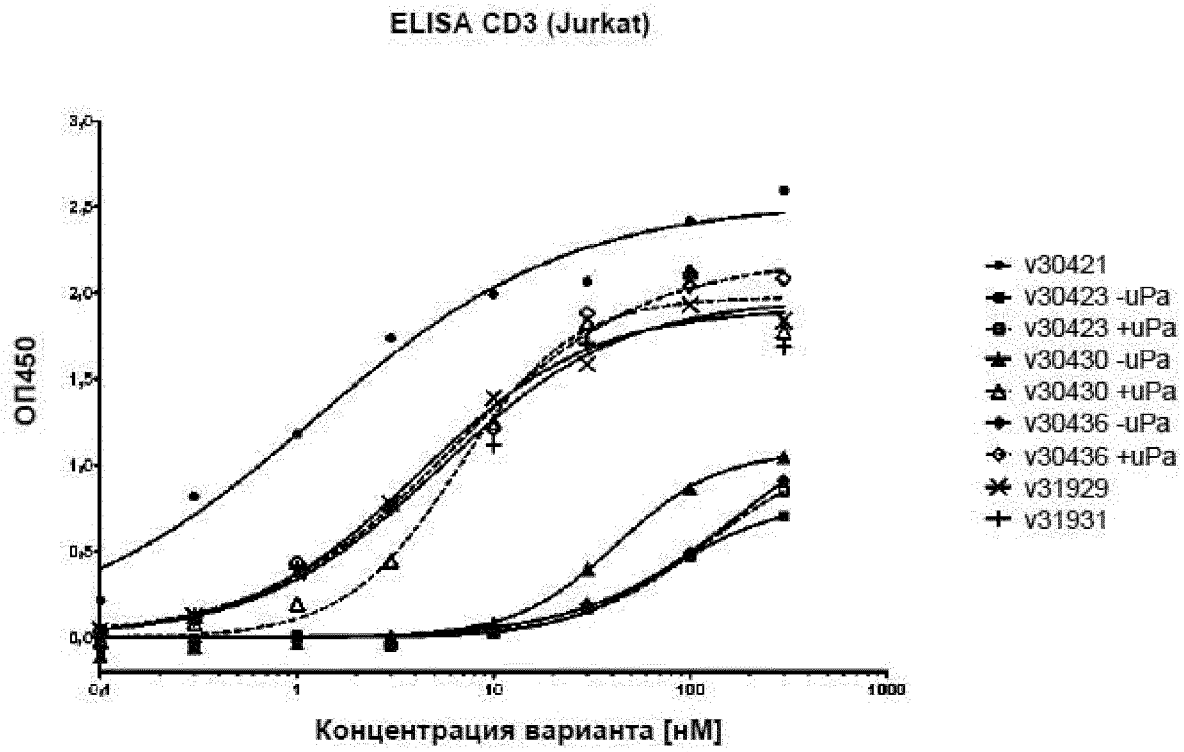
ФИГ. 4


450
350
250
150
50
-50
40
50
60
70
80
90
Cp [кДж/моль • K]
T [°C]
v30421
v30430
v30436

ФИГ. 5

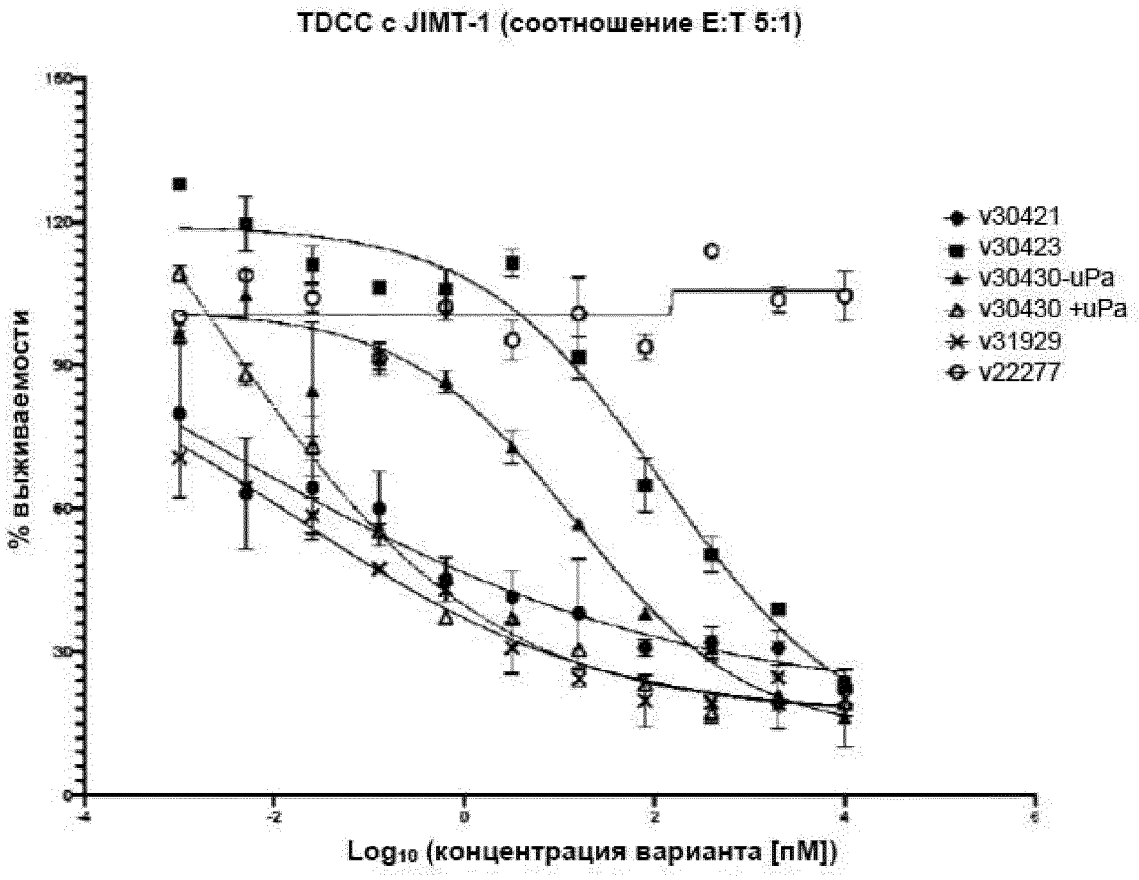

v31934 - uPa
v31934 + uPa
v30421 - uPa
v30421 + uPa
v30423 - uPa
v30423 + uPa
v30430 - uPa
v30430 + uPa
v30436 - uPa
v30436 + uPa

ФИГ. 6




| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| V30421 | 1,2E-09 | 1 |
| v30423-uPa | 7,7E-08 | 63 |
| v30423 +uPa | 1,2E-07 | 100 |
| v30430 -uPa | 4,2E-08 | 35 |
| V30430 +uPa | 6,7E-09 | 5,5 |
| v30436 -uPa | 1,8E-07 | 150 |
| v30436 +uPa | 6,2E-09 | 5,1 |
| V31929 | 4,2E-09 | 3,5 |
| V31931 | 5,3E-09 | 4,4 |

ФИГ. 7




| Образец | EC50 [M] | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| V30421 | 2,53E-15 | 1 |
| V30423 | 1,25E-10 | 49000 |
| v30430 -uPa | 1,48E-11 | 5800 |
| v30430 +uPa | 2,43E-15 | 0,96 |
| V31929 | 1,65E-14# | 6,5# |
| V22277 | > 2E-07* | > 7,9E+07* |

#$B_{max}$ ограничено 100 %
*плохая аппроксимация

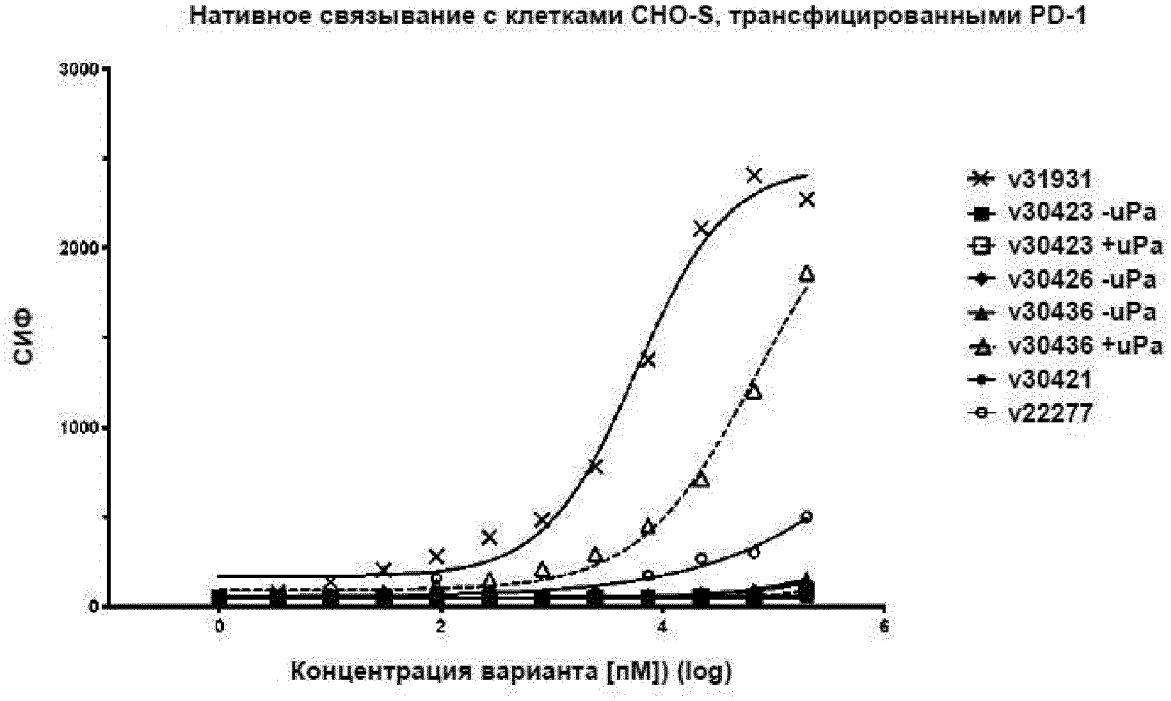
ФИГ. 8А




| Образец | EC50 [M] | Кратность относительно v31929 |
|---|---|---|
| V31929 | 3,5E-09 | 1 |
| v30423 -uPa | > 2E-07* | >570* |
| v30423 +uPa | > 2E-07* | >570* |
| v30426 +uPa | > 2E-07* | >570* |
| v30430 -uPa | > 2E-07* | >570* |
| v30430 +uPa | 1,8E-08# | 53# |
| V30421 | > 2E-07* | >570* |
| v22277 | > 2E-07* | >570* |

*плохая аппроксимация
#$B_{max}$ ограничено значением для v31929

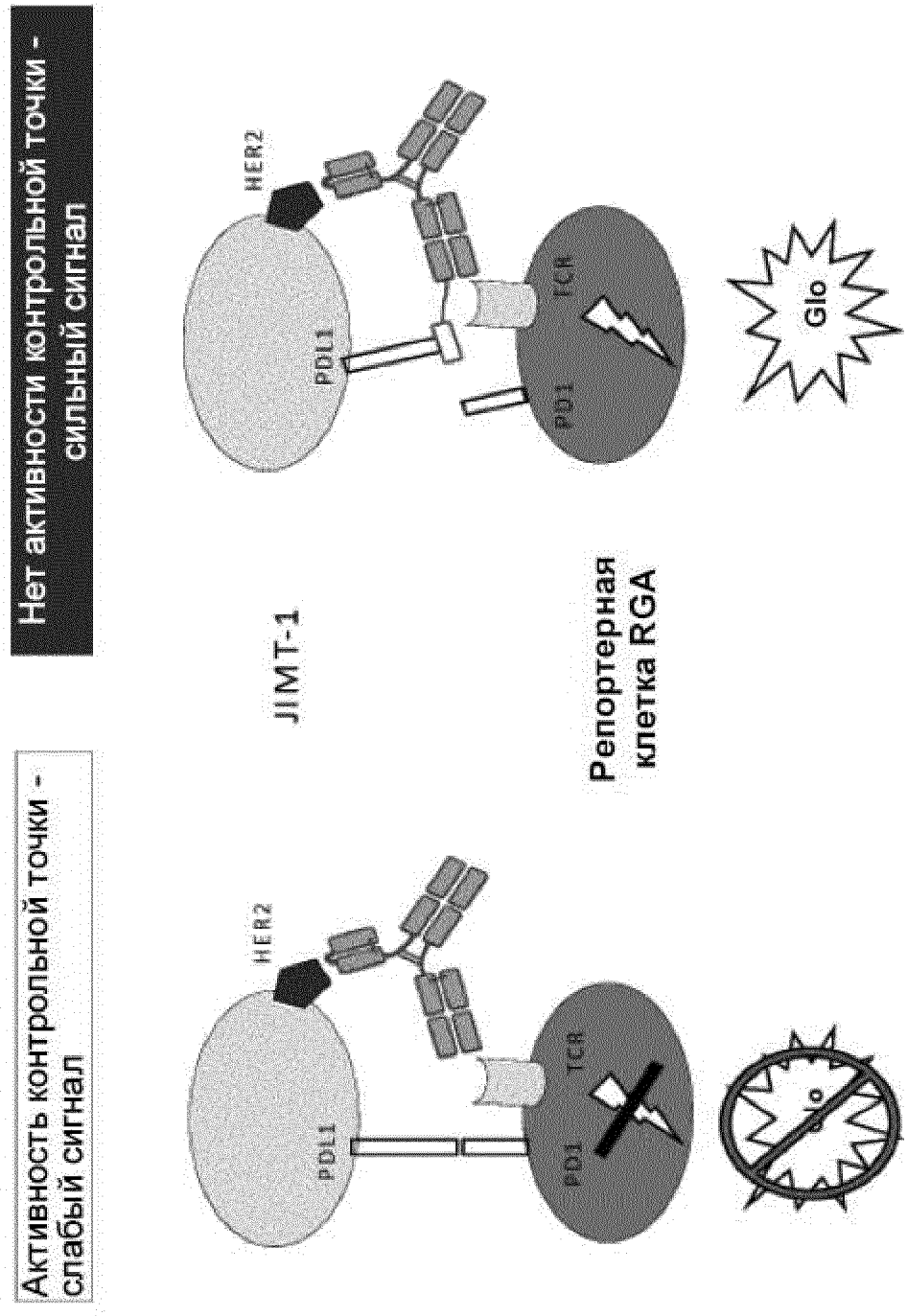
**ФИГ. 8B**




| Образец | EC50 [M] | Кратность относительно V31931 |
|---|---|---|
| v31931 | 5,8E-09 | 1 |
| v30423 -uPa | > 2E-07* | >35* |
| v30423 +uPa | > 2E-07* | >35* |
| v30426 +uPa | > 2E-07* | >35* |
| v30436 -uPa | > 2E-07* | >35* |
| v30436 +uPa | 6,7E-08# | 12# |
| v30421 | > 2E-07* | >35* |
| v22277 | > 2E-07* | >35* |

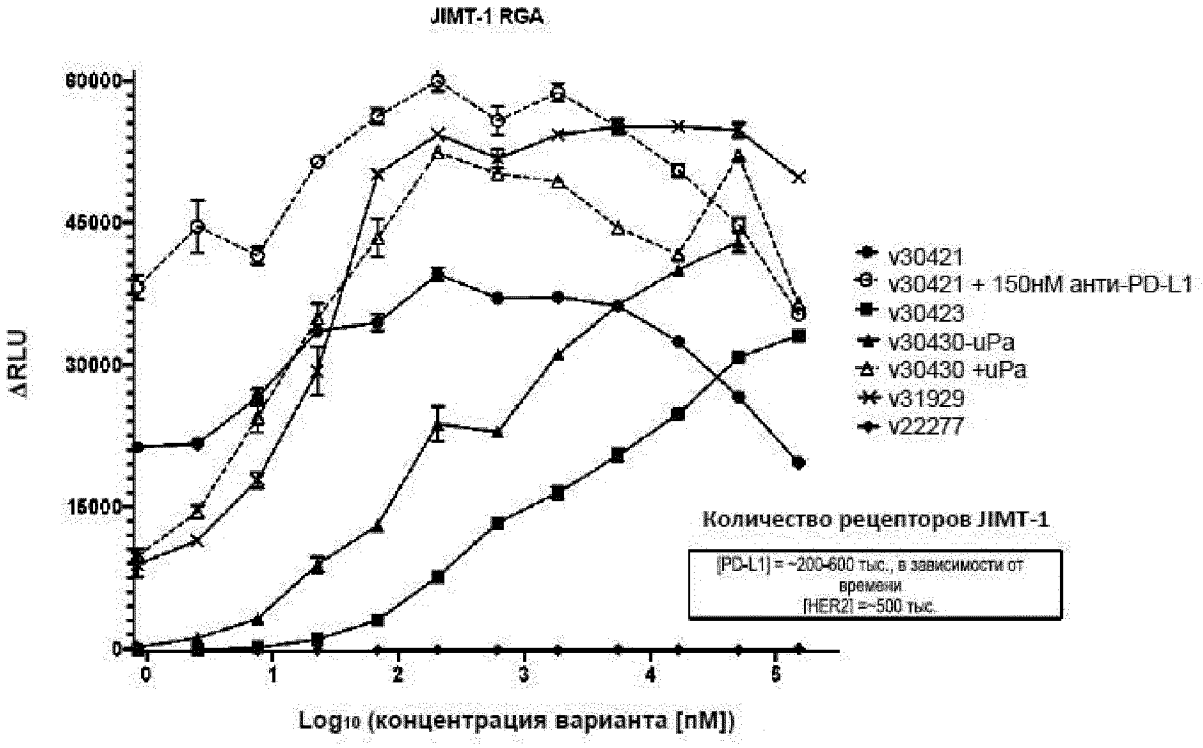
*плохая аппроксимация

#$B_{max}$ ограничено значением для v31929

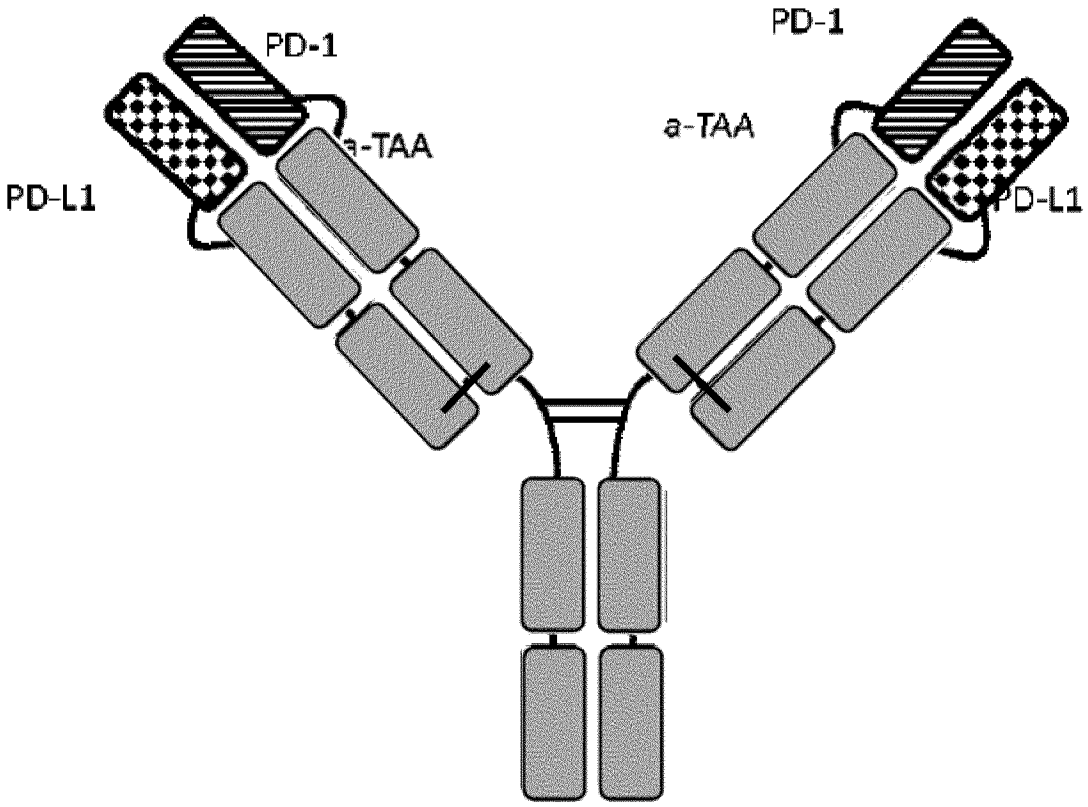

Нет активности контрольной точки - сильный сигнал
Активность контрольной точки - слабый сигнал
HER2
PDL1
TCR
PD1
Glo
JIMT-1
Репортерная клетка RGA

ФИГ. 9А

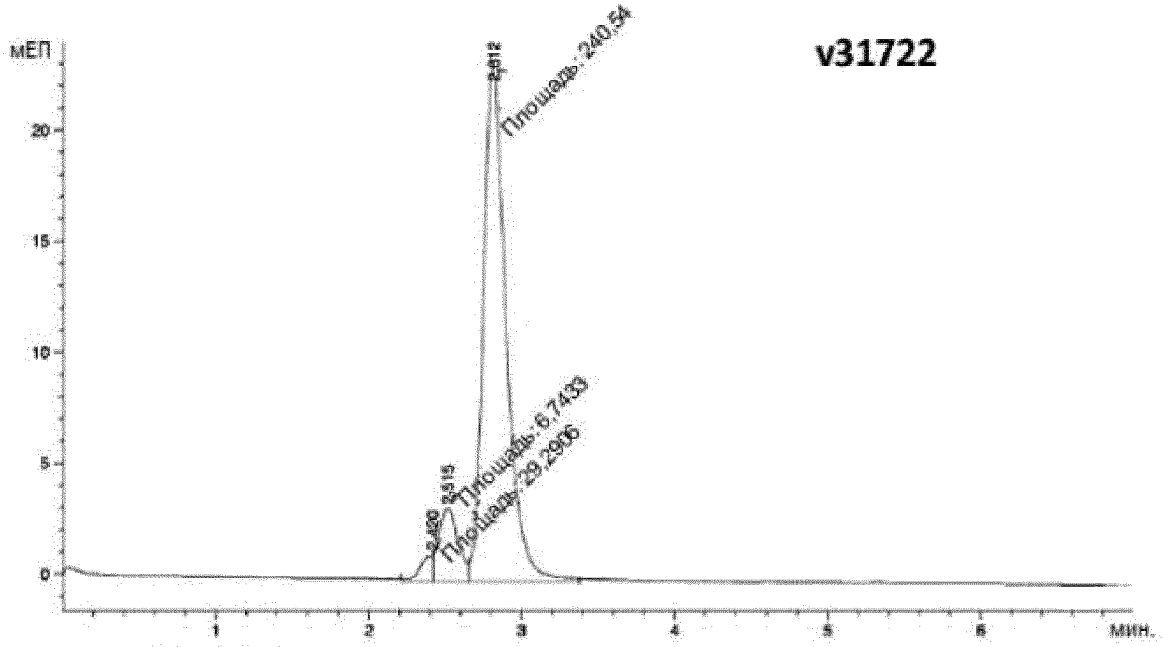
ФИГ. 9B


JIMT-1 RGA
ΔRLU
60000
45000
30000
15000
0
0
1
2
3
4
5
Log10 (концентрация варианта [пМ])
v30421
v30421 + 150нМ анти-PD-L1
v30423
v30430-uPa
v30430 +uPa
v31929
v22277
Количество рецепторов JIMT-1
[PD-L1] = ~200-600 тыс., в зависимости от времени
[HER2] =~500 тыс.

ФИГ. 10

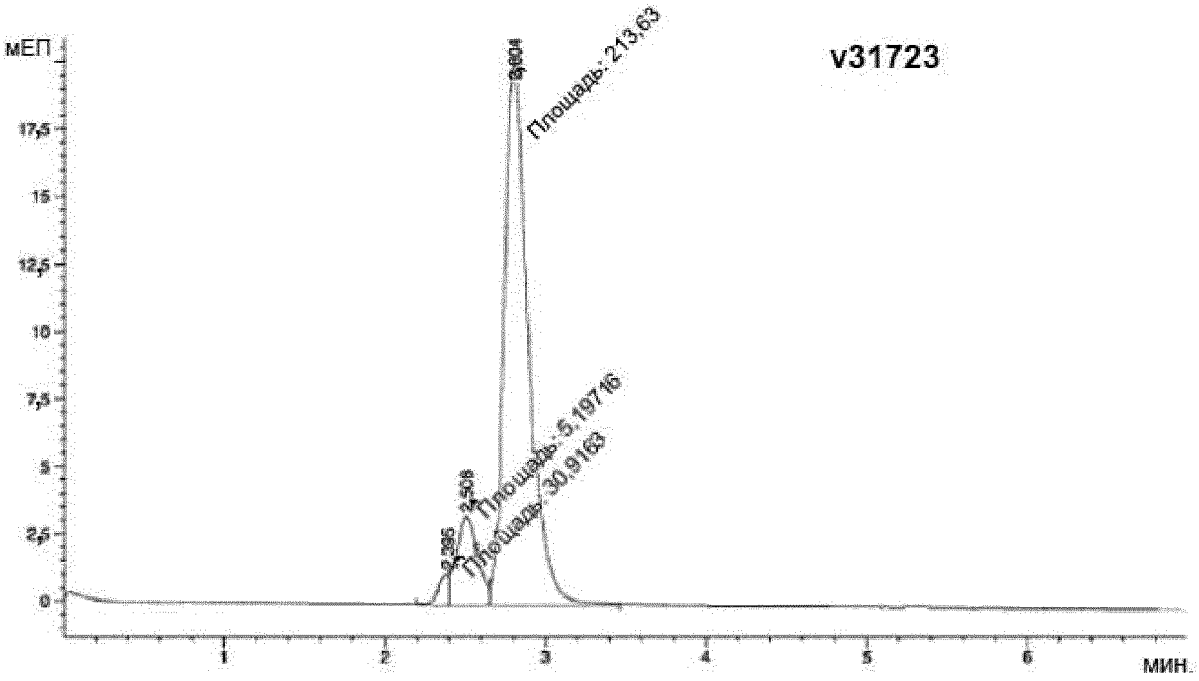


ФИГ. 11А



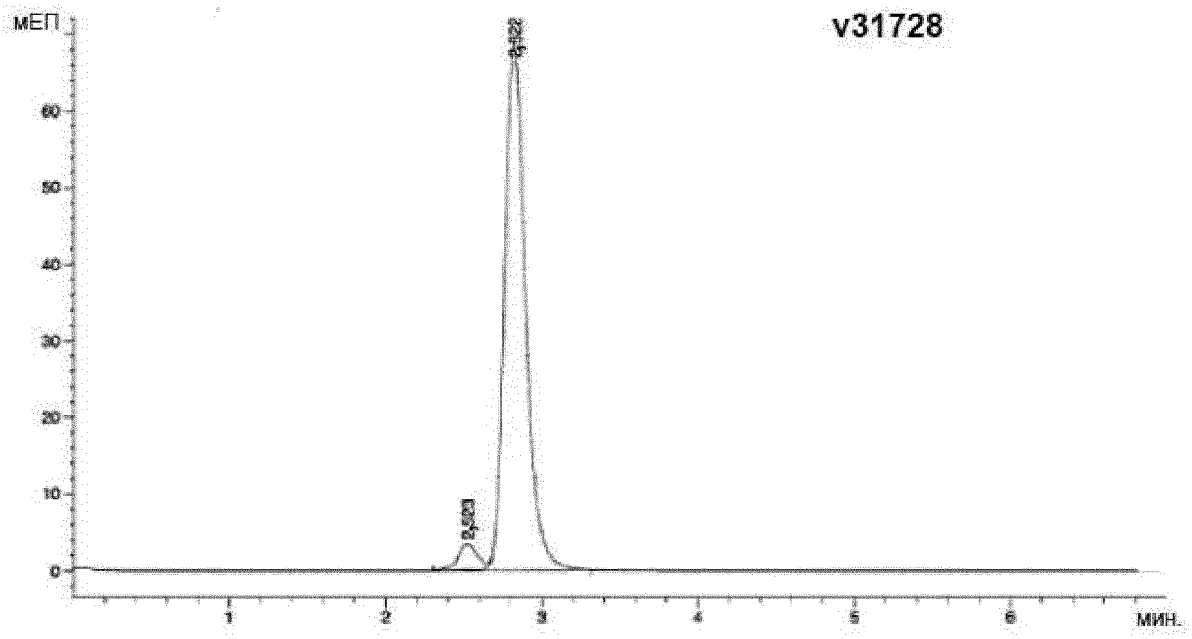

| Пик # | Время удерживания (мин.) | Тип | Ширина (мин.) | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,420 | MF | 0,0952 | 6,74330 | 1,18096 | 2,4382 |
| 2 | 2,515 | FM | 0,1497 | 29,29056 | 3,26124 | 10,5905 |
| 3 | 2,812 | FM | 0,1733 | 240,53970 | 23,13059 | 86,9713 |

**ФИГ. 11B**



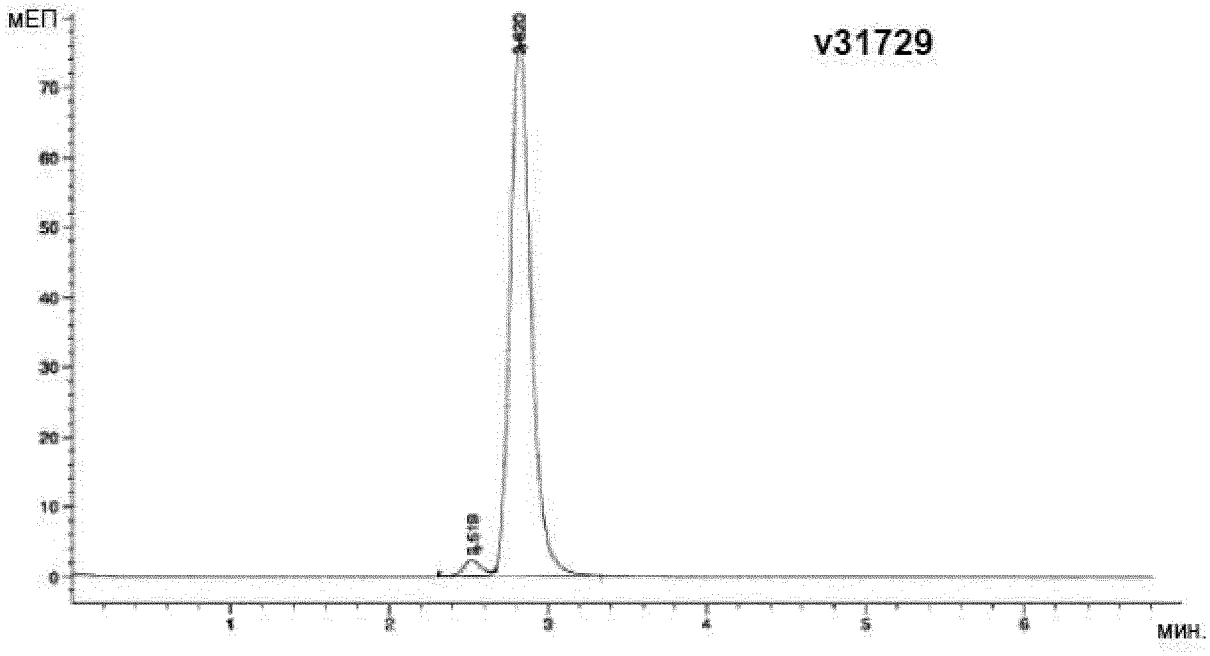

| Пик # | Время удер-живания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,395 | MF | 0,0747 | 5,19716 | 1,15997 | 2,0810 |
| 2 | 2,508 | FM | 0,1564 | 30,91834 | 3,29381 | 12,3800 |
| 3 | 2,804 | FM | 0,1777 | 213,62971 | 20,04184 | 85,5391 |

**ФИГ. 11C**



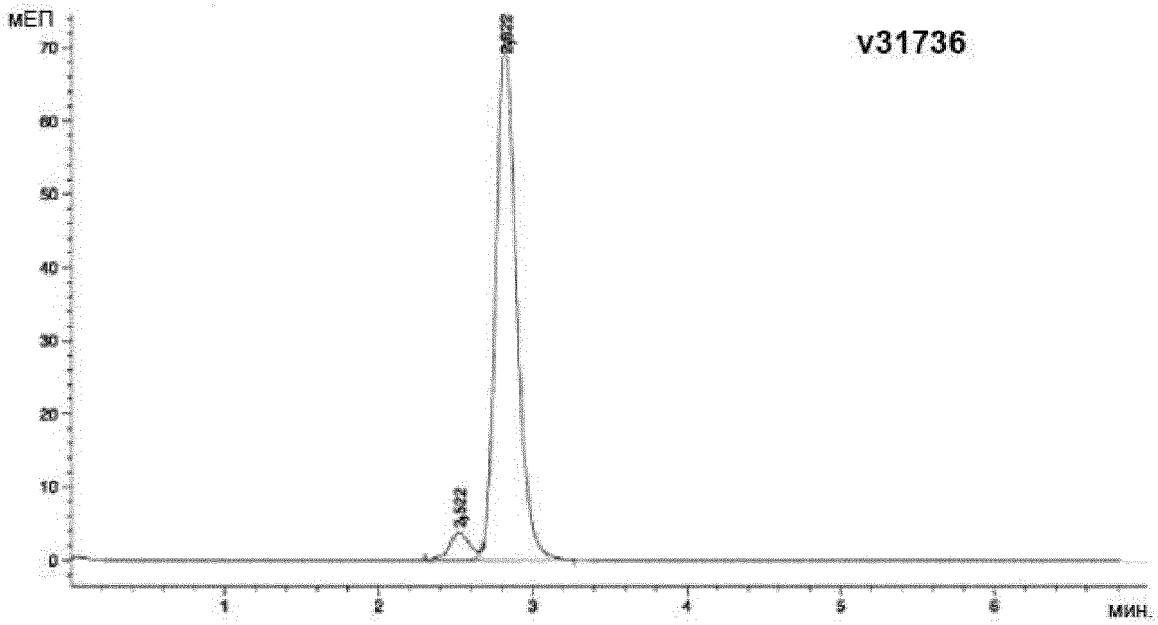

| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,523 | BV E | 0,1355 | 30,27770 | 3,41350 | 4,5081 |
| 2 | 2,822 | VB R | 0,1428 | 641,35144 | 68,77804 | 95,4919 |

**ФИГ. 11D**



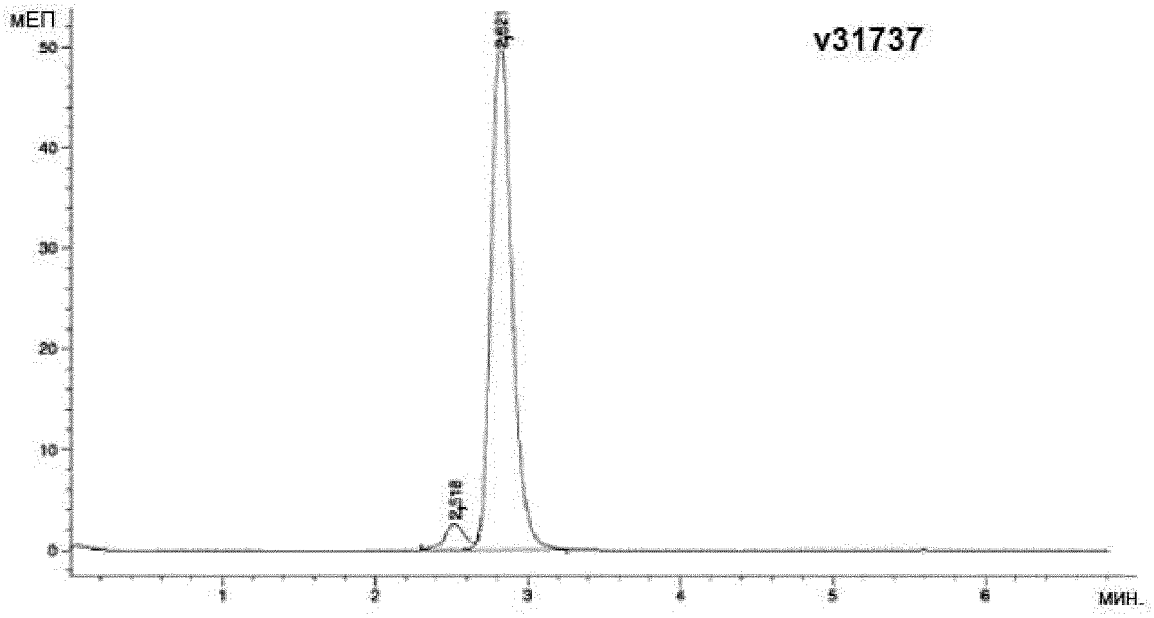

| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,519 | BV E | 0,1303 | 19,72248 | 2,31729 | 2,7199 |
| 2 | 2,820 | VB R | 0,1413 | 705,40253 | 76,71500 | 97,2801 |

**ФИГ. 11E**



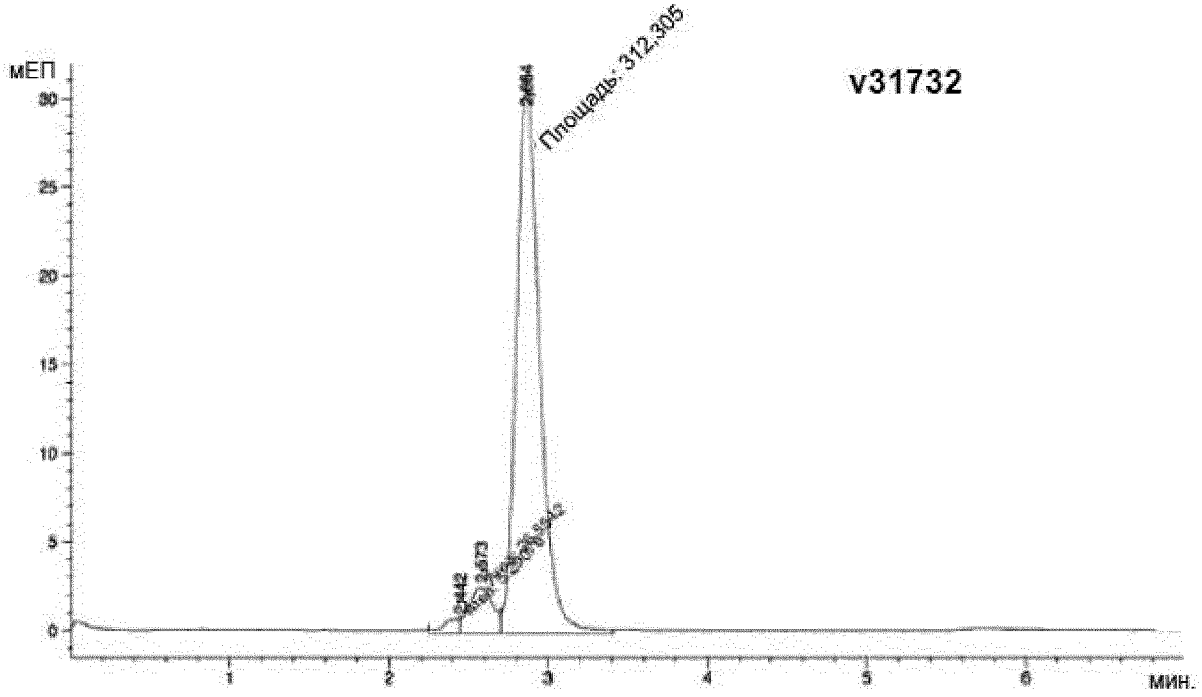

| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,522 | BV E | 0,1398 | 34,34905 | 3,75181 | 4,8885 |
| 2 | 2,822 | VB R | 0,1448 | 668,29584 | 70,98001 | 95,1115 |

**ФИГ. 11F**



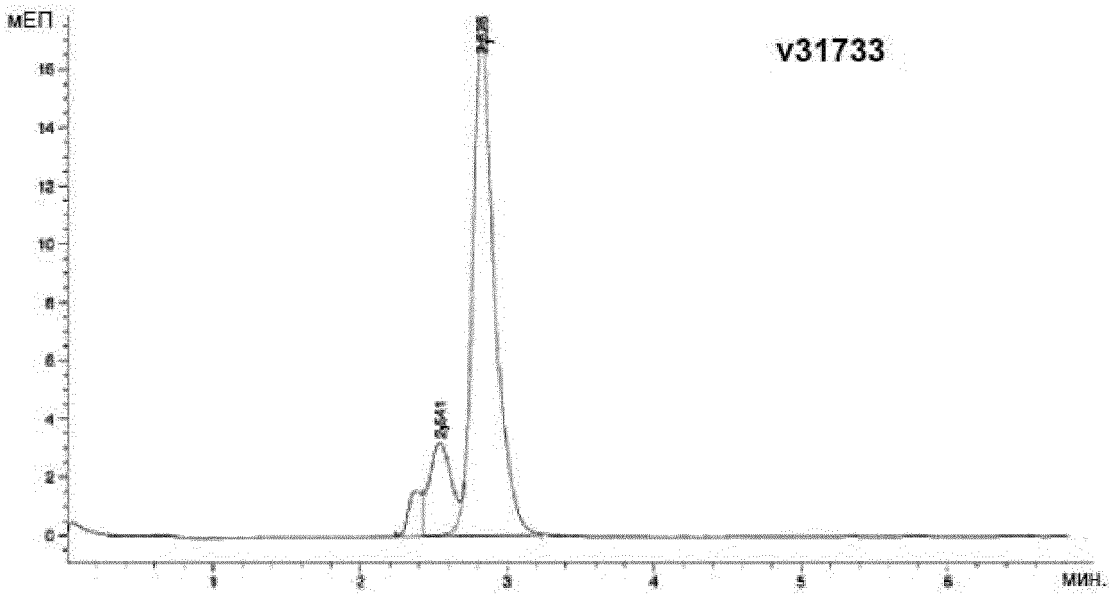

| Пик # | Время уде р-живания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,518 | BV E | 0,1393 | 23,45144 | 2,55052 | 4,6321 |
| 2 | 2,821 | VB R | 0,1450 | 482,83261 | 51,19516 | 95,3679 |

**ФИГ. 11G**



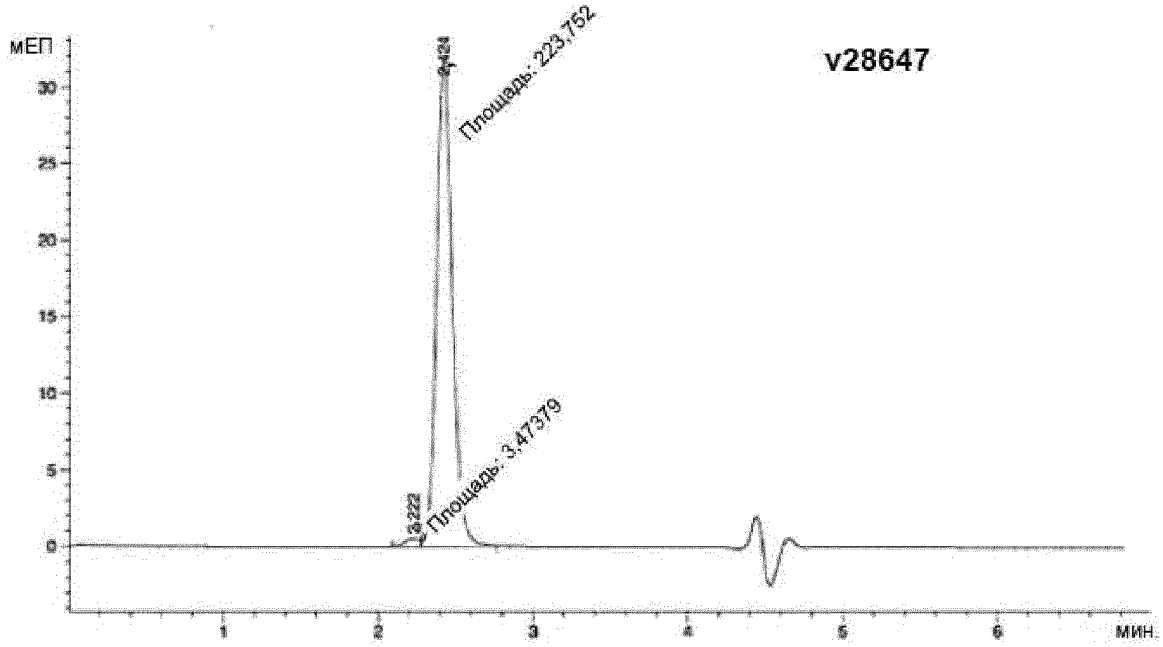

| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,442 | MF | 0,1129 | 5,29076 | 7,81097e-1 | 1,5373 |
| 2 | 2,573 | FM | 0,1737 | 26,55422 | 2,54737 | 7,7159 |
| 3 | 2,864 | FM | 0,1706 | 312,30508 | 30,51262 | 90,7468 |

**ФИГ. 11H**



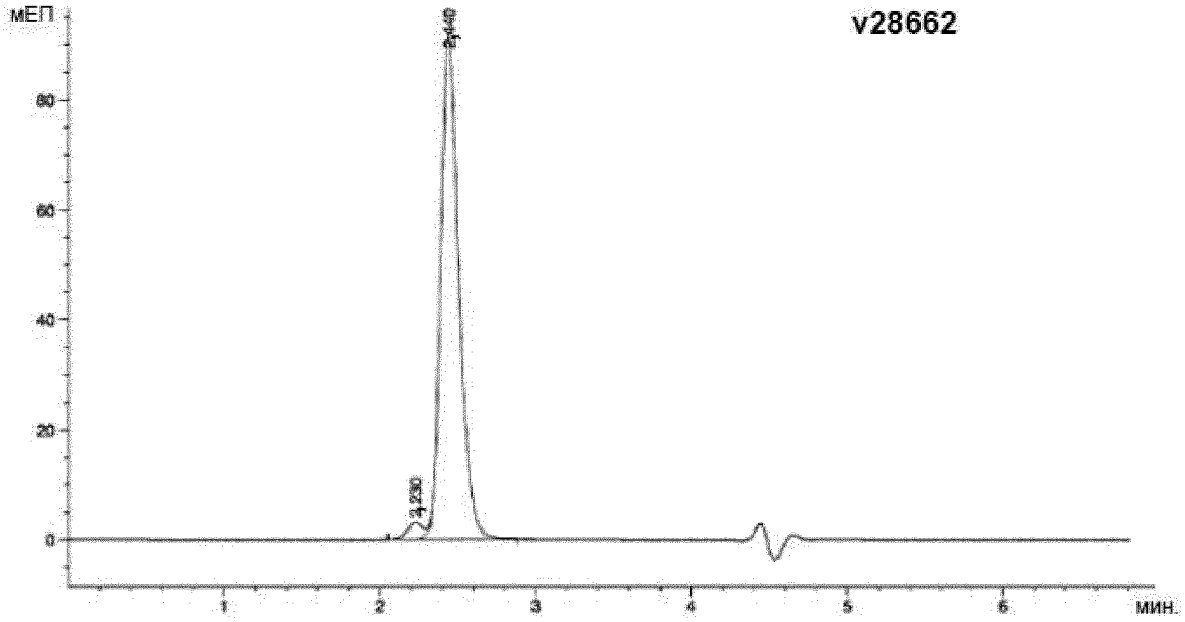

| Пик # | Время удер-живания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,541 | VV E | 0,1561 | 32,63872 | 3,19607 | 14,6612 |
| 2 | 2,826 | VB R | 0,1645 | 189,98111 | 16,98922 | 85,3388 |

**ФИГ. 11I**



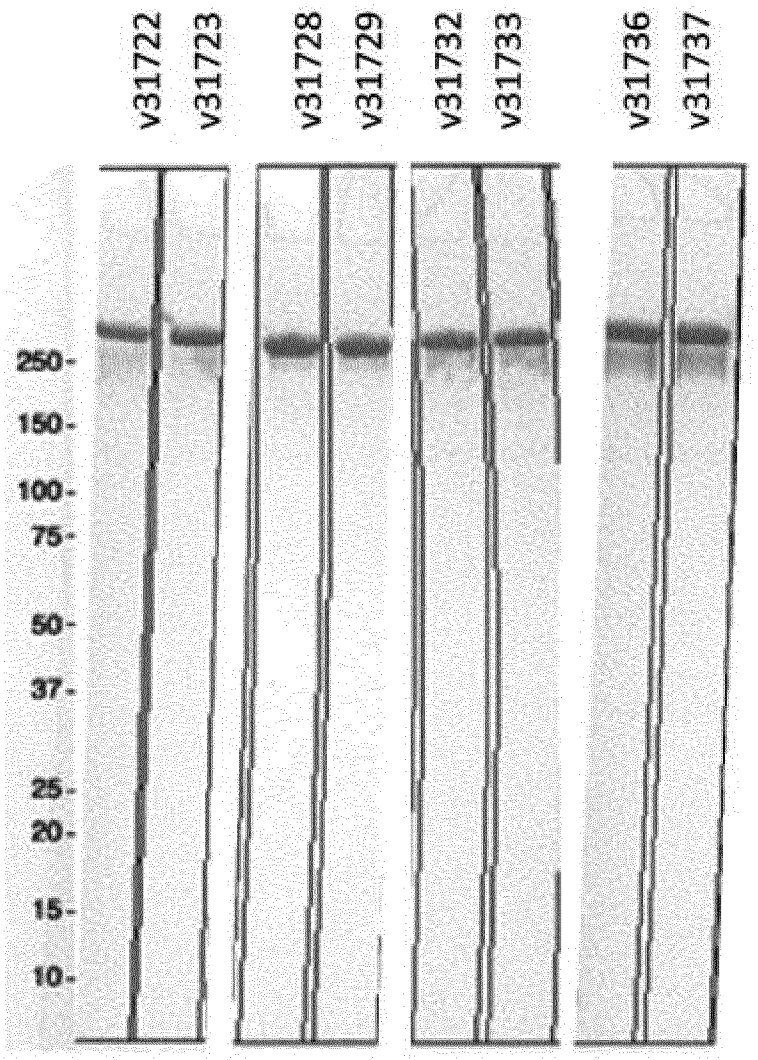

| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,222 | MF | 0,1055 | 3,47379 | 5,48860e-1 | 1,5288 |
| 2 | 2,424 | FM | 0,1177 | 223,75246 | 31,67435 | 98,4712 |

**ФИГ. 11J**

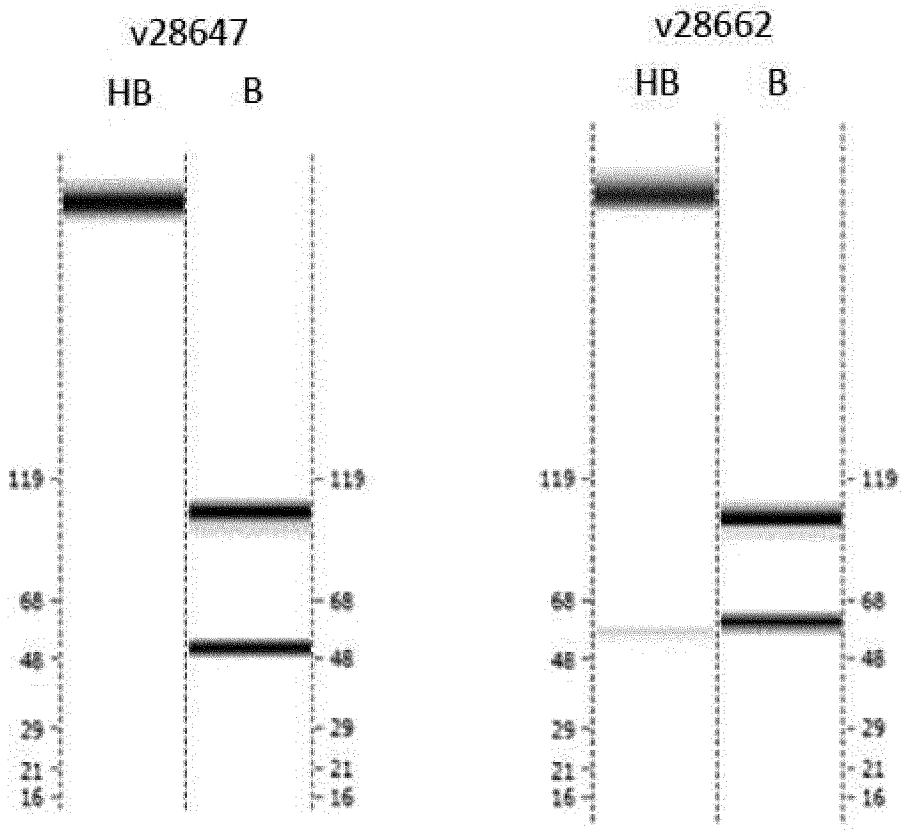



| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,230 | BV E | 0,1070 | 21,38368 | 3,07921 | 2,8078 |
| 2 | 2,440 | VB R | 0,1221 | 740,20691 | 91,77920 | 97,1922 |

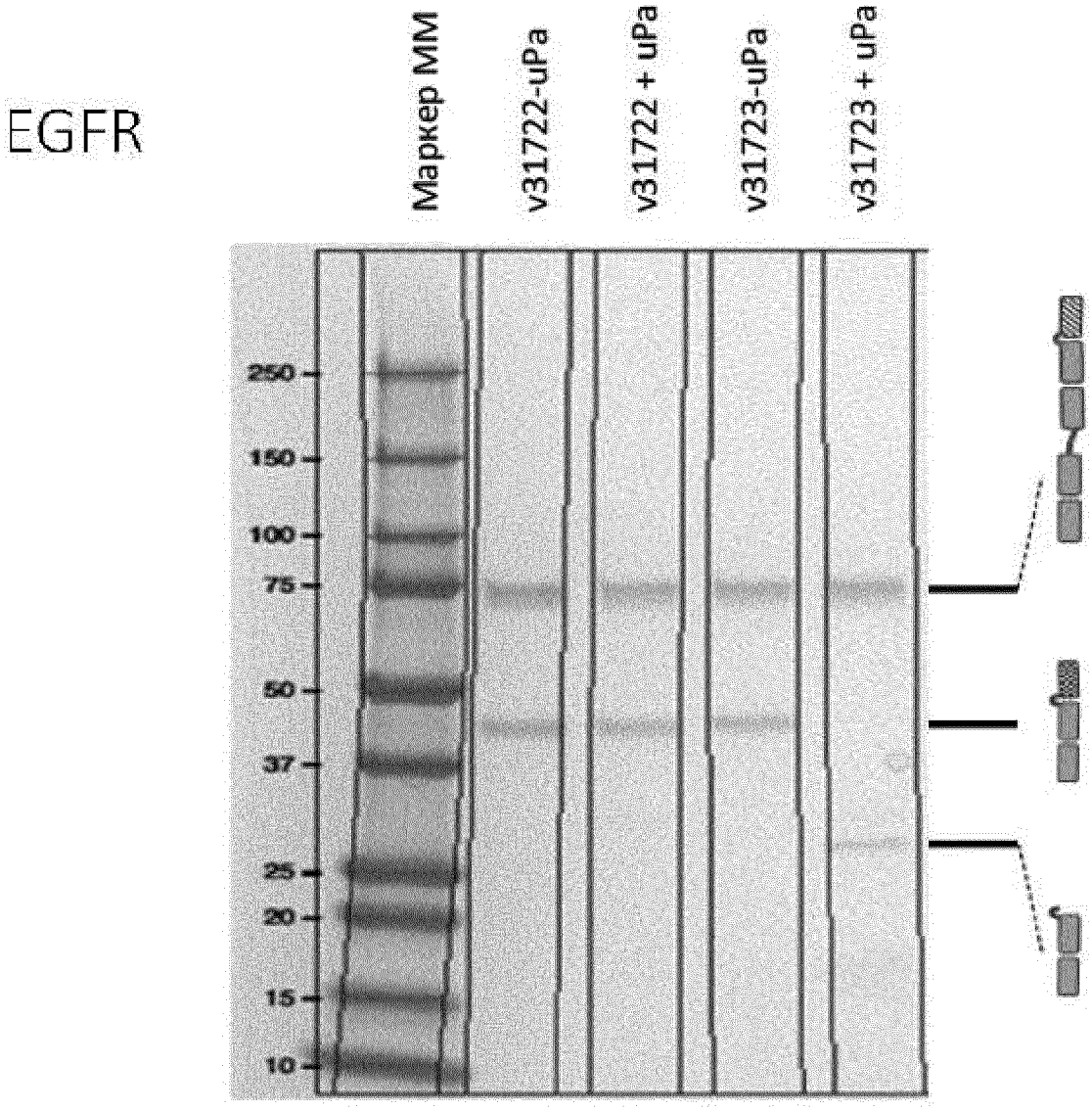
ФИГ. 11K


v31722
v31723
v31728
v31729
v31732
v31733
v31736
v31737
250-
150-
100-
75-
50-
37-
25-
20-
15-
10-

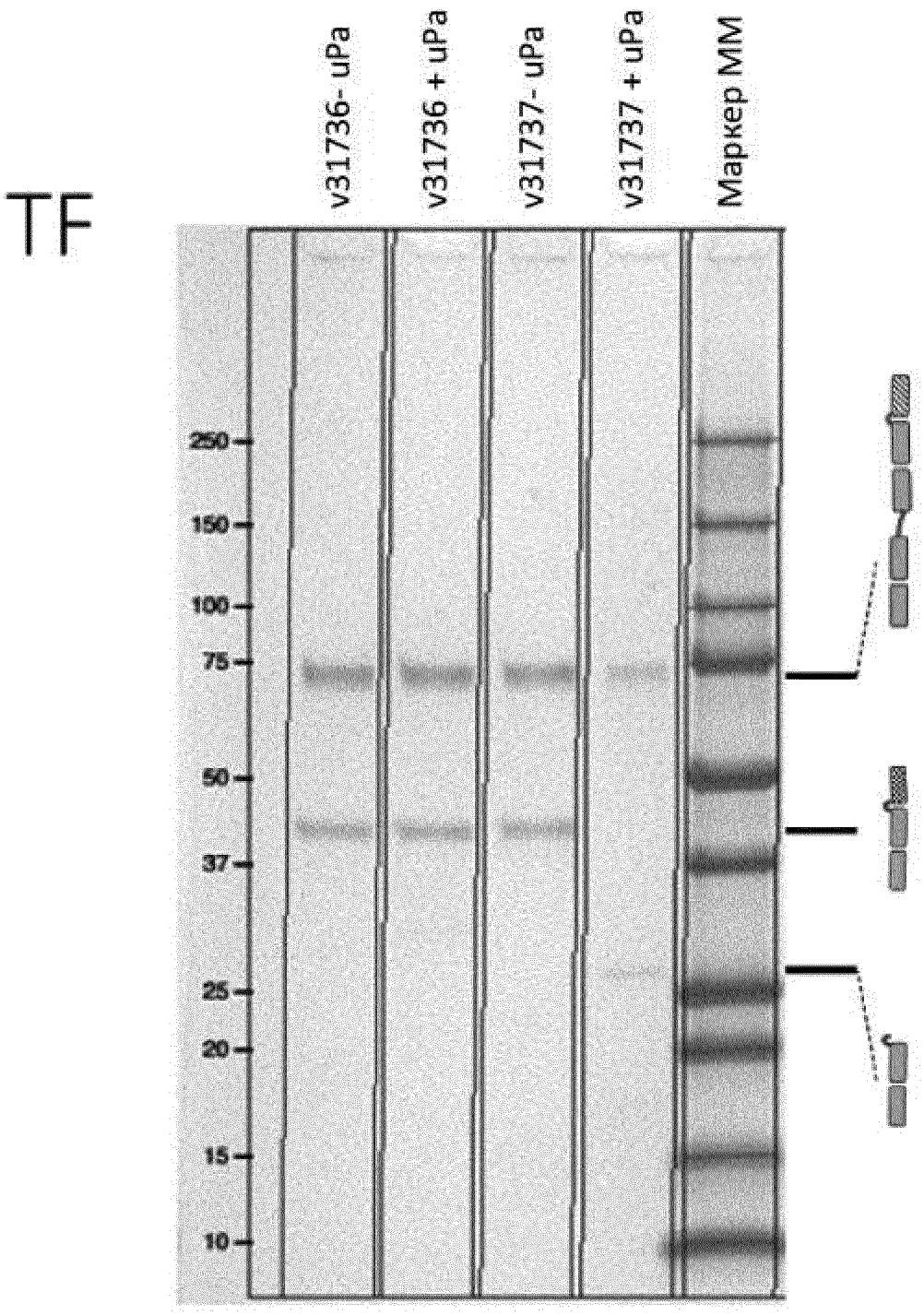
ФИГ. 11L



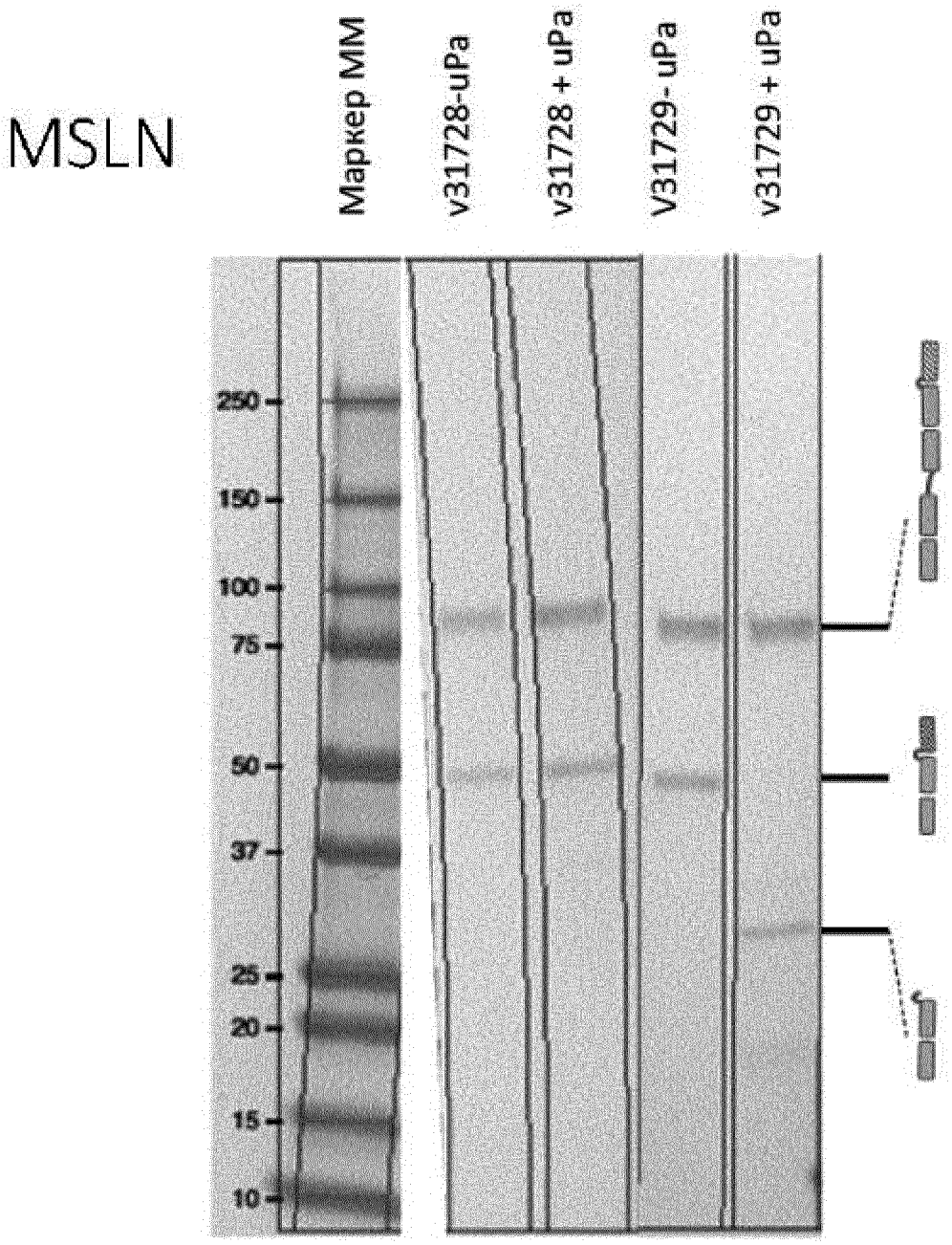
ФИГ. 12А


EGFR
Маркер ММ
v31722-uPa
v31722 + uPa
v31723-uPa
v31723 + uPa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

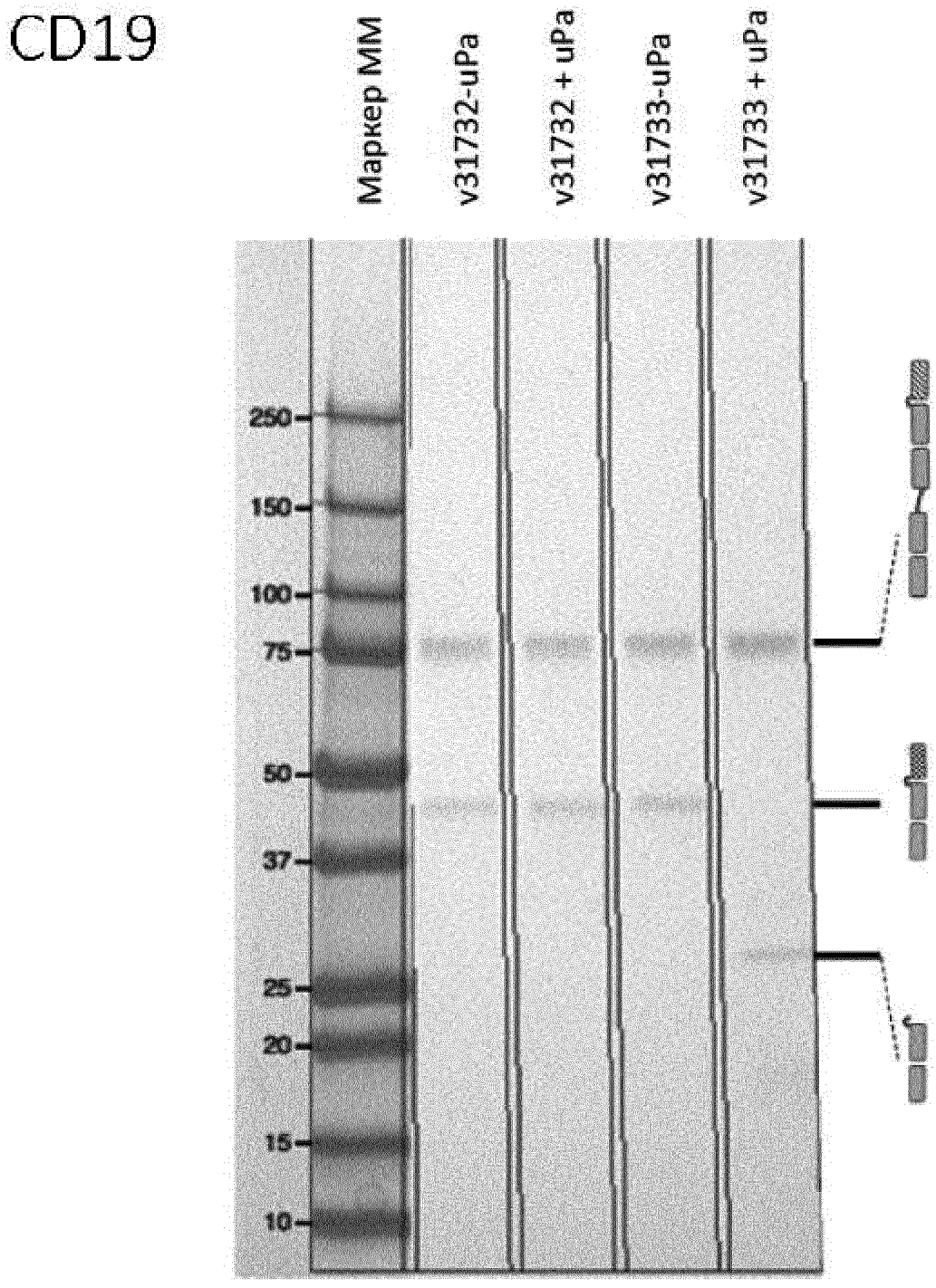
ФИГ. 12B


TF
v31736- uPa
v31736 + uPa
v31737- uPa
v31737 + uPa
Маркер ММ
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

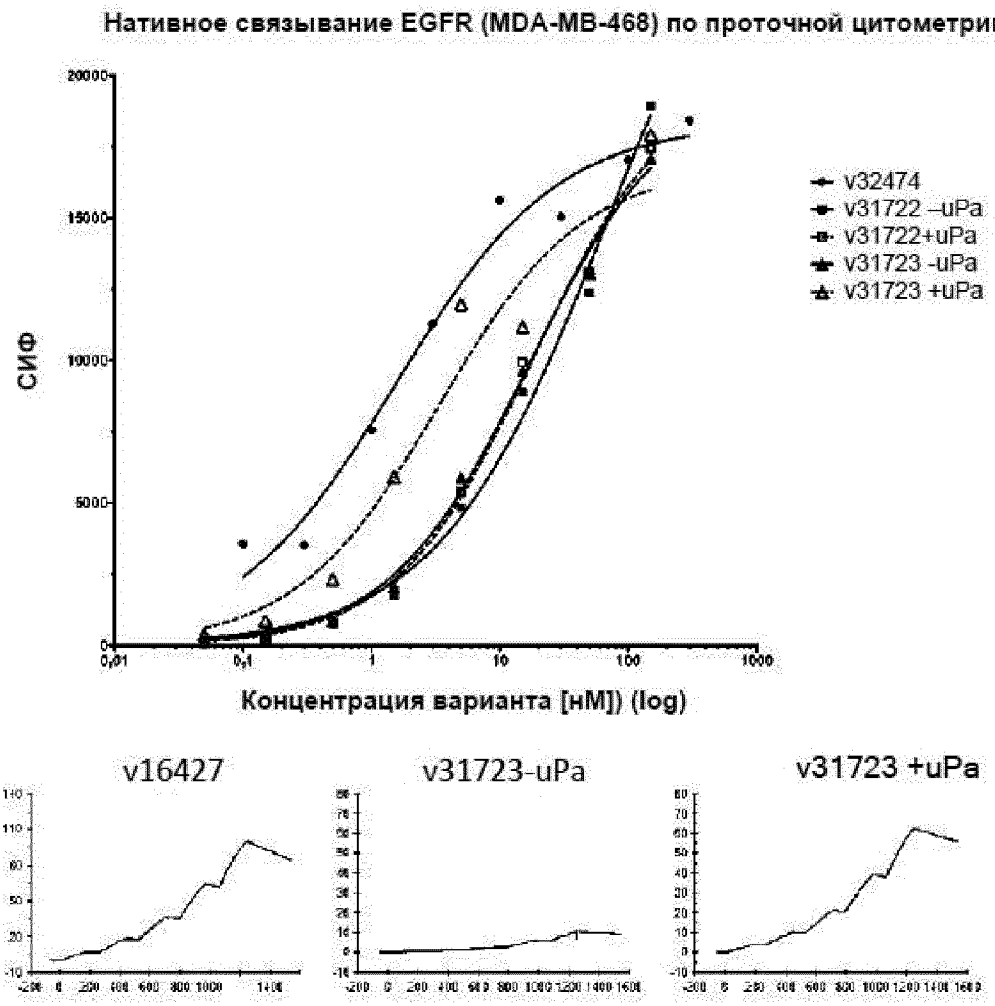
ФИГ. 12C


MSLN
Маркер ММ
v31728-uPa
v31728 + uPa
V31729- uPa
v31729 + uPa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

ФИГ. 12D

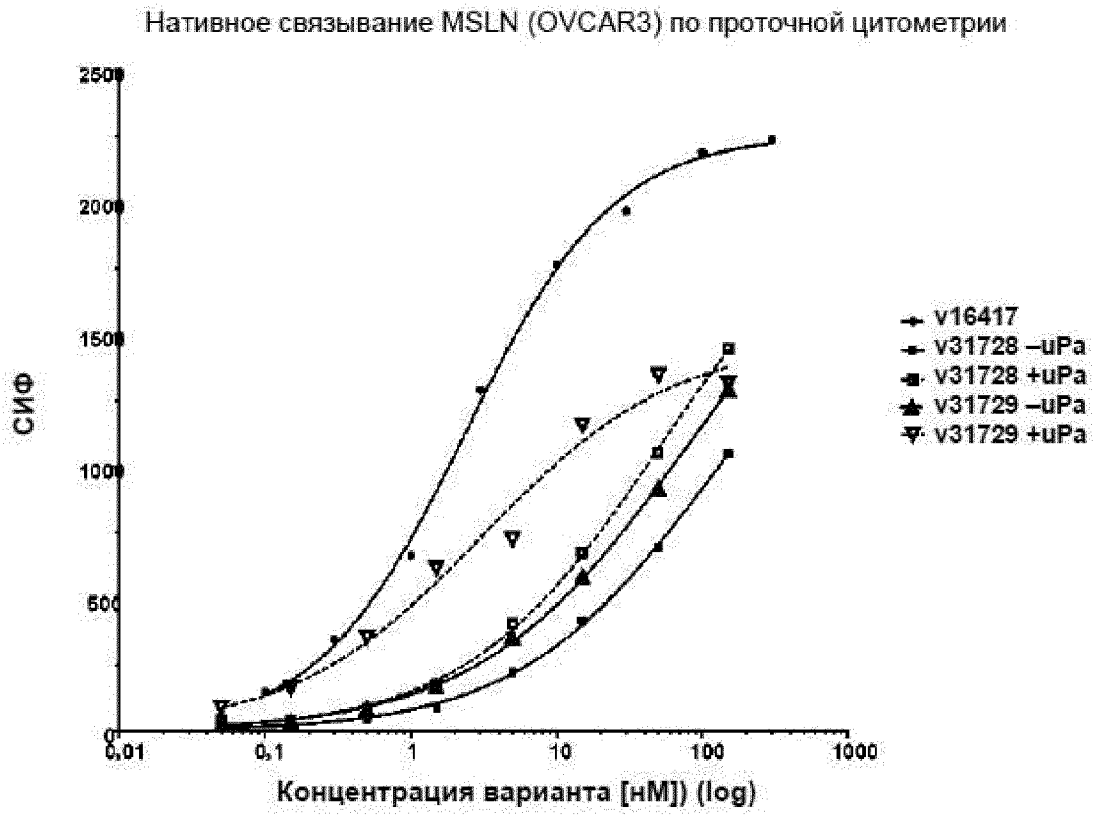

CD19
Маркер ММ
v31732-uPa
v31732 + uPa
v31733-uPa
v31733 + uPa
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

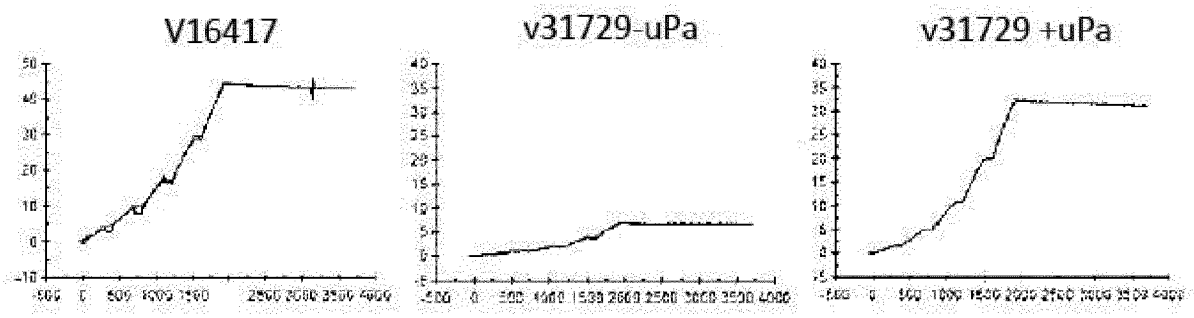
ФИГ. 13А




| Образец | Проточная цитометрия - MDA-MB 468 | | SPR | |
|---|---|---|---|---|
| | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ | $K_D$ по ППР (M) | Кратность относительно ДТ |
| V32474 | 1,6E-09 | 1 Н/Д | | Н/Д |
| V16427 | 6,6E-09 | 4,3 | 5,8E-09 | 1 |
| V31722 -uPa | 7,0E-08 | 45 | 2,3E-08 | 3,9 |
| V31722 +uPa | 1,8E-08 | 12 | 5,8E-09 | 1,0 |
| V31723 -uPa | 1,7E-08 | 11 | 5,5E-09 | 0,94 |
| V31723 +uPa | 3,3E-09 | 2,2 | 1,1E-09 | 0,19 |

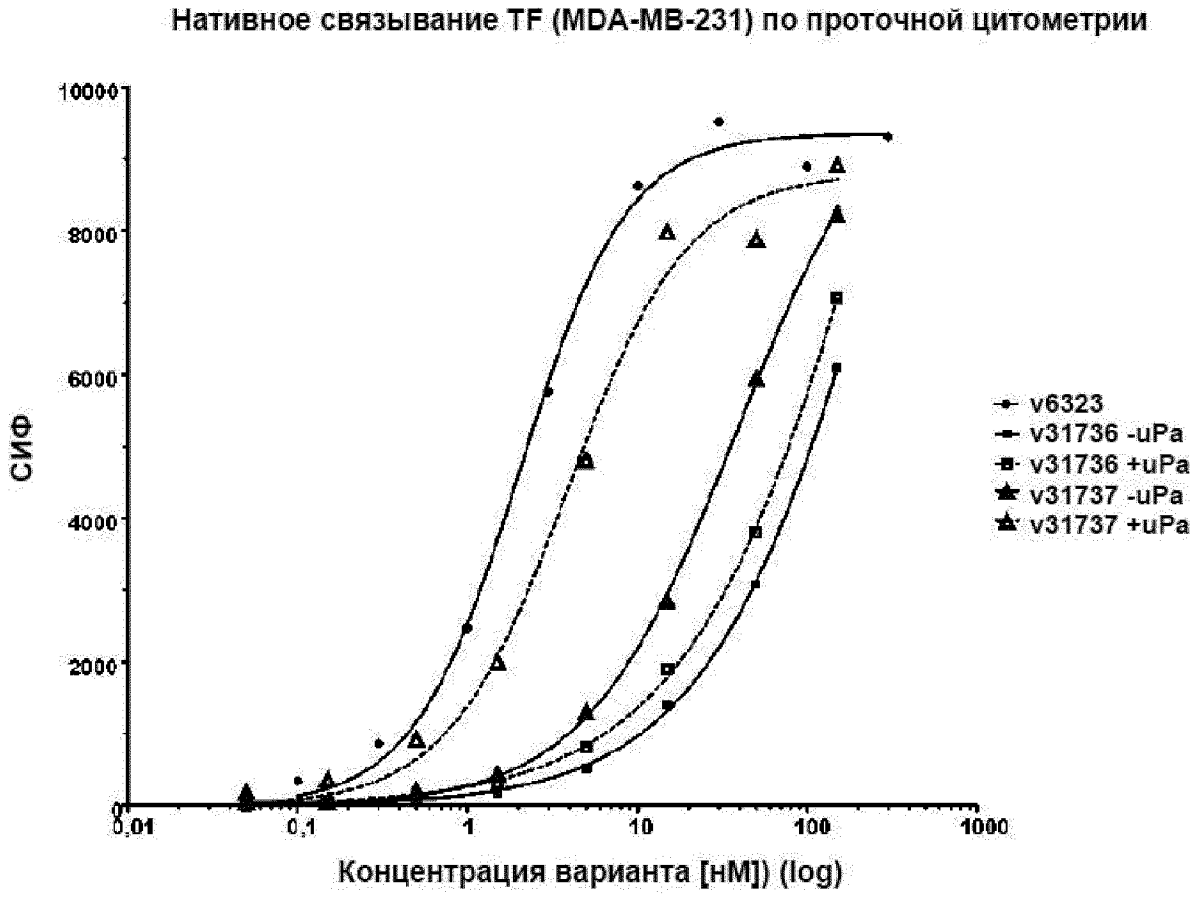
**ФИГ. 13B**

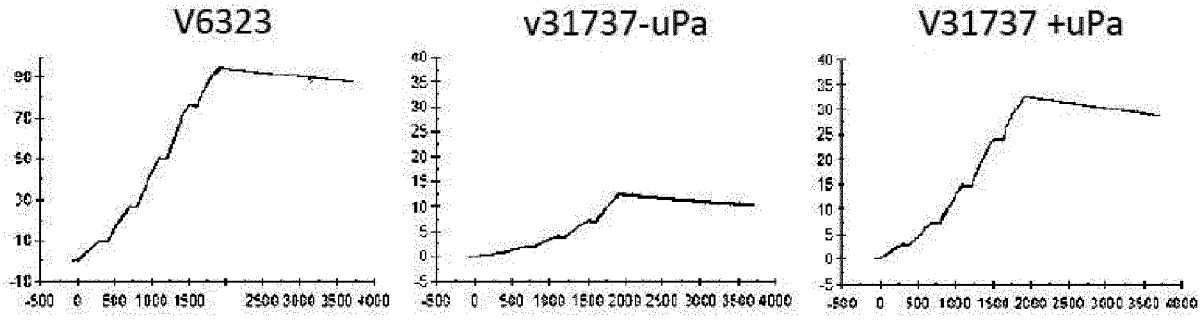



| Образец | OVAR3 по FACS | | ППР | |
|---|---|---|---|---|
| | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ | $K_D$ по ППР (M) | Кратность относительно ДТ |
| V16417 | 2,4E-09 | 1 | 1,2E-10 | 1 |
| V31728 -uPa | 1,1E-07 | 48 | 1,5E-09 | 12 |
| v31728 +uPa | 5,0E-08 | 21 | 4,8E-10 | 3,9 |
| V31729 -uPa | 7,4E-08 | 31 | н/с | Н/Д |
| v31729 +uPa | 3,1E-09 | 1,3 | 1,2E-10 | 1,0 |

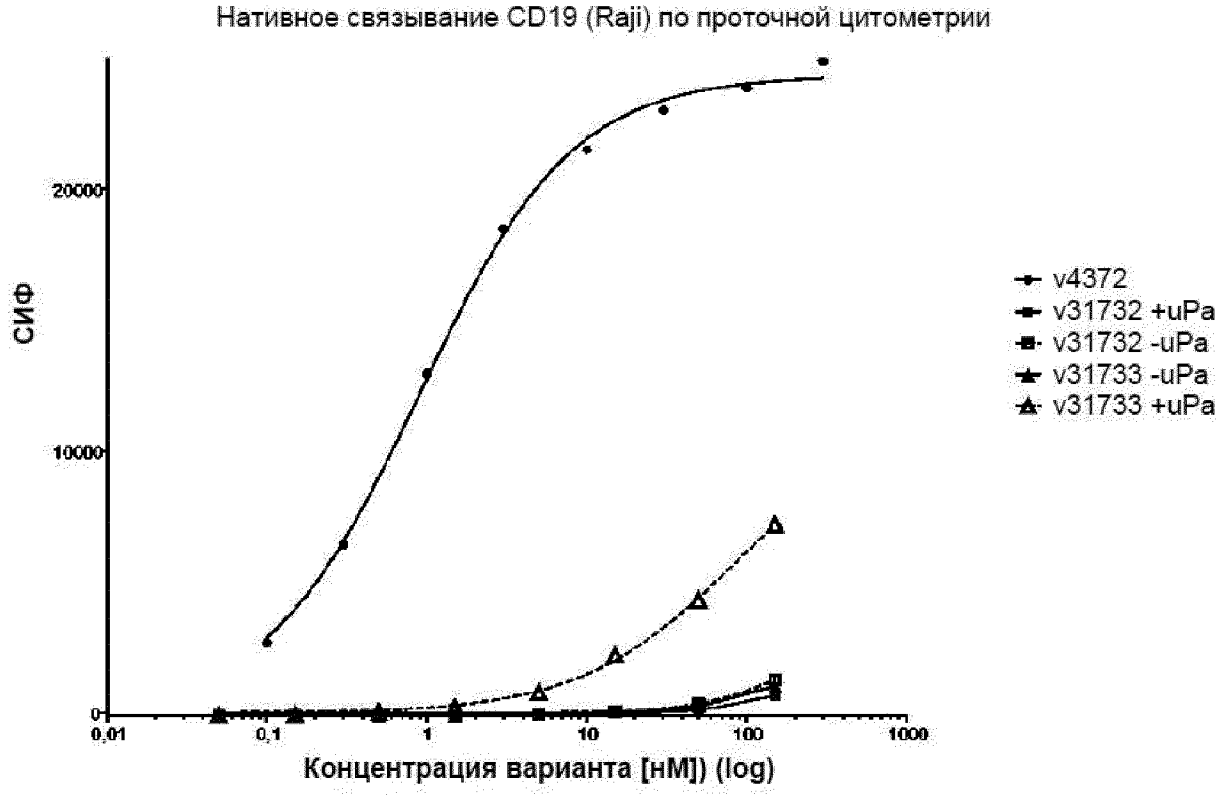
ФИГ. 13C




| Образец | Проточная цитометрия - MDA-MB 231 | | SPR | |
|---|---|---|---|---|
| | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ | $K_D$ по ППР (M) | Кратность относительно ДТ |
| v6323 | 2,0E-09 | 1 | 1,6E-10 | 1 |
| v31736-uPa | 3,5E-07 | 170 | 6,7E-10 | 4,1 |
| v31736 +uPa | 3,8E-07 | 190 | 3,3E-10 | 2,0 |
| V31737 -uPa | 3,9E-08 | 19 | 6,2E-10 | 3,8 |
| V31737 +uPa | 3,9E-09 | 1,9 | 1,7E-10 | 1,1 |

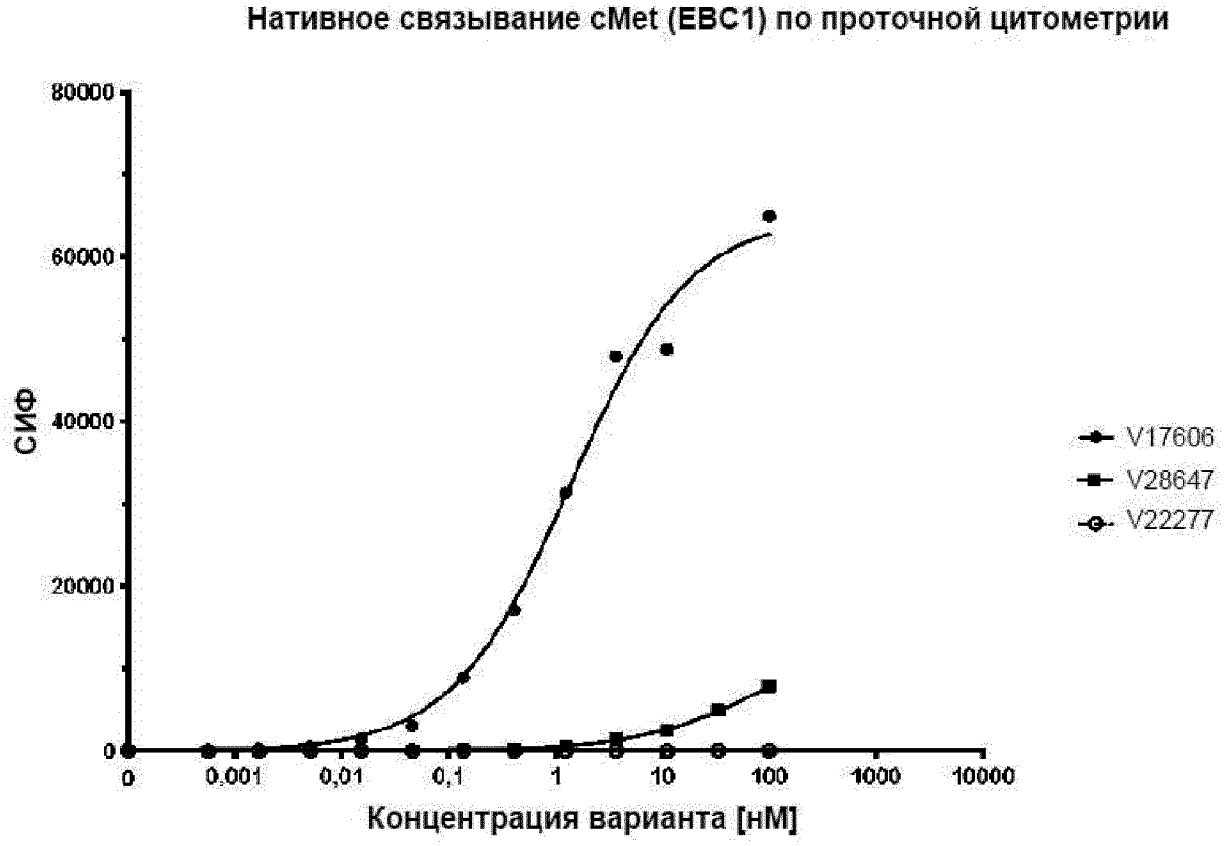
ФИГ. 13D




| Образец | Проточная цитометрия - Raji | |
|---|---|---|
| | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
| v4372 | 9,0E-10 | 1,00 |
| v31732-uPa | >3,0E-07* | >330* |
| v31732 +uPa | >3,0E-07* | >330* |
| v31733 -uPa | >3,0E-07* | >330* |
| v31733 +uPa | >3,0E-07* | >330* |

*плохая аппроксимация

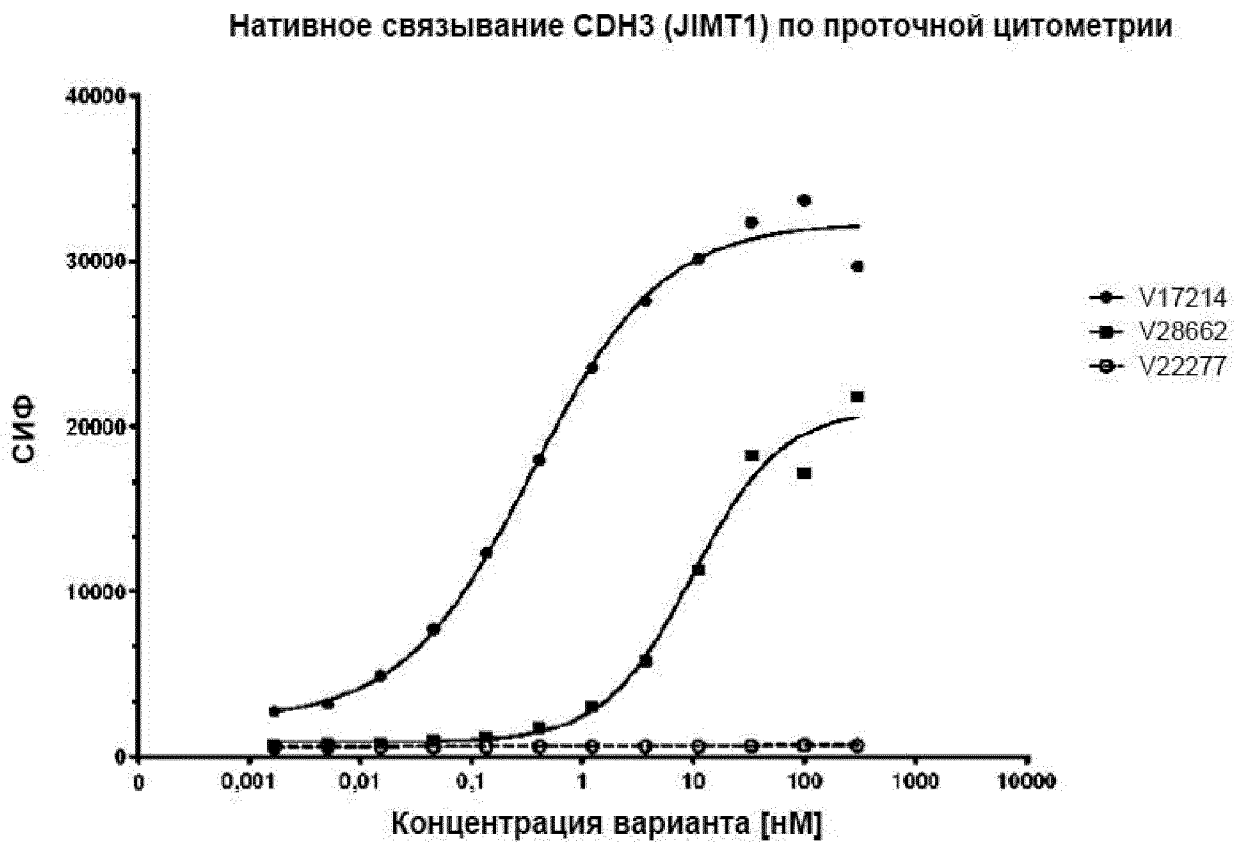
ФИГ. 13E




| Образец | Проточная цитометрия - EBC1 | |
|---|---|---|
| | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
| V17606 | 1,4E-09 | 1 |
| V28647 | > 1E-07* | >71* |
| v22277 | > 1E-07* | >71* |

*плохая аппроксимация

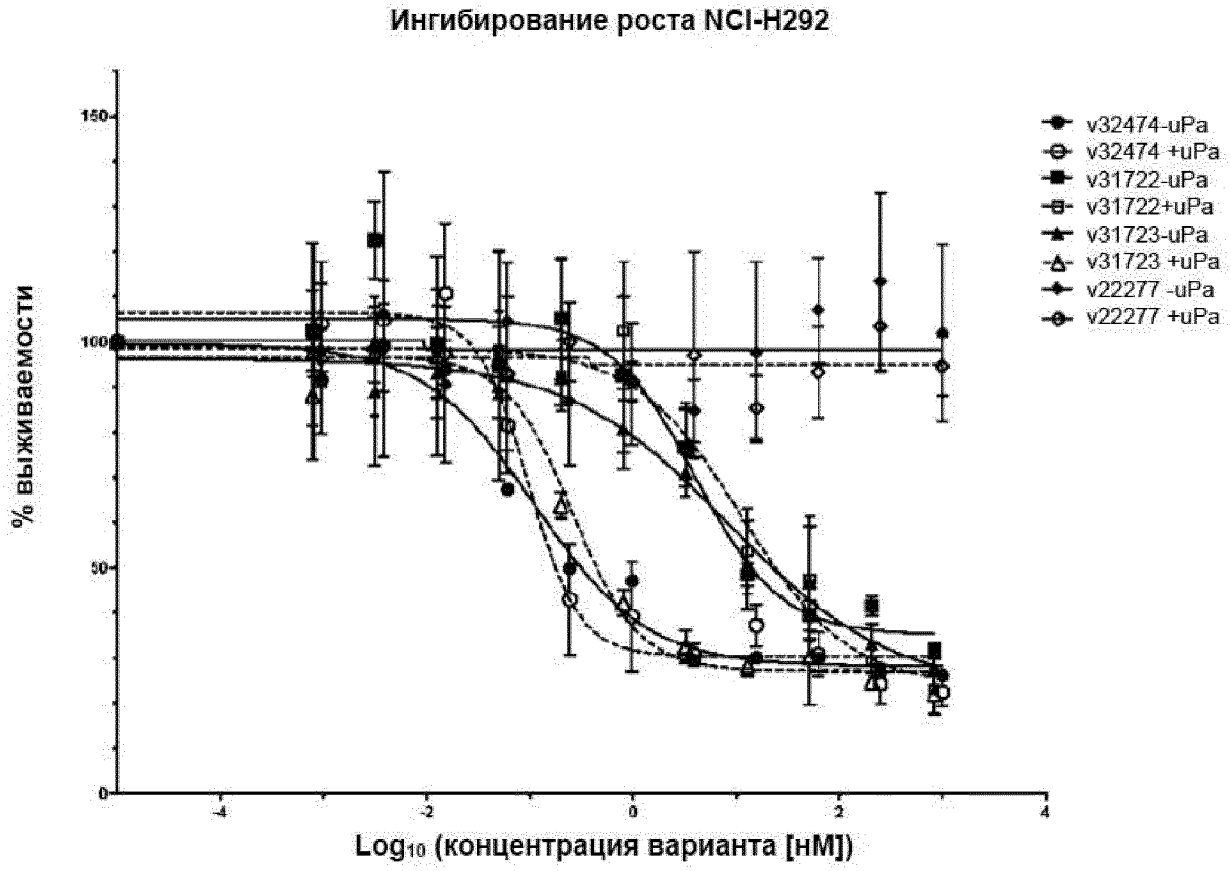
ФИГ. 13F




| Образец | Проточная цитометрия - JIMT1 | |
|---|---|---|
| | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
| V17214 | 3,6E-10 | 1 |
| V28662 | 9,8E-09 | 28 |
| V22277 | > 3E+07* | >830* |

*плохая аппроксимация

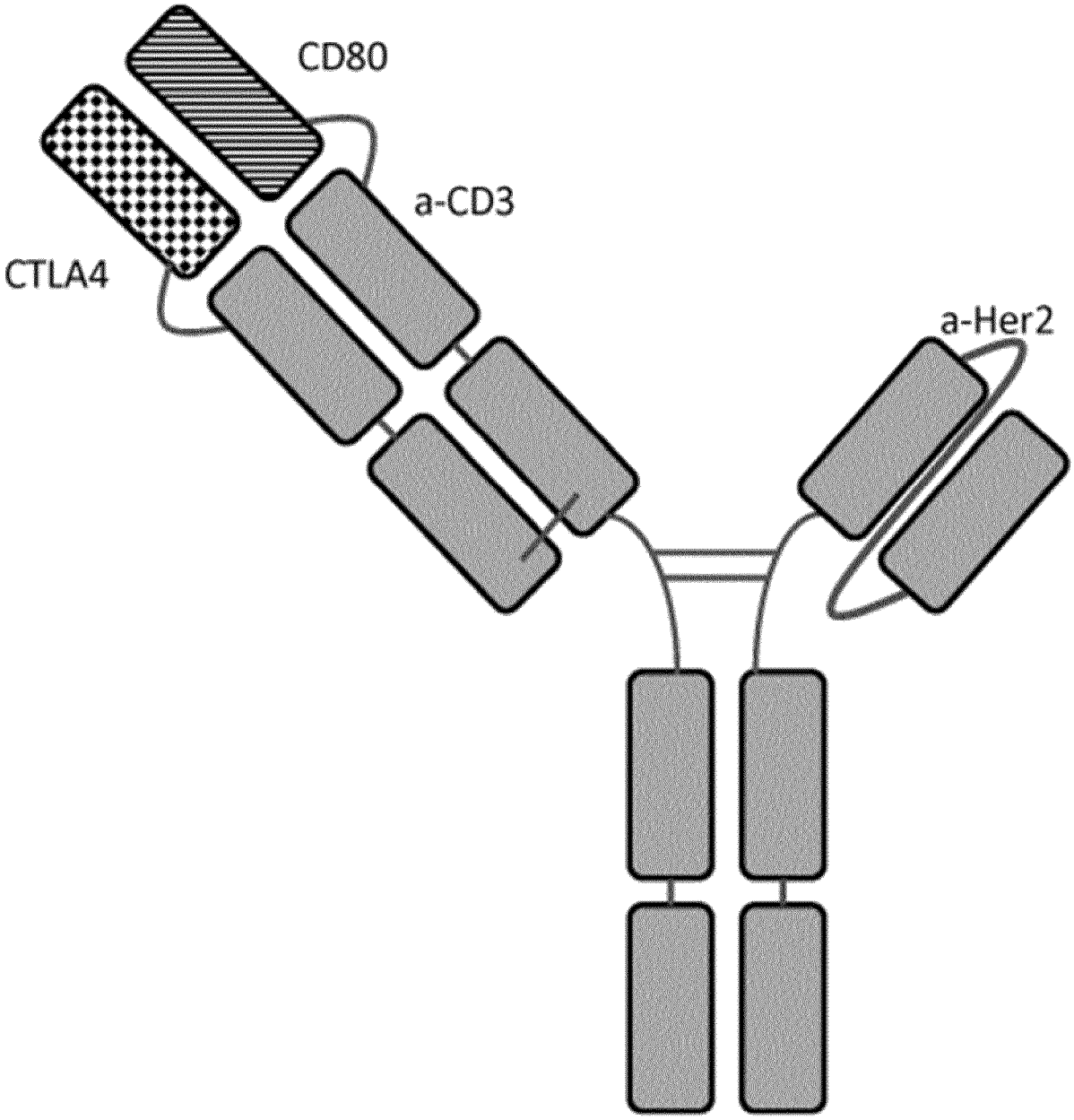
**ФИГ. 14**



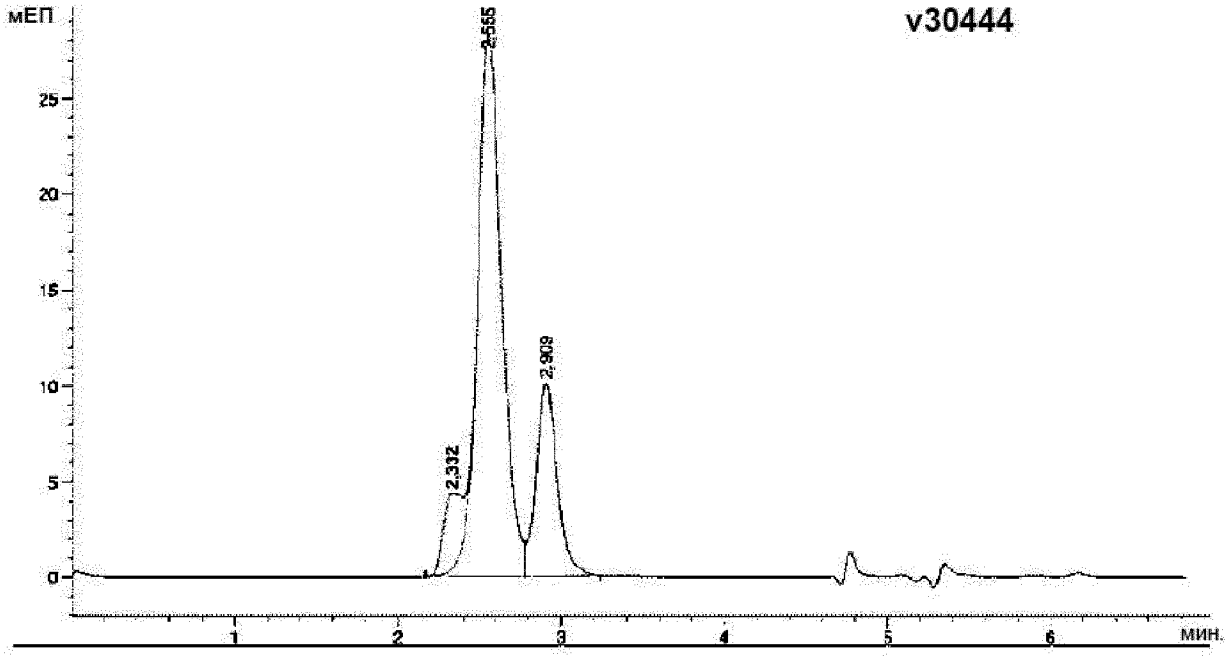

Индекс роста NCI-H292 = 21,5

| Образец | Индекс роста NCI-H292 | |
|---|---|---|
| | IC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
| v32474 -uPa | 1,1E-10 | 7 |
| v32474 +uPa | 1,0E-10 | 0,87 |
| V31722 -uPa | 4,0E-09 | 36 |
| V31722 +uPa | 1,1E-08 | 100 |
| V31723 -uPa | 8,6E-09 | 77 |
| V31723 +uPa | 2,6E-10 | 2,3 |
| v22277 -uPa | Н/Д | Н/О |
| v22277 +uPa | Н/Д | Н/О |

ФИГ. 15

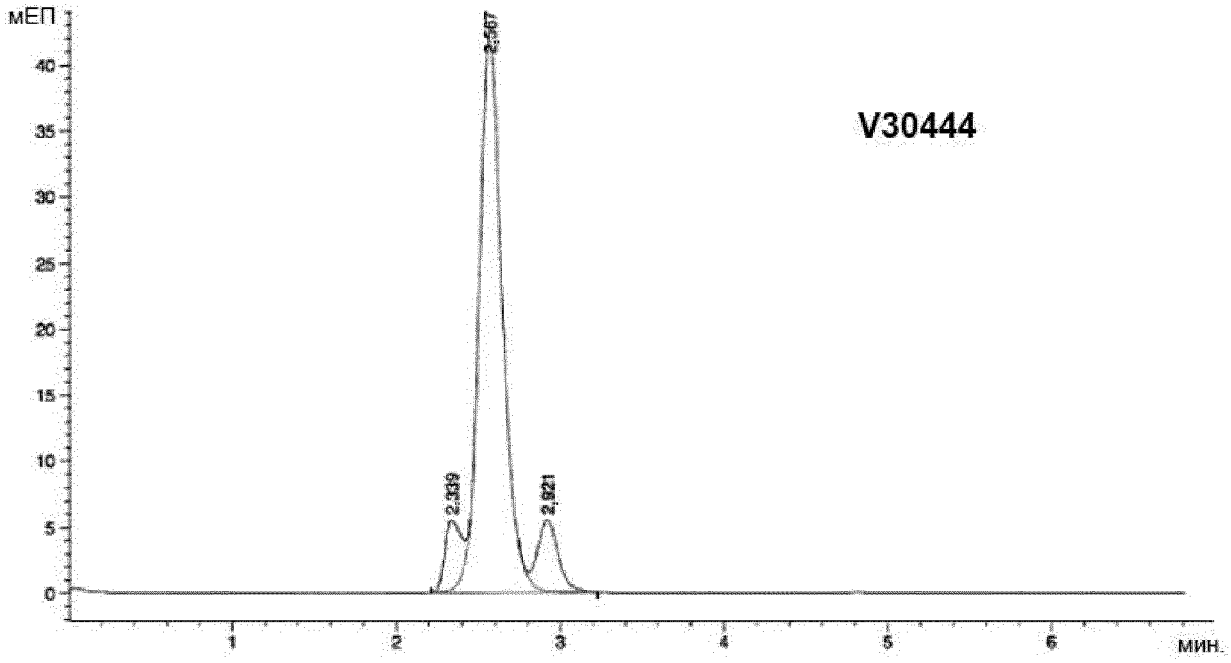


ФИГ. 16A



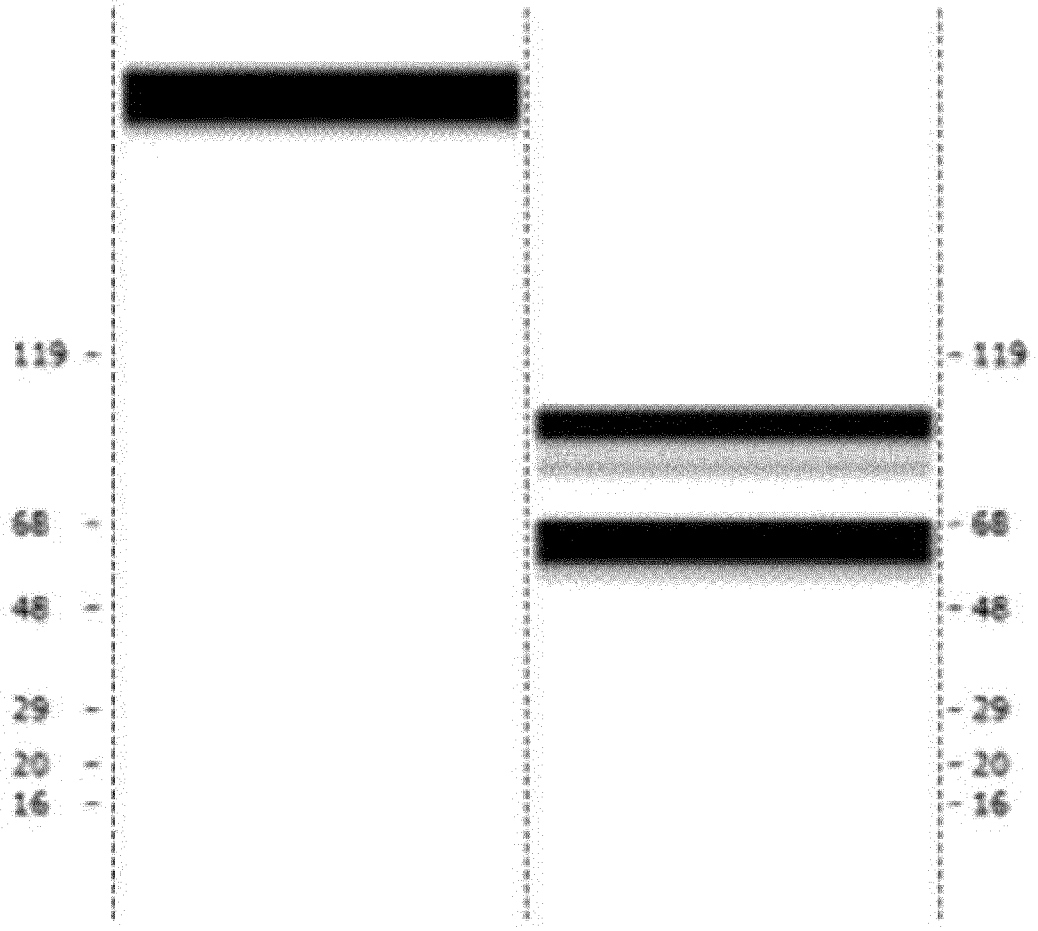

| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,332 | BV E | 0,1143 | 31,19075 | 3,90082 | 7,5147 |
| 2 | 2,555 | VV R | 0,1569 | 293,14438 | 28,29257 | 70,6266 |
| 3 | 2,909 | VB | 0,1358 | 90,72725 | 10,09851 | 21,8587 |

ФИГ. 16B

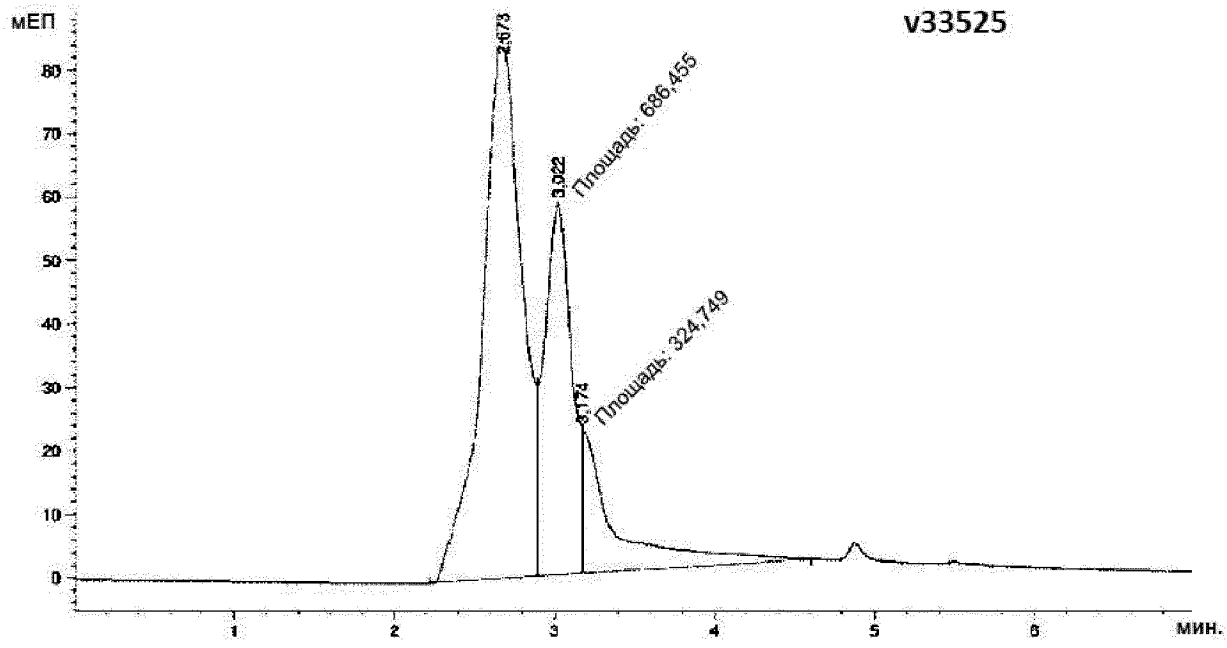



| Пик # | Время удер-живания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,339 | BV E | 0,1019 | 35,08809 | 5,25164 | 6,9324 |
| 2 | 2,567 | VV R | 0,1537 | 423,37900 | 41,96721 | 83,6471 |
| 3 | 2,921 | VB E | 0,1333 | 47,68172 | 5,43693 | 9,4205 |

ФИГ. 16C

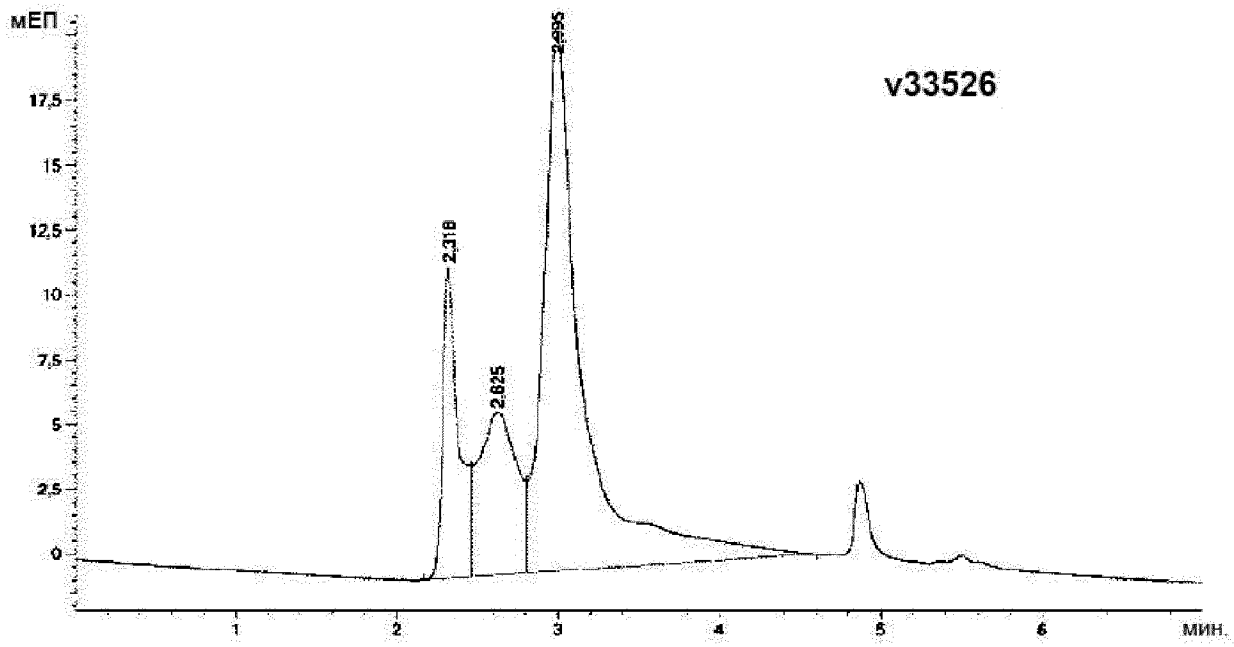


ФИГ. 16D



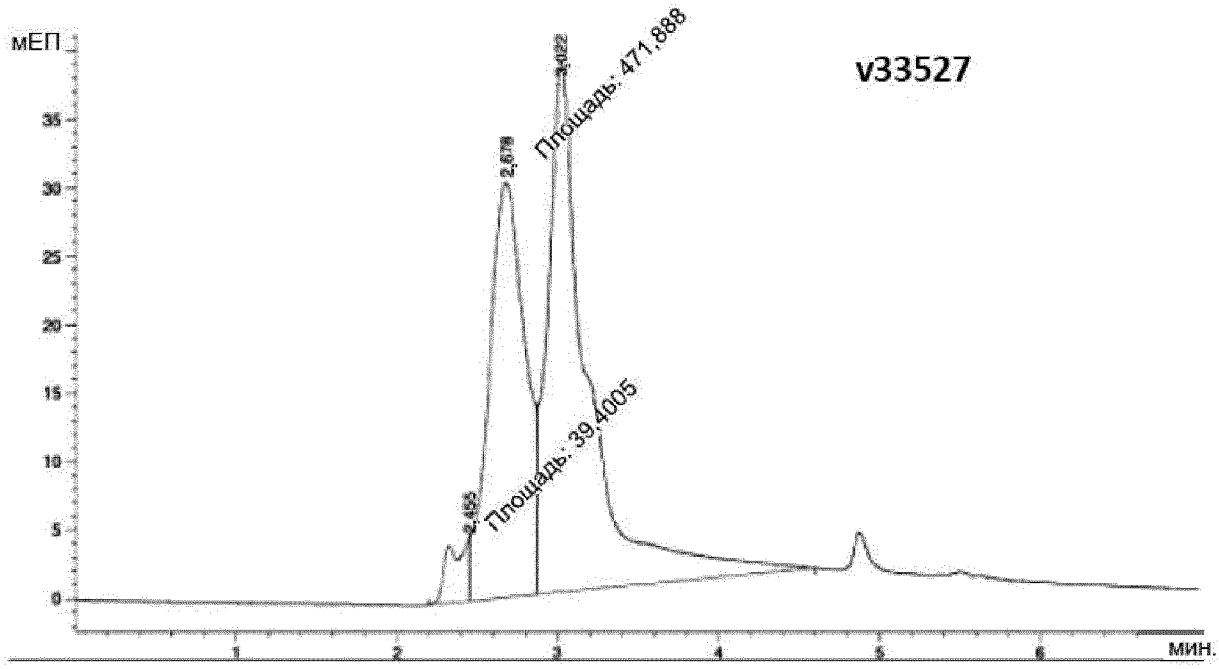

| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,673 | BV | 0,2537 | 1451,59802 | 84,79381 | 58,9409 |
| 2 | 3,022 | MF | 0,1952 | 686,45496 | 58,62623 | 27,8729 |
| 3 | 3,174 | FM | 0,2374 | 324,74911 | 22,80098 | 13,1862 |

ФИГ. 16E



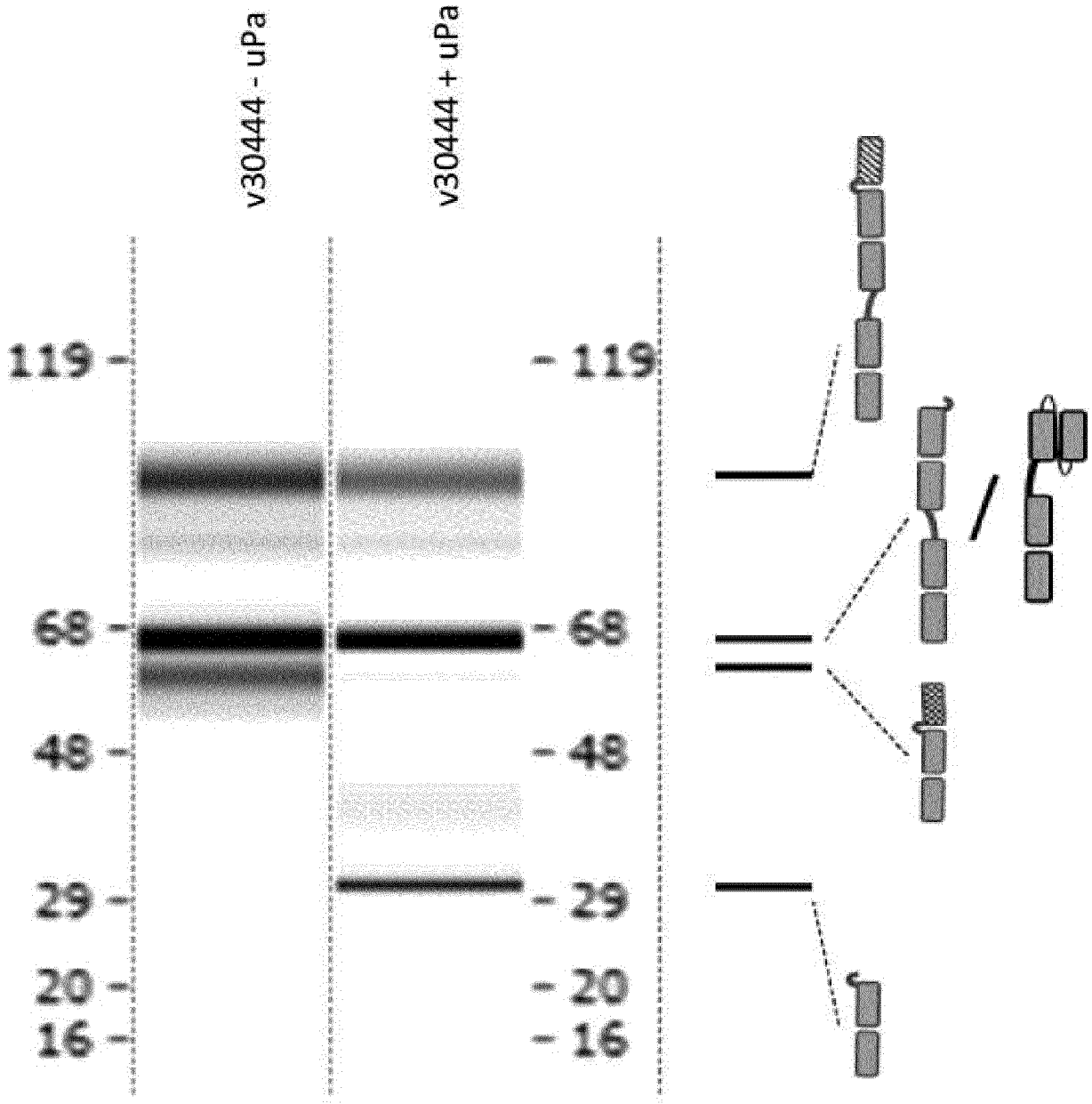

| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,318 | BV | 0,0963 | 80,58684 | 12,00411 | 14,9107 |
| 2 | 2,625 | VV | 0,2377 | 103,76338 | 6,25027 | 19,1990 |
| 3 | 2,995 | VBA | 0,2423 | 356,11160 | 20,53662 | 65,8902 |

**ФИГ. 16F**

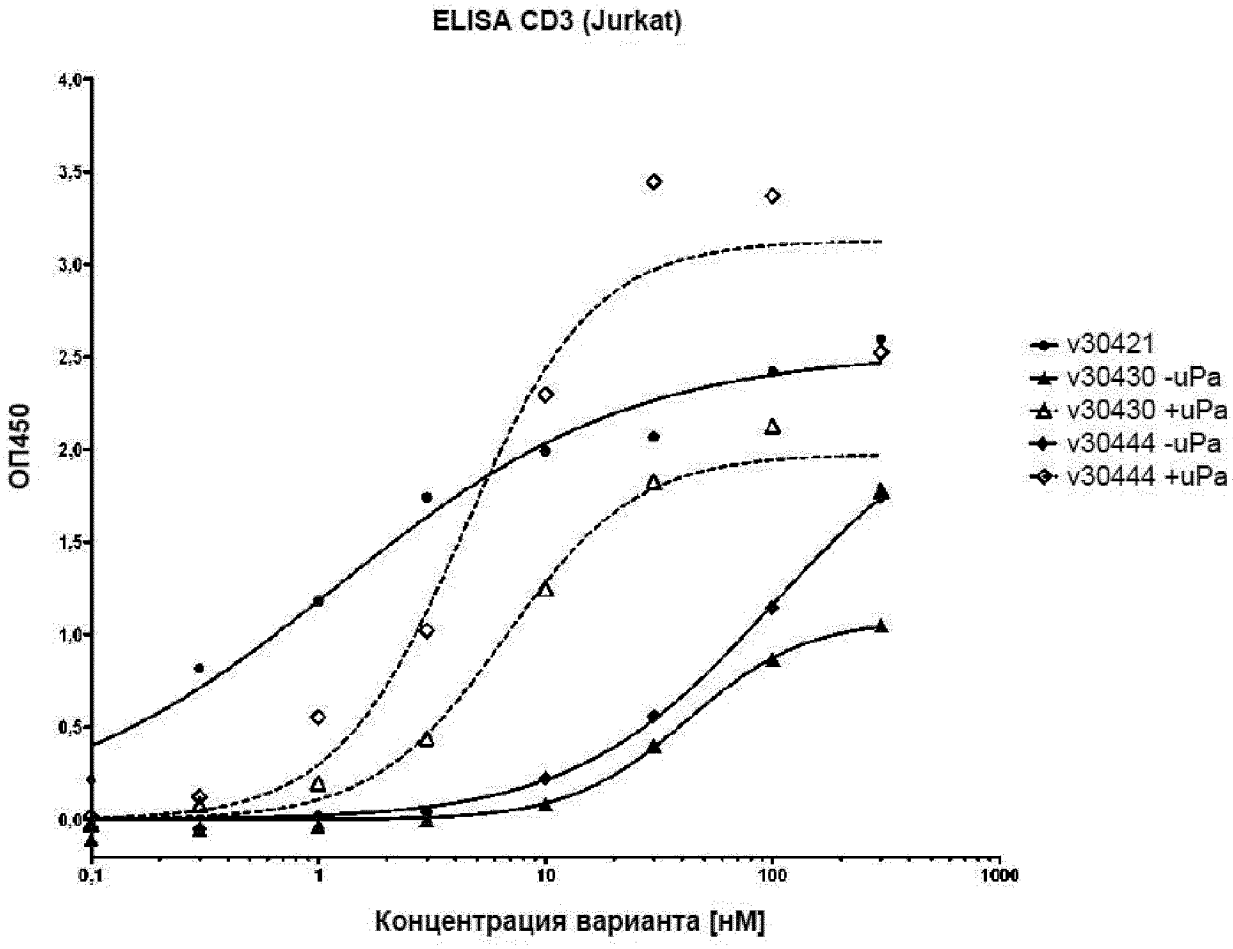



| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,455 | MF | 0,1440 | 39,40051 | 4,56031 | 3,2809 |
| 2 | 2,678 | FM | 0,2595 | 471,88821 | 30,30488 | 39,2946 |
| 3 | 3,022 | VBA | 0,2417 | 689,60992 | 38,74109 | 57,4245 |

ФИГ. 17

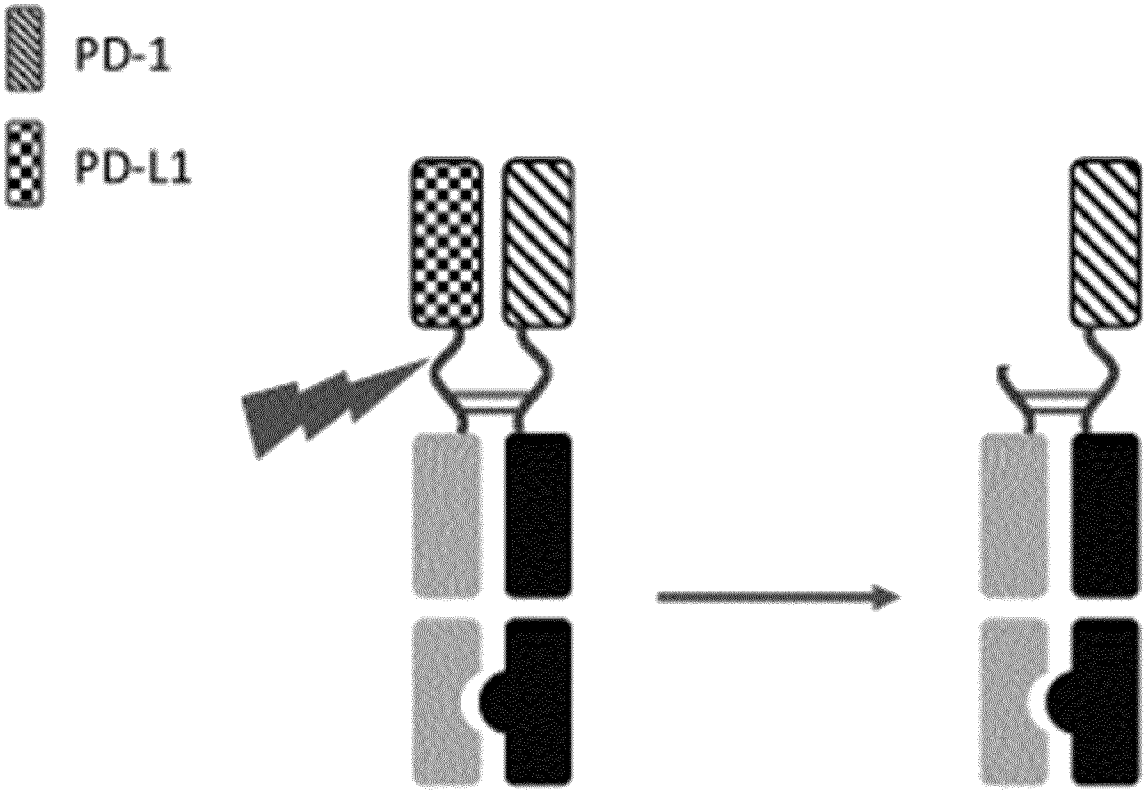


ФИГ. 18

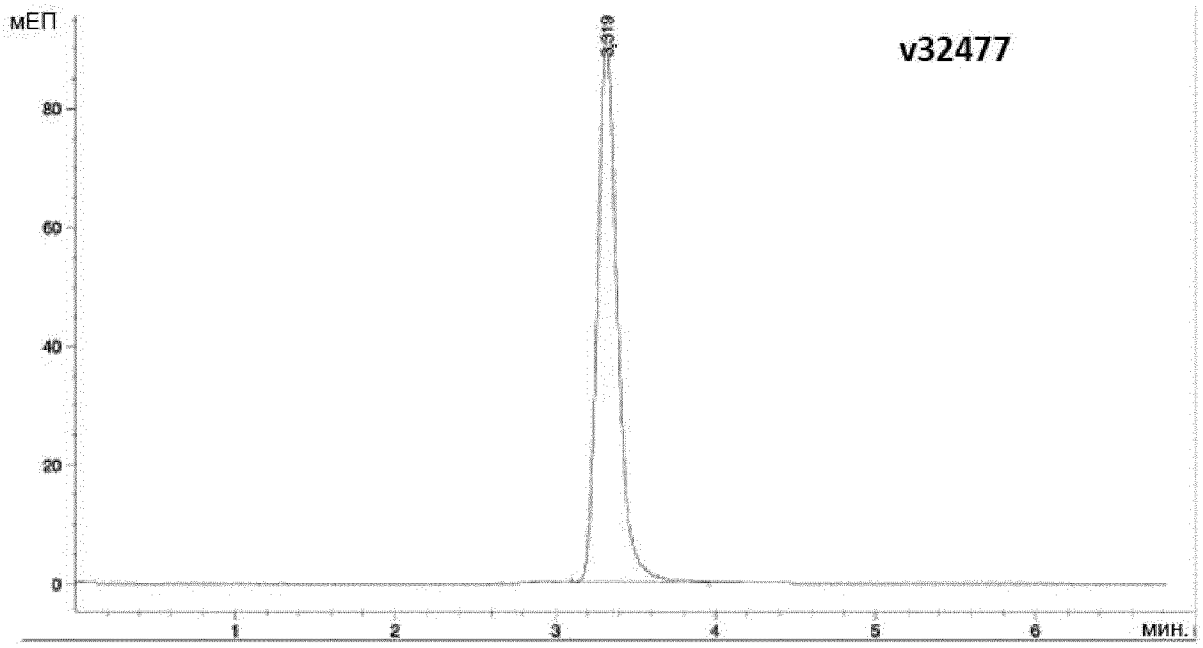



| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| v30421 | 1,2E-09 | 1 |
| v30430 -uPa | 4,2E-08 | 35 |
| v30430 +uPa | 6,7E-09 | 5,5 |
| v30444 -uPa | 1,0E-07 | 83 |
| v30444 +uPa | 4,4E-09 | 3,6 |

ФИГ. 19

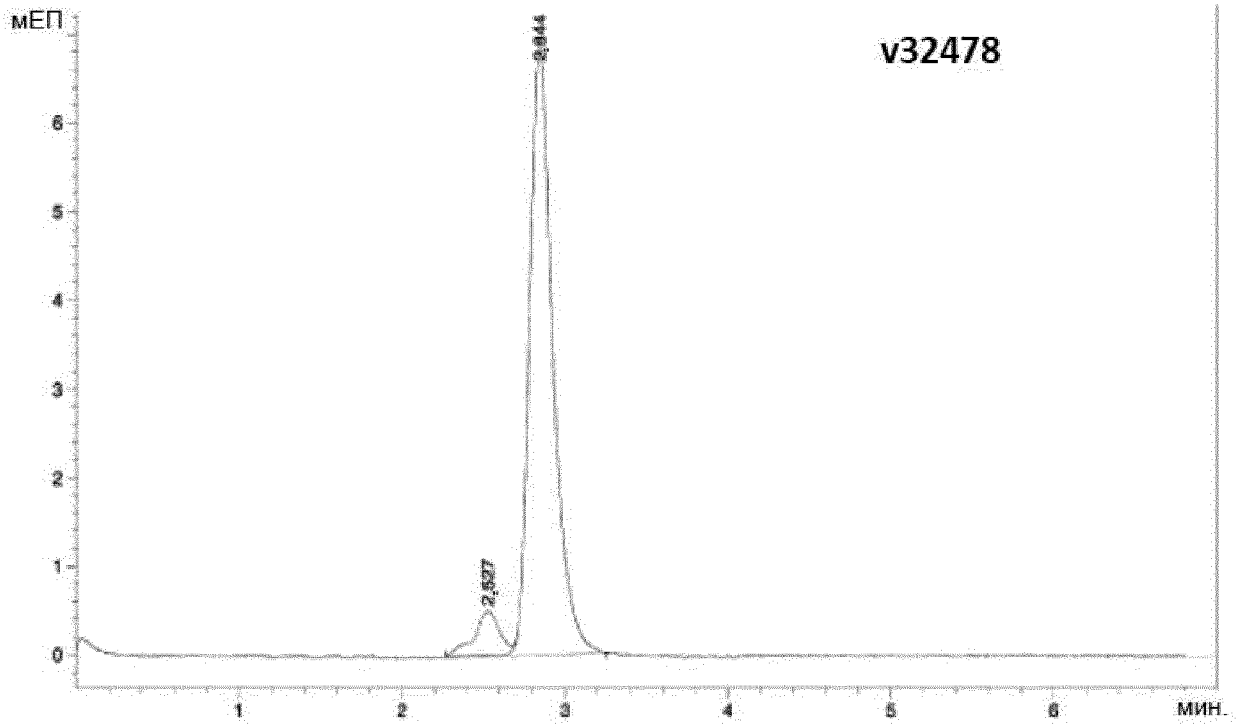


**ФИГ. 20А**



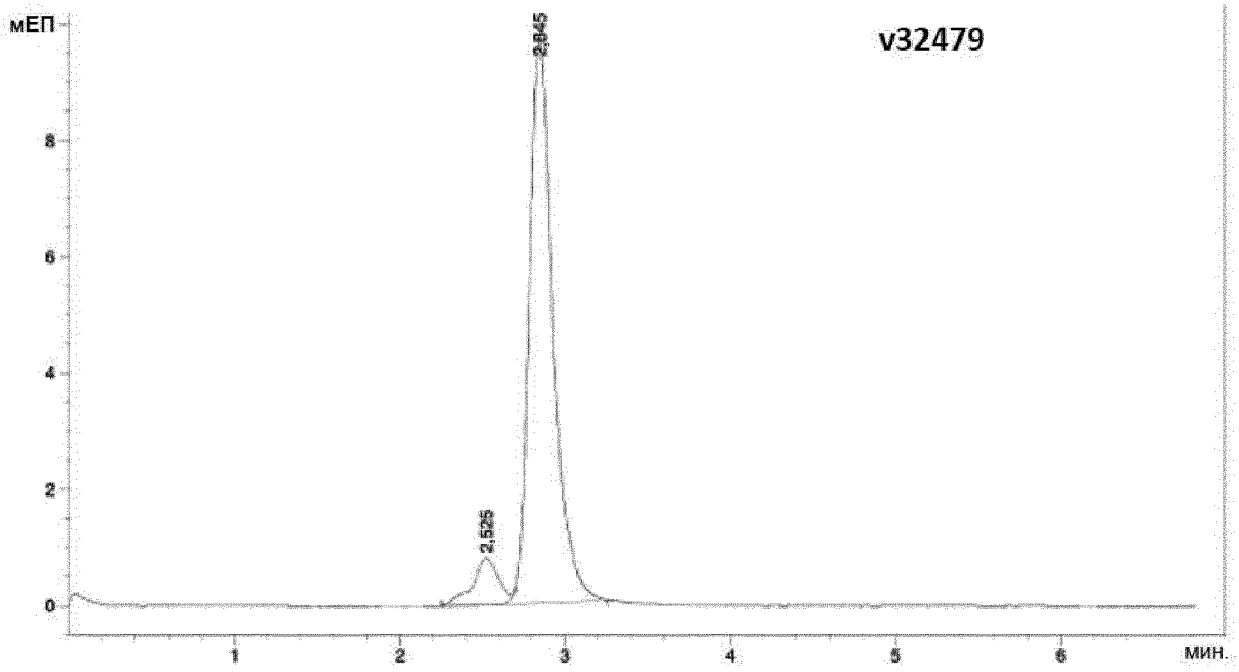

| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 3,319 | VB | 0,1337 | 802,02692 | 91,07478 | 100,0000 |

**ФИГ. 20B**



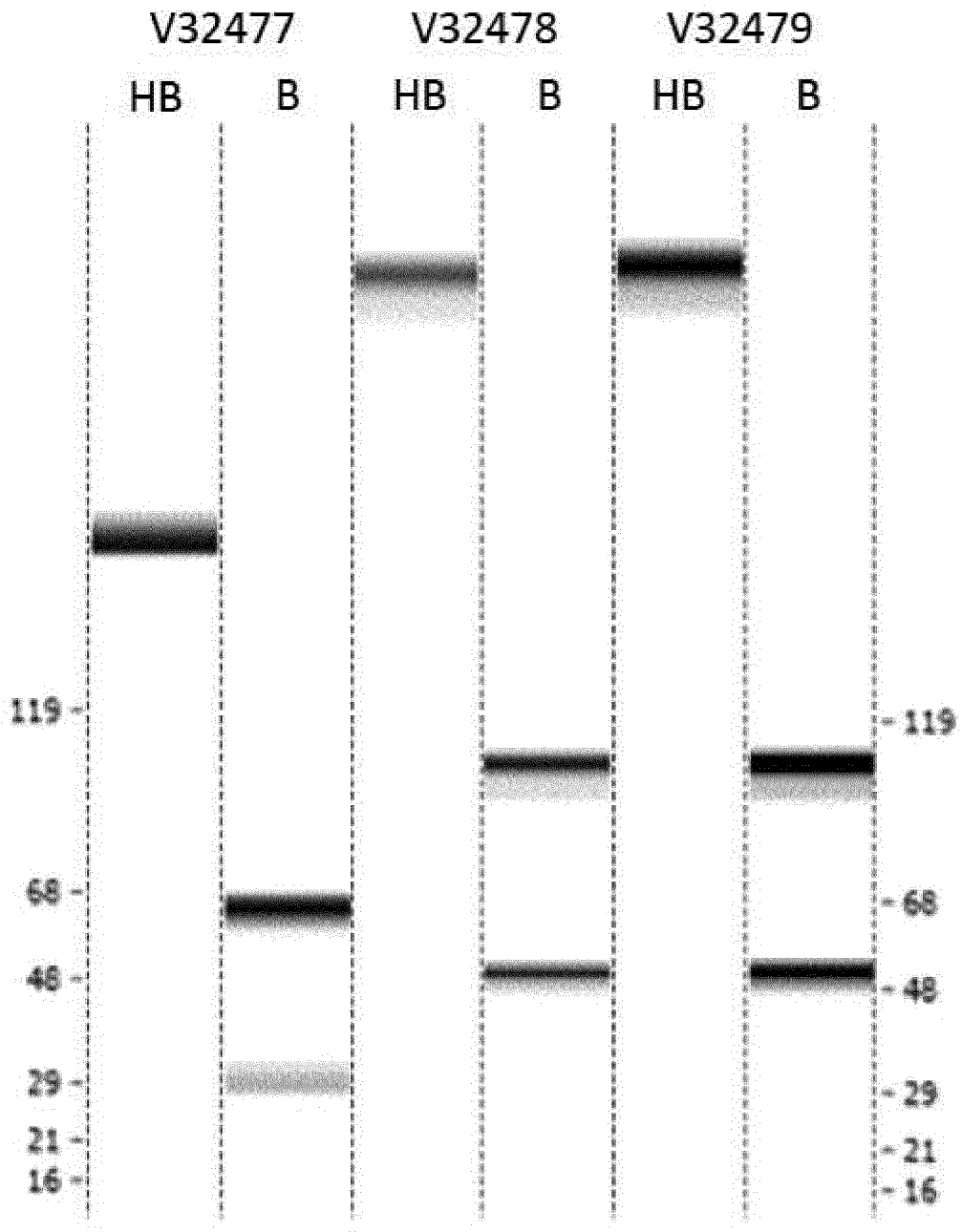

| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,527 | BV E | 0,1598 | 5,46772 | 5,03062e-1 | 7,4087 |
| 2 | 2,844 | VB R | 0,1509 | 68,33356 | 6,88026 | 92,5913 |

ФИГ. 20C

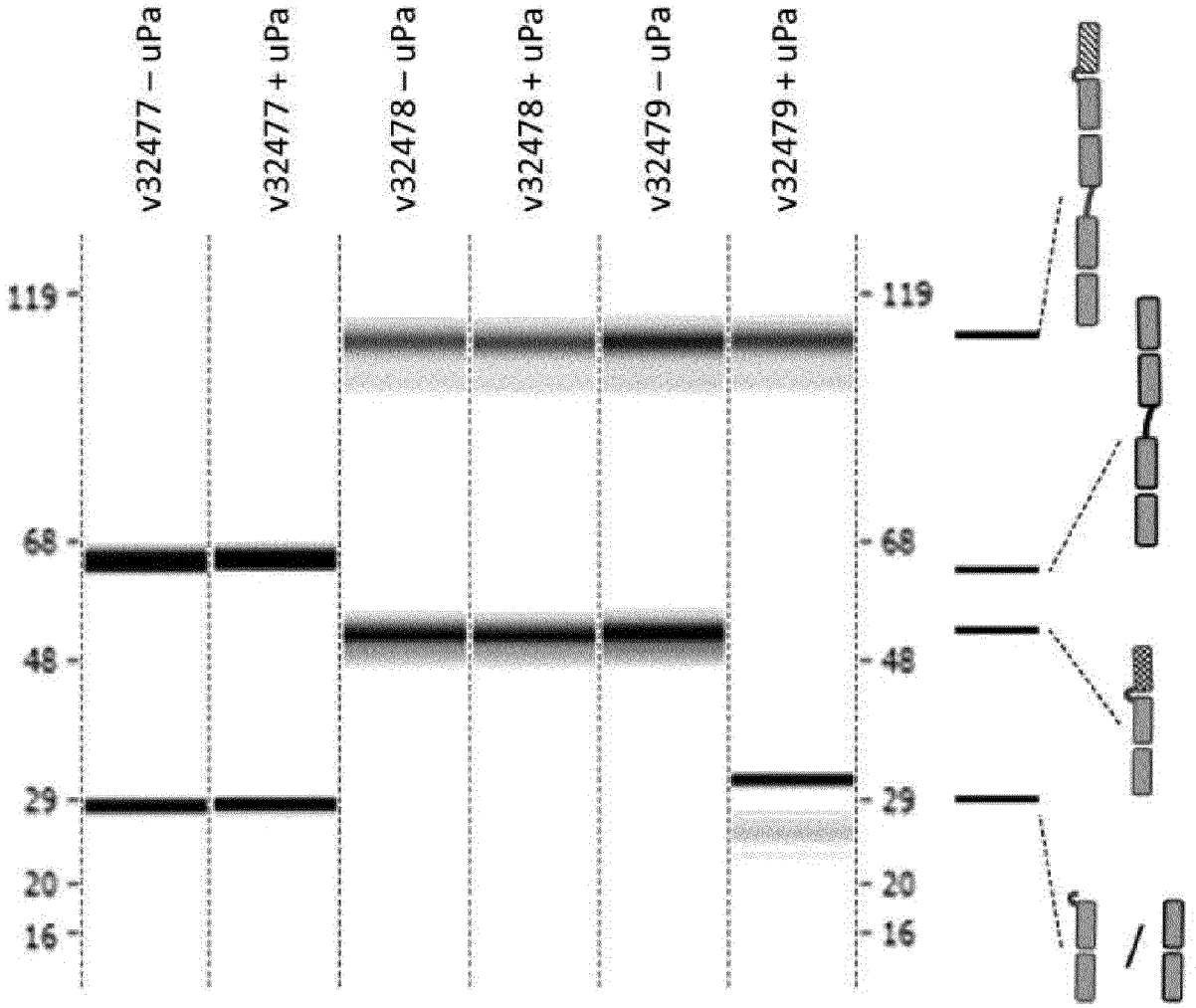



| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,525 | BV E | 0,1574 | 8,53235 | 7,93603e-1 | 8,1330 |
| 2 | 2,845 | VB R | 0,1514 | 96,37745 | 9,65704 | 91,8670 |

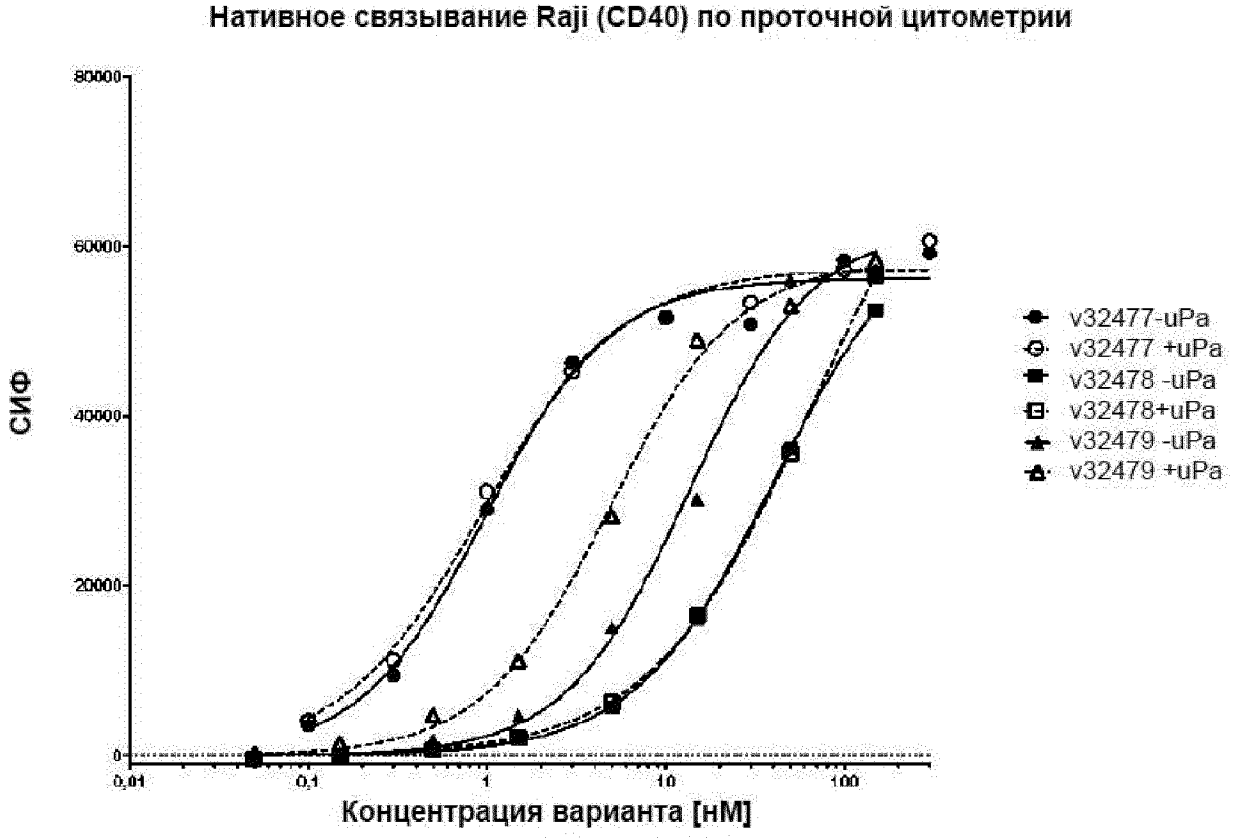
ФИГ. 20D


V32477
V32478
V32479
HB
B
HB
B
HB
B
119
68
48
29
21
16
119
68
48
29
21
16

ФИГ. 20E

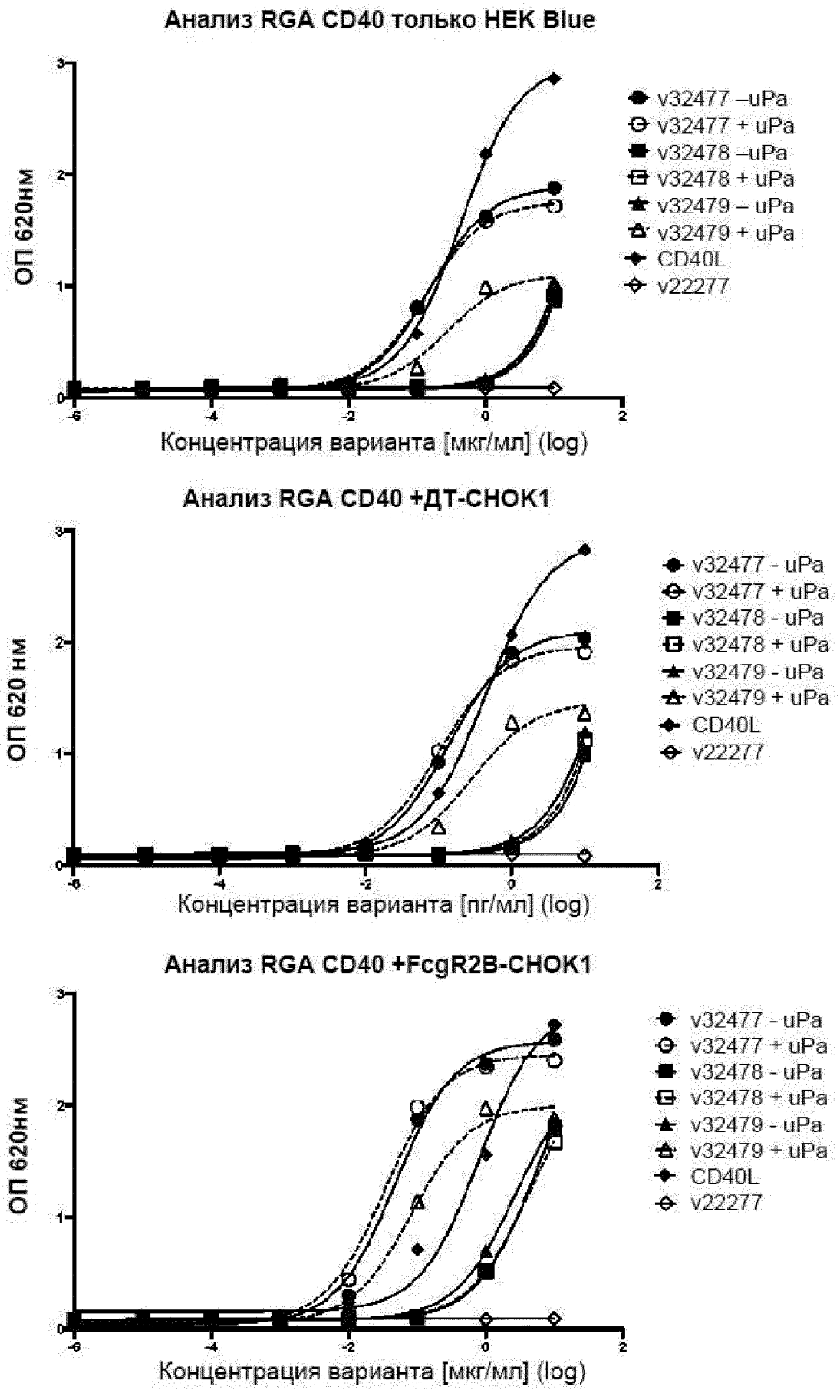

v32477 – uPa
v32477 + uPa
v32478 – uPa
v32478 + uPa
v32479 – uPa
v32479 + uPa
119
68
48
29
20
16

ФИГ. 20F




| Образец | Проточная цитометрия - Raji | |
|---|---|---|
| | EC50 (нМ) | Кратность относительно ДТ |
| V32477 -uPa | 0,98 | 1 |
| v32477 +uPa | 0,94 | 0,96 |
| V32478 -uPa | 41 | 42 |
| V32478 +uPa | 65 | 67 |
| v32479 -uPa | 14 | 14 |
| v32479 +uPa | 4,9 | 5 |

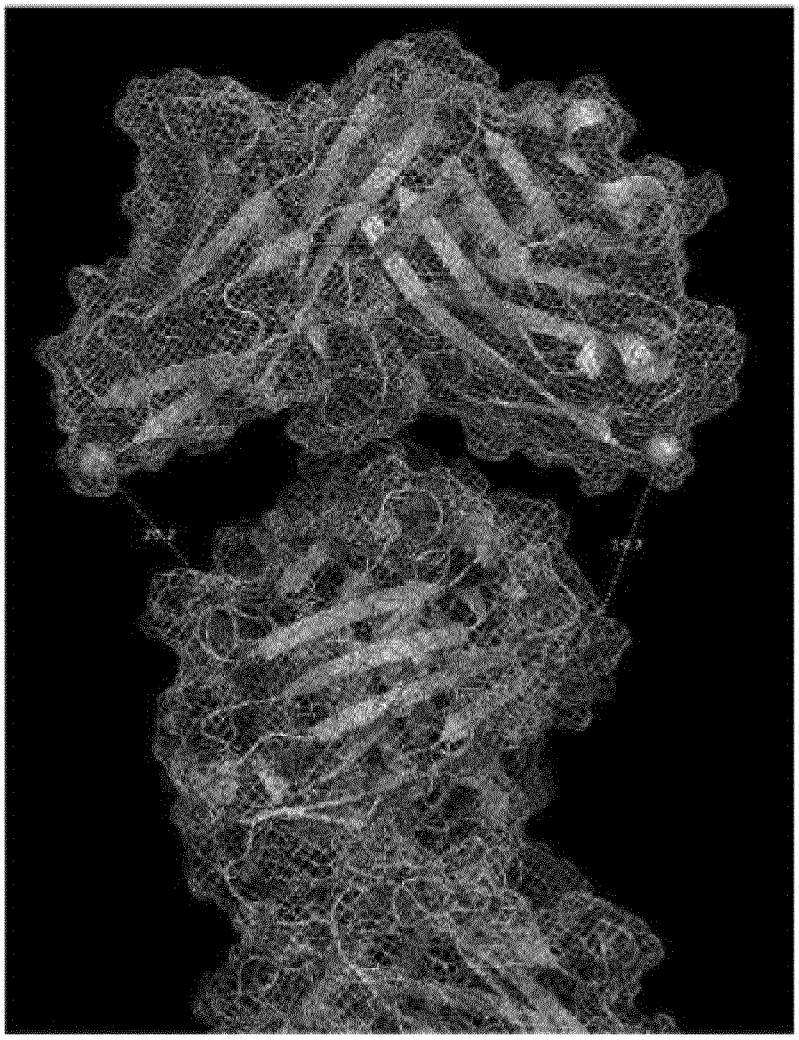
ФИГ. 20G


Анализ RGA CD40 только HEK Blue
ОП 620нм
Концентрация варианта [мкг/мл] (log)
v32477 –uPa
v32477 + uPa
v32478 –uPa
v32478 + uPa
v32479 – uPa
v32479 + uPa
CD40L
v22277
Анализ RGA CD40 +ДТ-CHOK1
ОП 620 нм
Концентрация варианта [пг/мл] (log)
v32477 - uPa
v32477 + uPa
v32478 - uPa
v32478 + uPa
v32479 - uPa
v32479 + uPa
CD40L
v22277
Анализ RGA CD40 +FcgR2B-CHOK1
ОП 620нм
Концентрация варианта [мкг/мл] (log)
v32477 - uPa
v32477 + uPa
v32478 - uPa
v32478 + uPa
v32479 - uPa
v32479 + uPa
CD40L
v22277

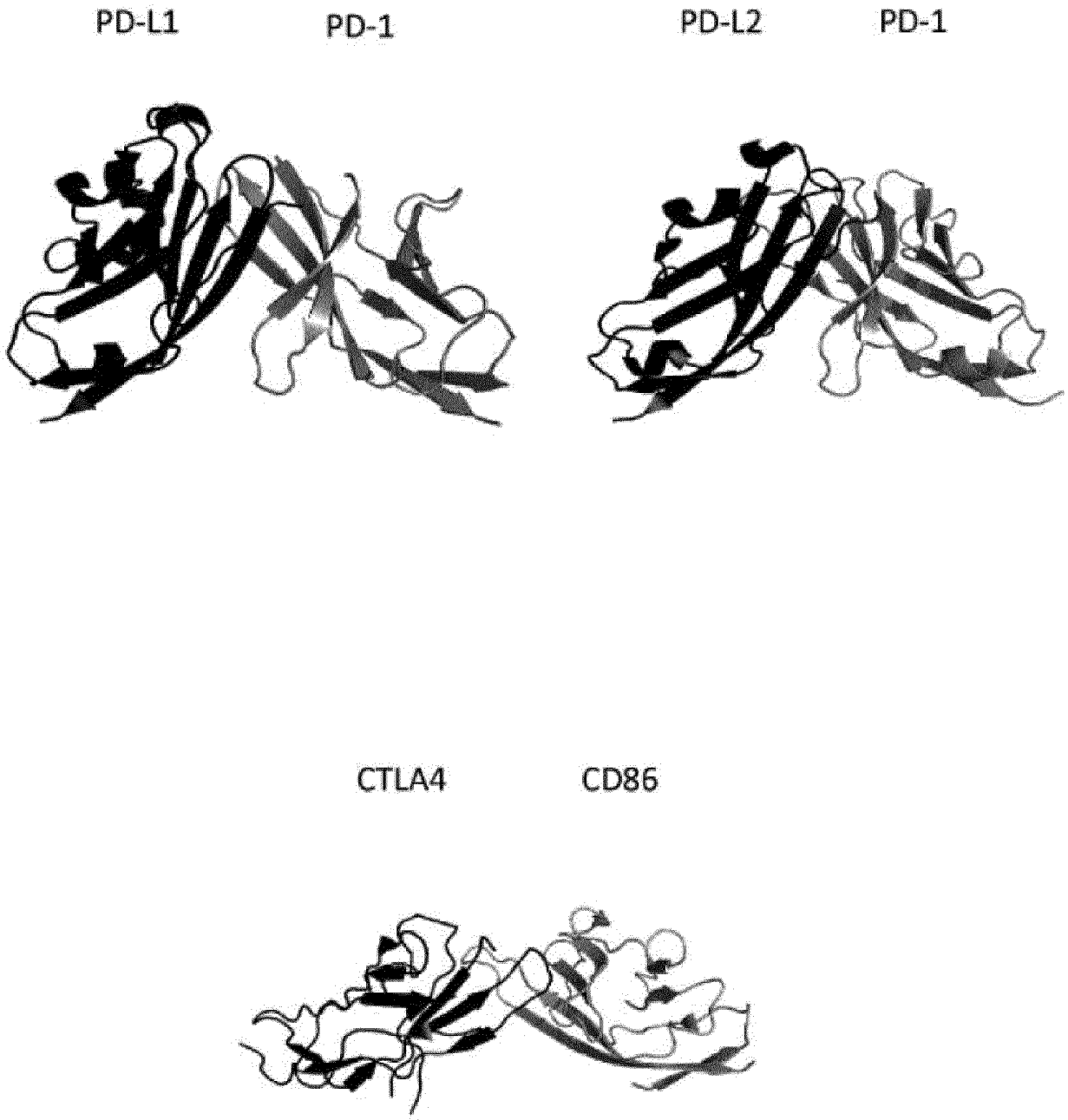
**ФИГ. 20H**

| Образец | RGA CD40 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Только HEK Blue | | ДТ CHOK1 | | FcgRIIB CHOK1 | |
| | EC50 [мкг/мл] | Кратность относительно ДТ | EC50 [мкг/мл] | Кратность относительно ДТ | EC50 [мкг/мл] | Кратность относительно ДТ |
| v32477 - uPa | 0,15 | 1,00 | 0,14 | 1,00 | 0,05 | 1,00 |
| v32477 + uPa | 0,13 | 0,86 | 0,10 | 0,75 | 0,03 | 0,71 |
| v32478 - uPa | н/с | Н/Д | н/с | Н/Д | 5,43 | 111,82 |
| v32478 + uPa | н/с | Н/Д | н/с | Н/Д | 4,28 | 88,16 |
| v32479 - uPa | н/с | Н/Д | 44,73 | 325,78 | 2,64 | 54,32 |
| v32479 + uPa | 0,27 | 1,77 | 0,28 | 2,04 | 0,08 | 1,70 |
| CD40L | 0,43 | 2,76 | 0,44 | 3,19 | 0,81 | 16,58 |
| v22277 | н/с | Н/Д | н/с | Н/Д | н/с | Н/Д |

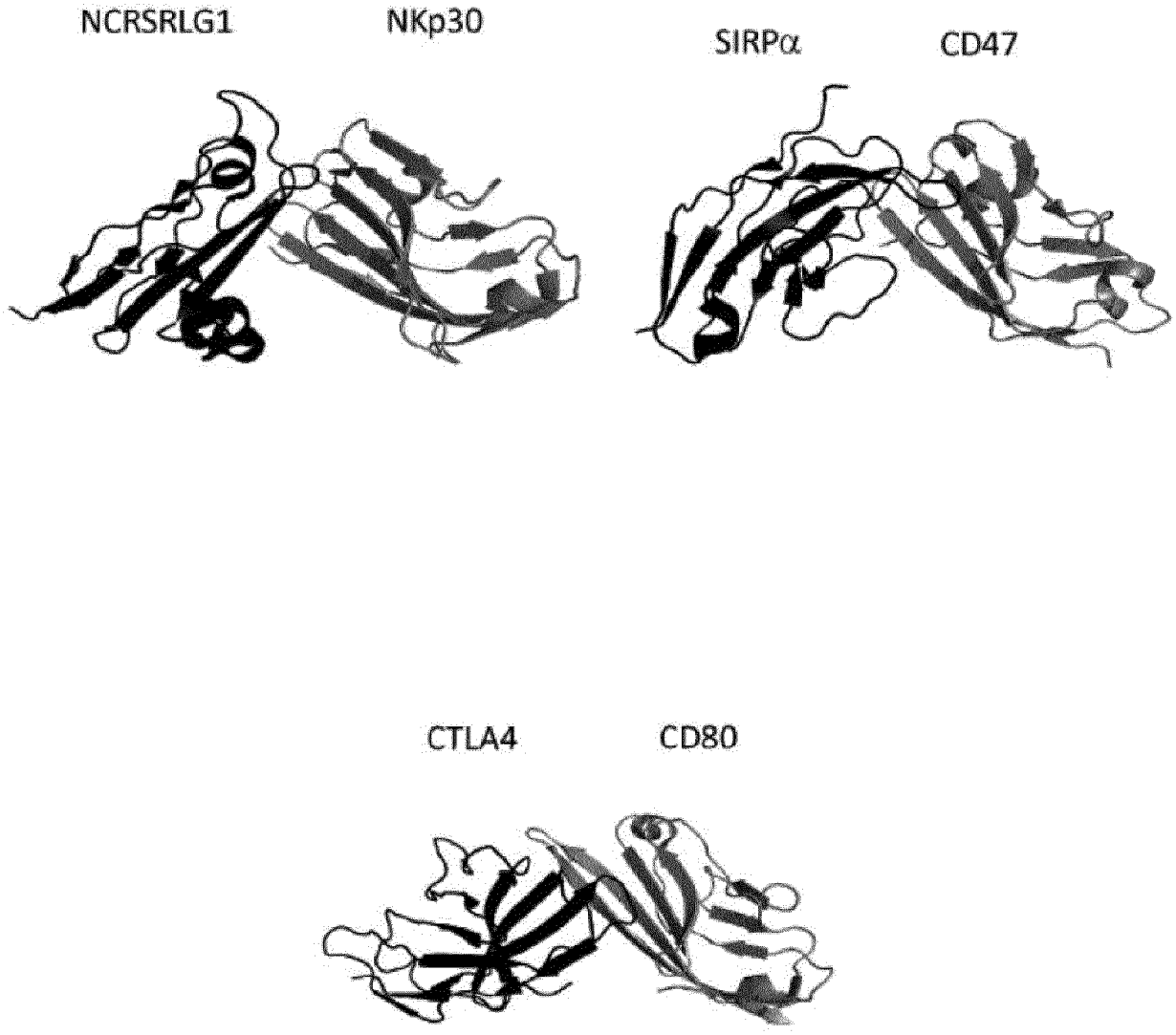
ФИГ. 21A



ФИГ. 21B



ФИГ. 21B (продолжение)

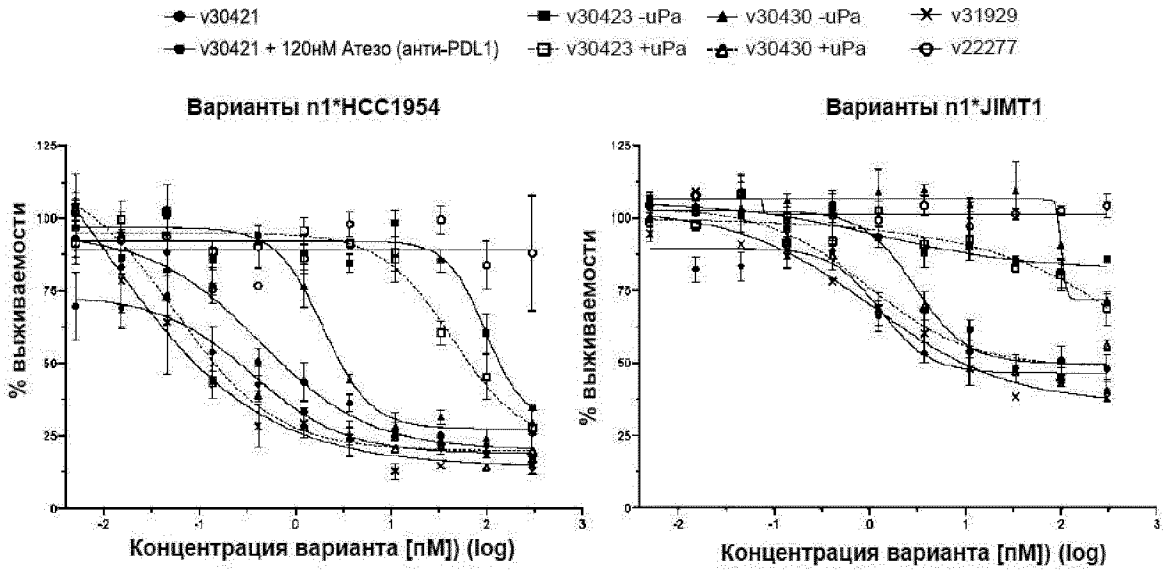


ФИГ. 22




| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| v30421 -uPa | 2,3E-09 | 1,0 |
| v30421 +uPa | 5,3E-09 | 2,3 |
| v30423 -uPa | > 1E-07 | >43 |
| v30423 +uPa | > 1E-07 | >43 |
| v30430 -uPa | > 1E-07 | >43 |
| v30430 +uPa | 6,7E-08 | 29 |
| v31929 | 3,2E-08 | 14 |
| v18560 | 3,3E-09 | 1,4 |
| v22277 | Н.С. | н.о. |

ФИГ. 23А



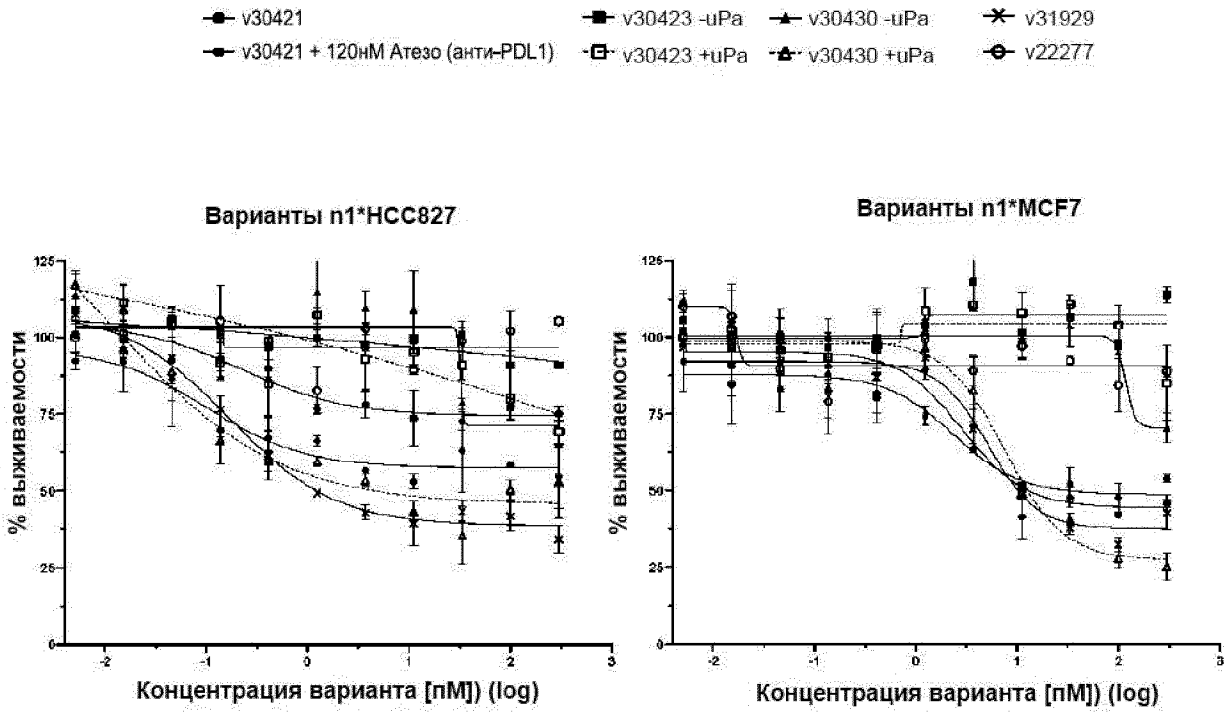

| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| v30421 | 4,3E-13 | 1,0 |
| v30421 + 120 нМ Атезо (анти-PD-L1) | 3,6E-13 | 0,84 |
| v30423 -uPa | 9,7E-11 | 230 |
| v30423 +uPa | 4,4E-11 | 100 |
| v30430 -uPa | 2,0E-12 | 4,6 |
| v30430 +uPa | 5,5E-14 | 0,13 |
| v31929 | 8,3E-15 | 0,019 |
| v22277 | > 2,0E-10* | >470* |

*плохая аппроксимация

| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| v30421 | 3,0E-12 | 1,0 |
| v30421 + 120 нМ Atezo (анти-PD-L1) | 1,3E-12 | 0,44 |
| v30423 -uPa | > 1,0E-10* | > 350* |
| v30423 +uPa | > 1,0E-10* | > 350* |
| v30430 -uPa | > 1,0E-10* | > 350* |
| v30430 +uPa | 9,8E-13 | 0,33 |
| v31929 | 1,1E-12 | 0,36 |
| v22277 | > 2,0E-10* | >470* |

*плохая аппроксимация

## ФИГ. 23А (продолжение)



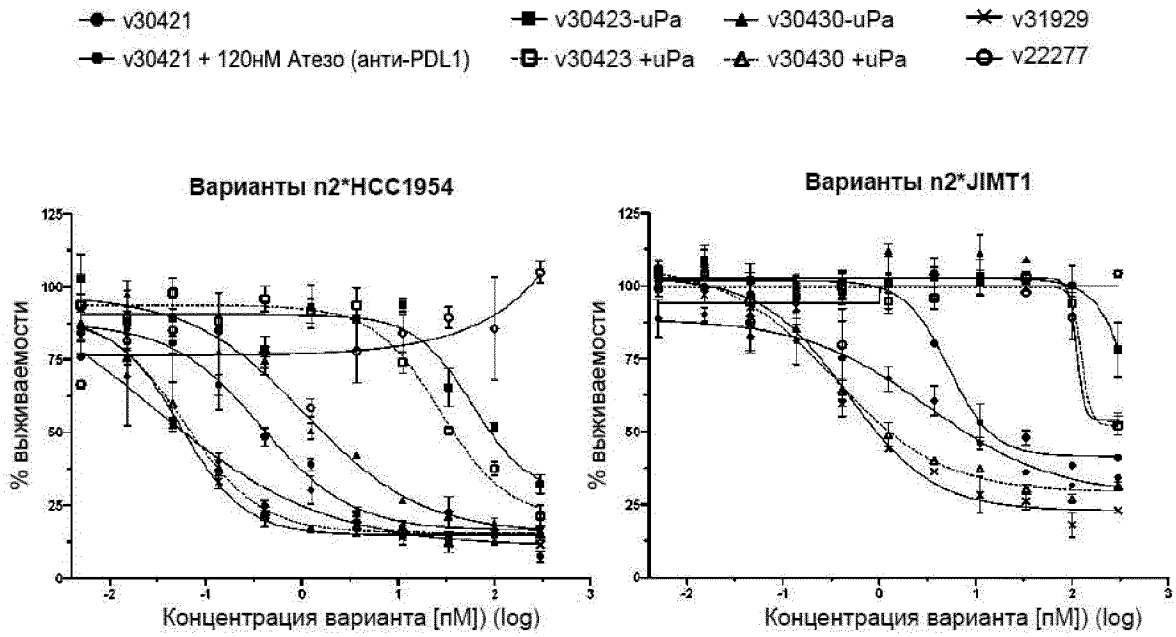

| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| v30421 | 2,3E-13 | 1,0 |
| v30421 + 120 нМ Атезо (анти-PD-L1) | 1,0E-13 | 0,45 |
| v30423 -uPa | > 2,0E-10* | >470* |
| v30423 +uPa | > 1,0E-10* | > 350* |
| v30430 -uPa | > 1,0E-10* | > 350* |
| v30430 +uPa | 1,4E-14 | 0,061 |
| v31929 | 1,7E-13 | 0,74 |
| v22277 | > 2,0E-10* | >470* |

*плохая аппроксимация

| Образец | EC50(M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| v30421 | 2,9E-12 | 1,0 |
| v30421 + 120 нМ Атезо (анти-PD-L1) | 2,4E-12 | 0,82 |
| v30423 -uPa | > 2,0E-10* | >470* |
| v30423 +uPa | > 1,0E-10* | > 350* |
| v30430 -uPa | > 1,0E-10* | > 350* |
| v30430 +uPa | 7,6E-12 | 2,6 |
| v31929 | 5,2E-12 | 1,8 |
| v22277 | > 2,0E-10* | >470* |

*плохая аппроксимация

## ФИГ. 23B



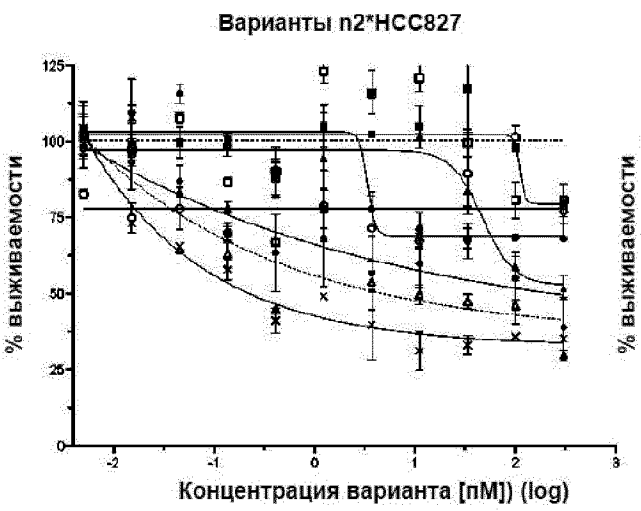

| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| v30421 | 3,8E-13 | 1,0 |
| v30421 + 120 нМ Атезо (анти-PD-L1) | 2,9E-14 | 0,076 |
| v30423 -uPa | 5,9E-11 | 150 |
| v30423 +uPa | 2,8E-11 | 72 |
| v30430 -uPa | 1,1E-12 | 2,9 |
| v30430 +uPa | 6,0E-14 | 0,16 |
| v31929 | 5,5E-14 | 0,15 |
| v22277 | > 2,0E-10* | >470* |

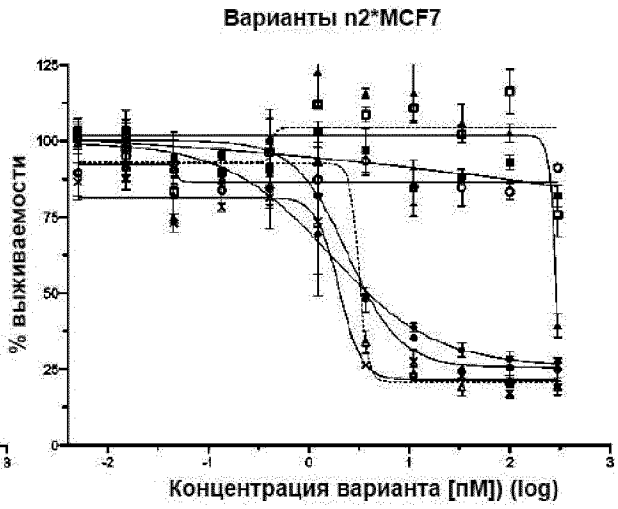
*плохая аппроксимация

| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| v30421 | 5,3E-12 | 1,0 |
| v30421 + 120 нМ Атезо (анти-PD-L1) | 3,2E-12 | 0,61 |
| v30423 -uPa | > 1,0E-10* | >350* |
| v30423 +uPa | > 1,0E-10* | >350* |
| v30430 -uPa | > 1,0E-10* | >350* |
| v30430 +uPa | 3,5E-13 | 0,066 |
| v31929 | 4,7E-13 | 0,088 |
| v22277 | > 2,0E-10* | >470* |

*плохая аппроксимация

## ФИГ. 23B (продолжение)



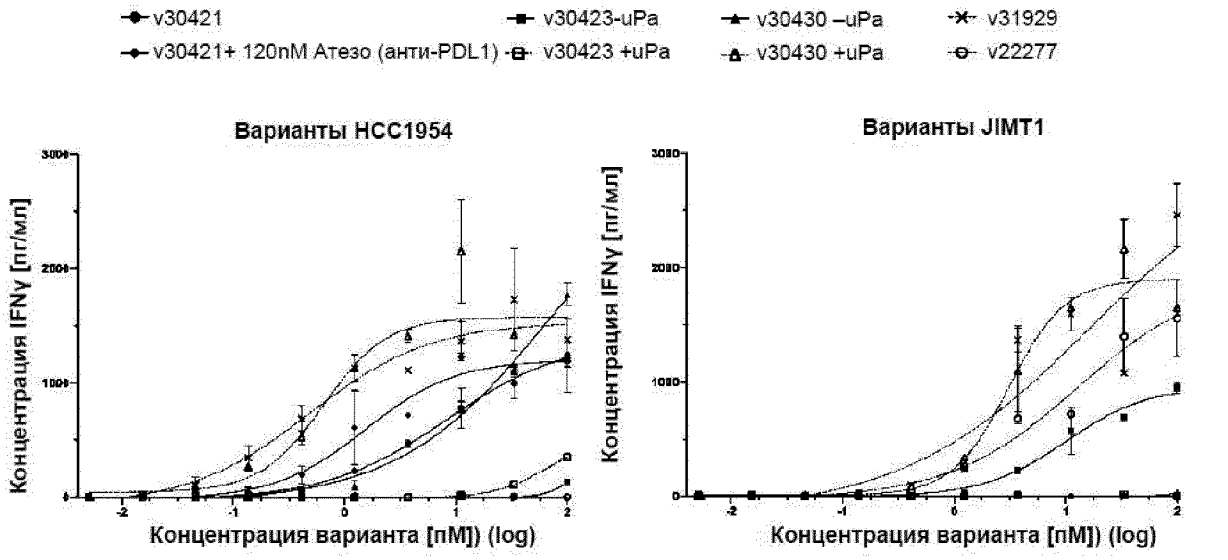




Не рассчитан из-за плохой аппроксимация для всех

| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| v30421 | 2,4E-12 | 1,0 |
| v30421 + 120 нМ Атезо (анти-PD-L1) | 1,6E-12 | 0,67 |
| v30423 -uPa | > 2,0E-10* | >470* |
| v30423 +uPa | > 2,0E-10* | >470* |
| v30430 -uPa | > 1,0E-10* | > 350* |
| v30430 +uPa | 3,2E-12* | 1,3* |
| v31929 | 2,0E-12 | 0,82 |
| v22277 | > 2,0E-10* | >470* |

*плохая аппроксимация

ФИГ. 24



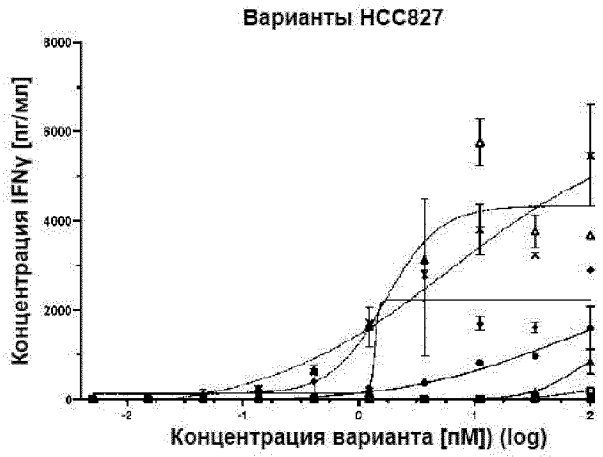

| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| v30421 | 8,4E-12 | 1,0 |
| v30421 + 120 нМ Атезо (анти-PD-L1) | 1,5E-12 | 0,19 |
| v30423 -uPa | >4,7E-11* | > 30* |
| v30423 +uPa | > 4,7E-11* | > 30* |
| v30430 -uPa | 6,9E-11 | 8,2 |
| v30430 +uPa | 6,5E-13 | 0,078 |
| v31929 | 4,8E-13 | 0,058 |
| v22277 | > 1,0E-10* | >350* |

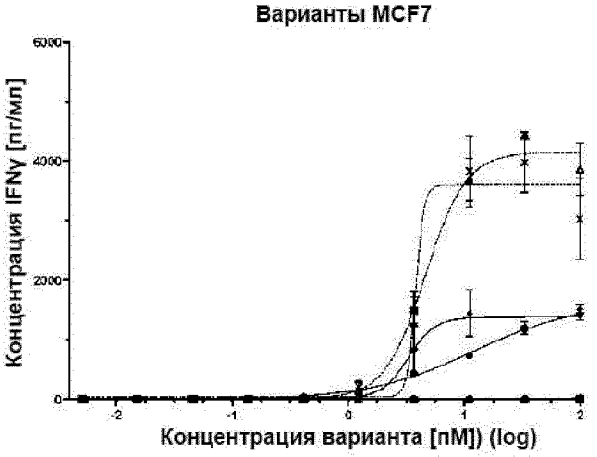
*плохая аппроксимация

| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| v30421 | 1,0E-11 | 1,0 |
| v30421 + 120 нМ Атезо (анти-PD-L1) | 1,3E-11 | 1,3 |
| v30423 -uPa | > 1,0E-10* | >350* |
| v30423 +uPa | > 1,0E-10* | >350* |
| v30430 -uPa | > 1,0E-10* | >350* |
| v30430 +uPa | 3,1E-12 | 0,31 |
| v31929 | 1,6E-11 | 1,6 |
| v22277 | > 1,0E-10* | >350* |

*плохая аппроксимация

**ФИГ. 24 (продолжение)**




| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| v30421 | 5,4E-11 | 1 |
| v30421 + 120 нМ Атезо (анти-PD-L1) | > 1,2E-12* | >0,022* |
| v30423 -uPa | > 1,0E-10* | > 350* |
| v30423 +uPa | > 1,0E-10* | > 350* |
| v30430 -uPa | >4,7E-11* | > 30* |
| v30430 +uPa | 1,7E-12 | 0,031 |
| v31929 | 6,2E-12 | 0,115 |
| v22277 | > 1,0E-10* | > 350* |

*плохая аппроксимация

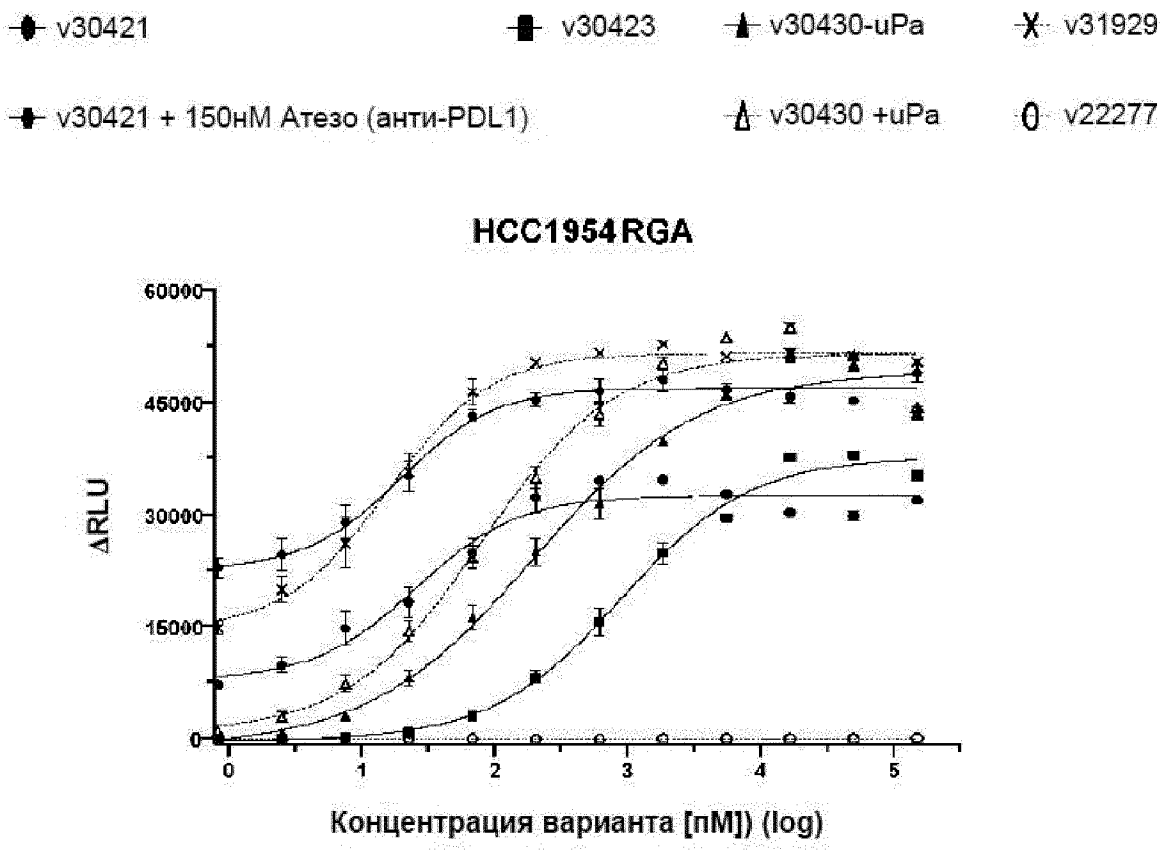
| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| v30421 | 1,2E-11 | 1,0 |
| v30421 + 120 нМ Атезо (анти-PD-L1) | 3,3E-12 | 0,28 |
| v30423 -uPa | > 1,0E-10 | > 350* |
| v30423 +uPa | > 1,0E-10 | > 350* |
| v30430 -uPa | > 1,0E-10 | > 350* |
| v30430 +uPa | 4,6E-12 | 0,39 |
| v31929 | > 1,2E-12* | >1,2* |
| v22277 | > 1,0E-10 | > 350* |

*плохая аппроксимация

**ФИГ. 25**

| Клеточная линия | Количество рецепторов | |
|---|---|---|
| | Her2 | PD-L1 |
| HCC1954 | 4,5E+05 | 4,2E+05 |
| JIMT-1 | 7,7E+05 | 2,5E+05 |
| HCC827 | 6,6E+04 | 1,4E+05 |
| MCF-7 | 1,2E+05 | 3,0E+03 |

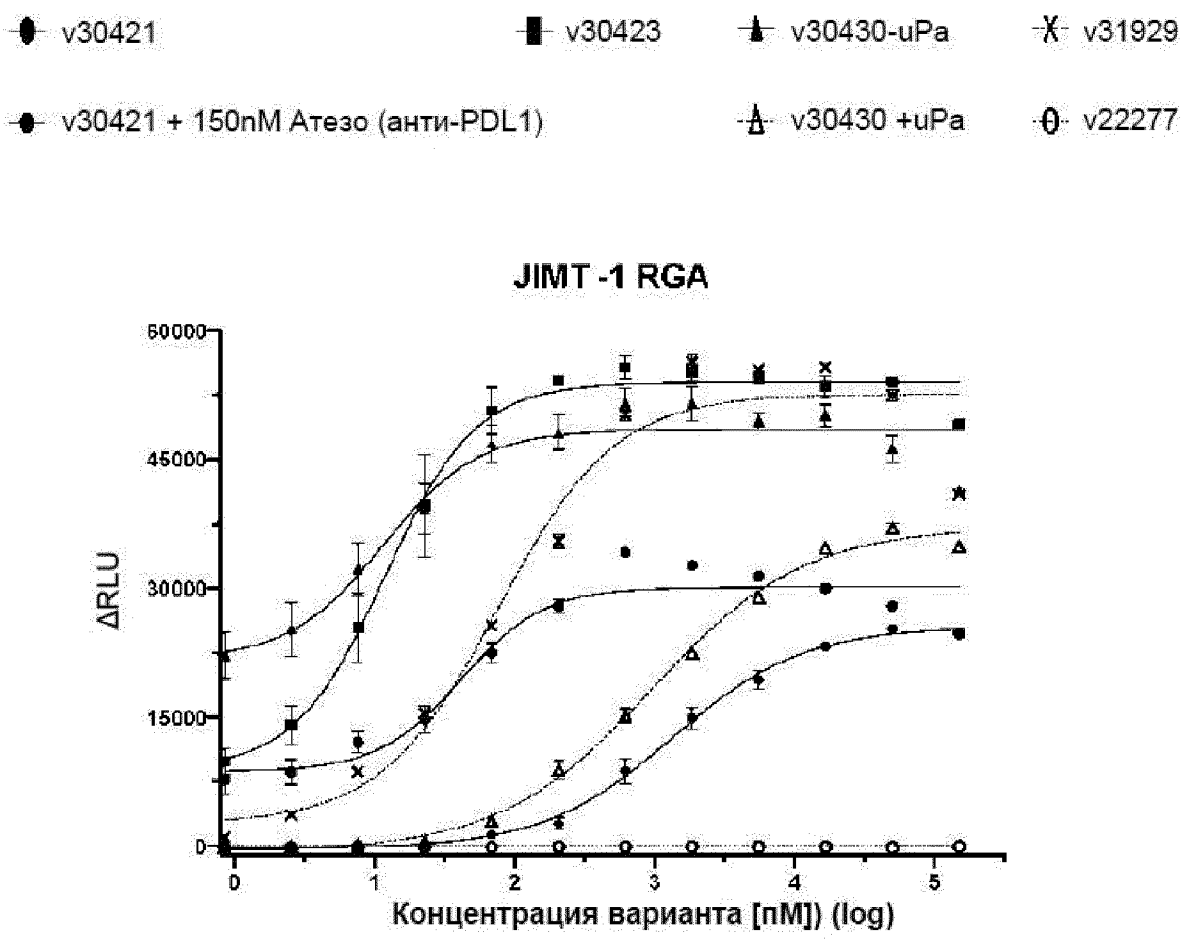
**ФИГ. 26А**




| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ | макс. ΔRLU | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|---|---|
| v30421 | 4,7E-11 | 1,0 | 3,2E+04 | 1,0 |
| v30421 + 150 нМ Атезо (анти-PD-L1) | 2,0E-11 | 0,42 | 4,7E+04 | 1,4 |
| v30423 | 1,0E-09 | 21 | 3,8E+04 | 1,2 |
| v30430 -uPa | 1,9E-10 | 4,1 | 4,9E+04 | 1,5 |
| v30430 +uPa | 7,9E-11 | 1,7 | 5,1E+04 | 1,6 |
| v31929 | 1,6E-11 | 0,33 | 5,2E+04 | 1,6 |
| v22277 | > 1,5E-07* | > 3100* | Н/О* | Н/О* |

*плохая аппроксимация

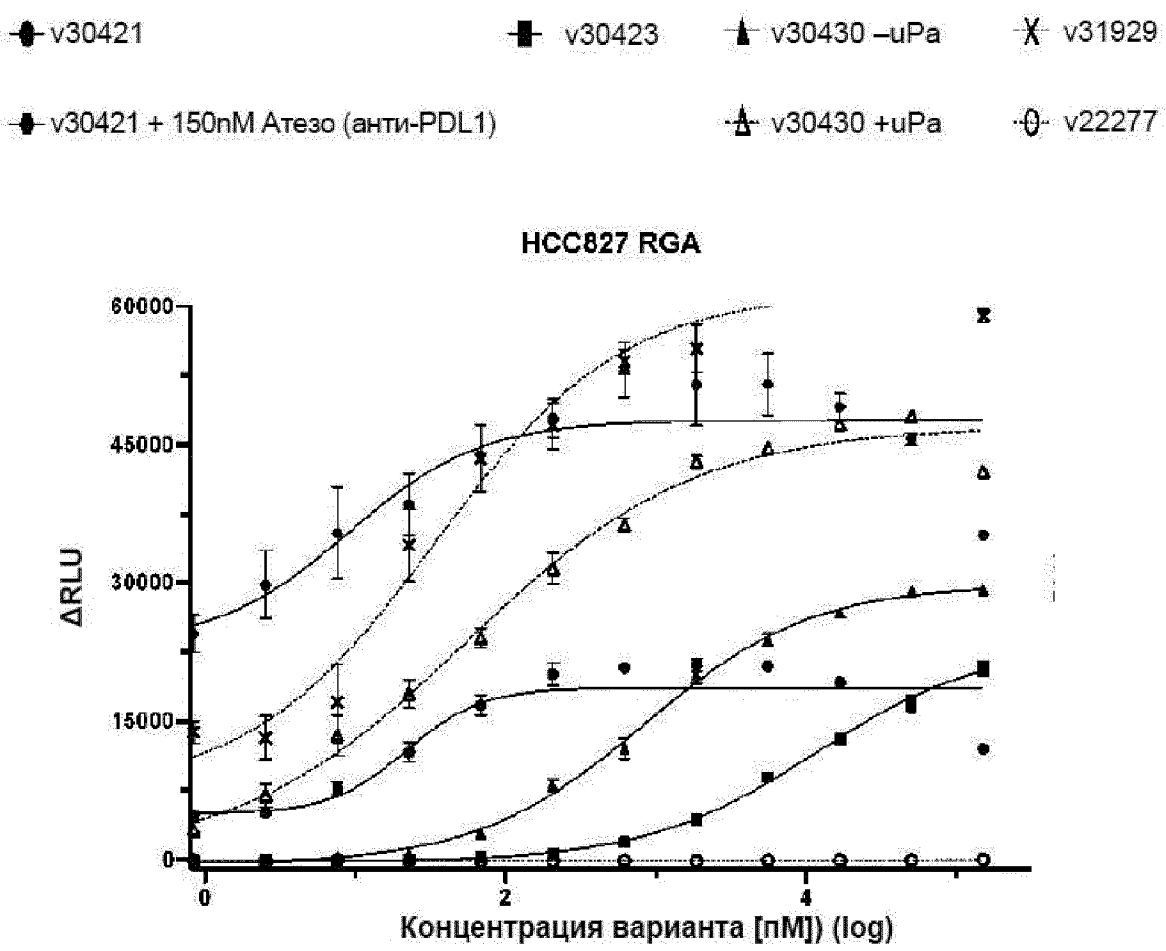
**ФИГ. 26B**




| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ | макс. ΔRLU | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|---|---|
| v30421 | 4,1E-11 | 1,0 | 3,0E+04 | 1,0 |
| v30421 + 150 нМ Атезо (анти-PD-L1) | 1,2E-11 | 0,28 | 4,8E+04 | 1,6 |
| v30423 | 1,3E-09 | 32 | 2,6E+04 | 0,8 |
| v30430 -uPa | 9,6E-10 | 23 | 3,7E+04 | 1,2 |
| v30430 +uPa | 7,6E-11 | 1,8 | 5,3E+04 | 1,7 |
| v31929 | 1,2E-11 | 0,29 | 5,4E+04 | 1,8 |
| v22277 | > 1,5E-07* | >3100* | Н/О* | Н/О* |

*плохая аппроксимация

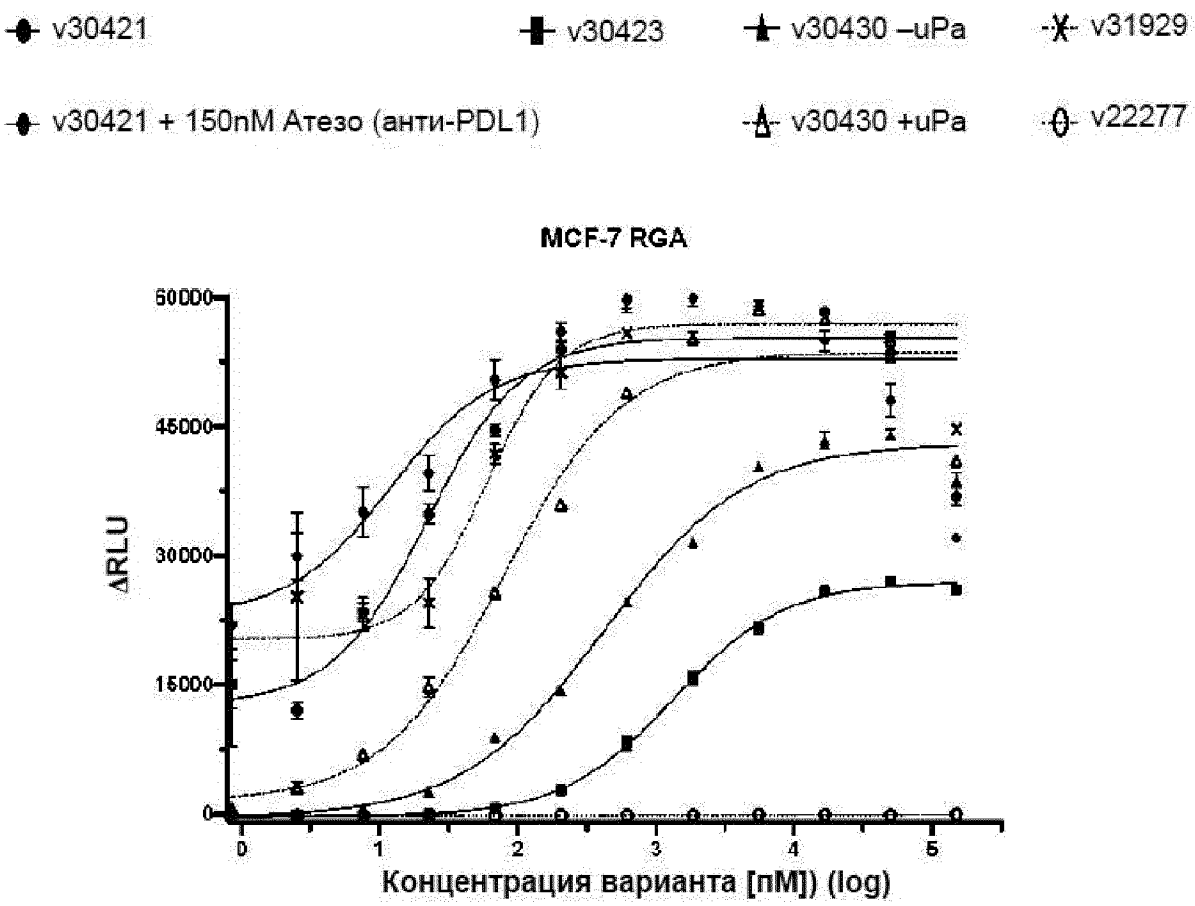
ФИГ. 26C




| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ | макс. ΔRLU | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|---|---|
| v30421 | 2,2E-11 | 1,0 | 1,9E+04 | 1,0 |
| v30421 + 150 нМ Атезо (анти-PD-L1) | 9,1E-12 | 0,41 | 4,8E+04 | 2,6 |
| v30423 | 1,2E-08 | 530 | 2,3E+04 | 1,3 |
| v30430 -uPa | 8,3E-10 | 38 | 3,0E+04 | 1,6 |
| v30430 +uPa | 5,5E-11 | 2,5 | 4,7E+04 | 2,5 |
| v31929 | 3,4E-11 | 1,6 | 6,1E+04 | 3,3 |
| v22277 | > 1,5E-07* | > 3100* | Н/О* | Н/О* |

*плохая аппроксимация

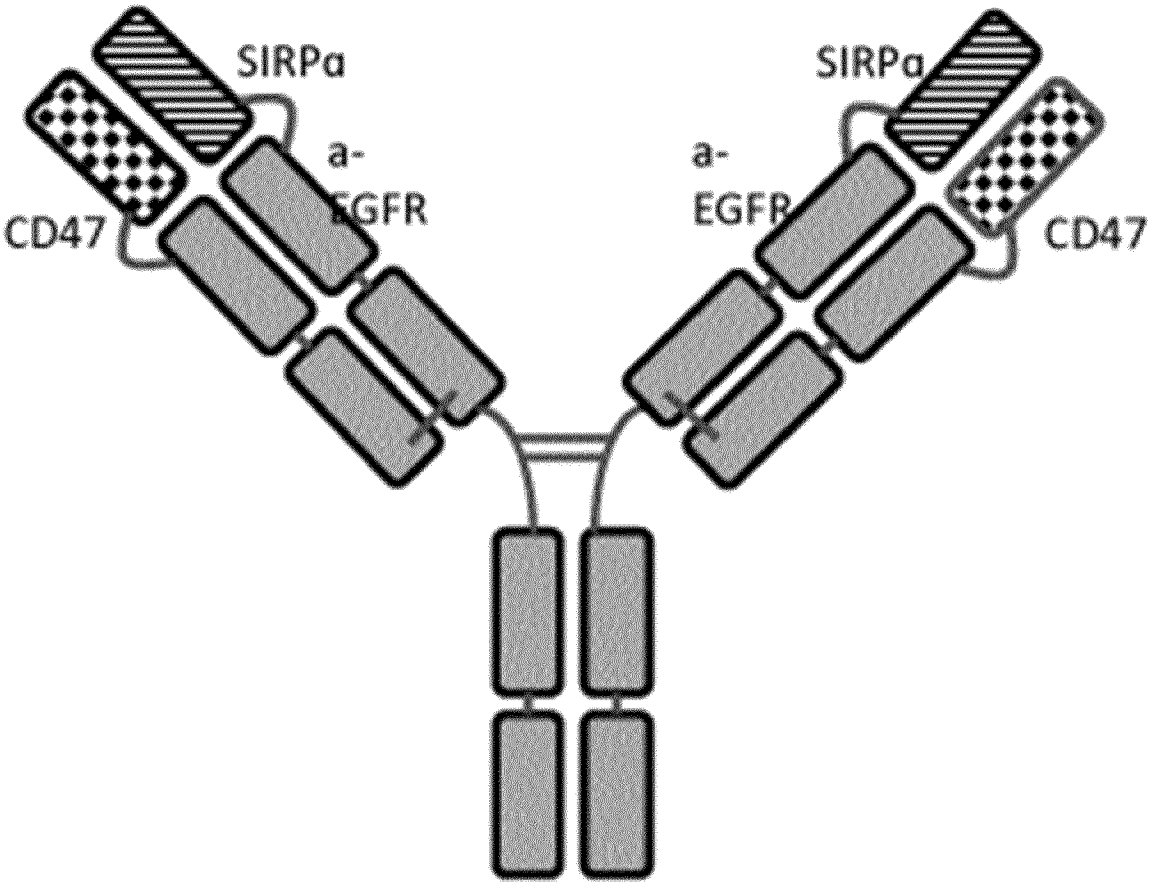
**ФИГ. 26D**



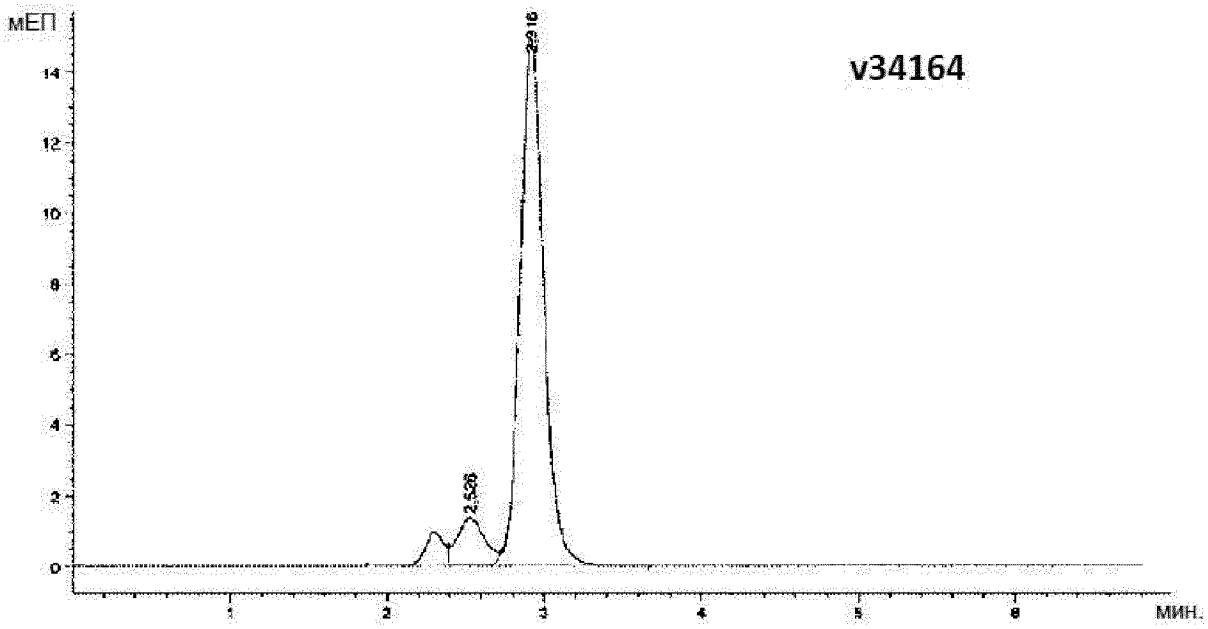

| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ | макс. ΔRLU | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|---|---|
| v30421 | 2,2E-11 | 1,0 | 5,5E+04 | 1,0 |
| v30421 + 150 нМ Атезо (анти-PD-L1) | 1,2E-11 | 0,56 | 5,3E+04 | 1,0 |
| v30423 | 1,3E-09 | 61 | 2,7E+04 | 0,5 |
| v30430 -uPa | 4,2E-10 | 19 | 4,3E+04 | 0,8 |
| v30430 +uPa | 7,9E-11 | 3,6 | 5,4E+04 | 1,0 |
| v31929 | 6,0E-11 | 2,7 | 5,7E+04 | 1,0 |
| v22277 | > 1,5E-07* | >3100* | Н/О* | Н/О* |

*плохая аппроксимация

ФИГ. 27

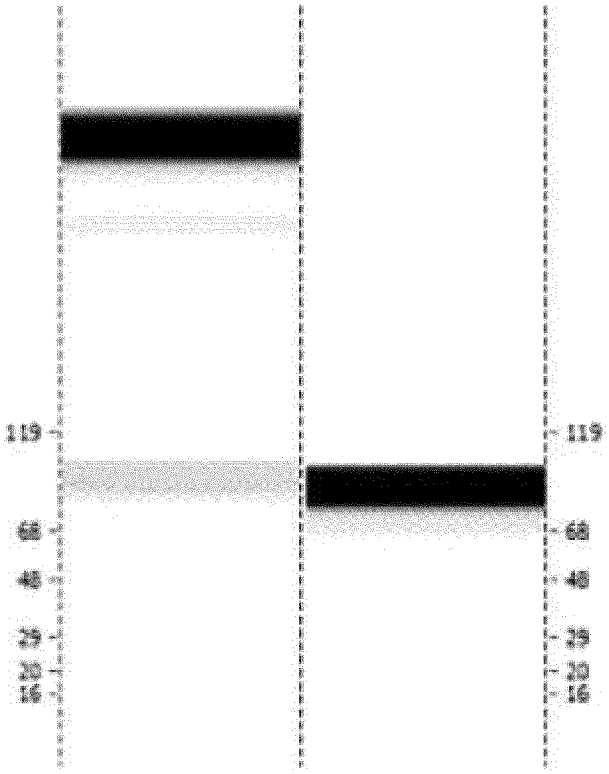


**ФИГ. 28А**

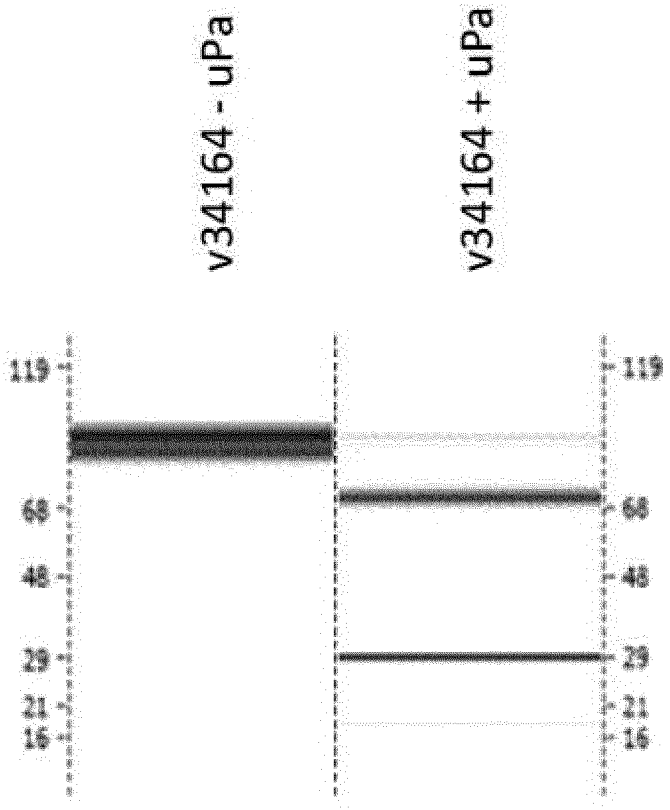



| Пик # | Время удерживания [мин.] | Тип | Ширина [мин.] | Площадь [мЕП*с] | Высота [мЕП] | Площадь % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,526 | VV E | 0,1847 | 16,50955 | 1,35014 | 9,1062 |
| 2 | 2,918 | VB R | 0,1666 | 164,79117 | 14,95313 | 90,8938 |

ФИГ. 28B

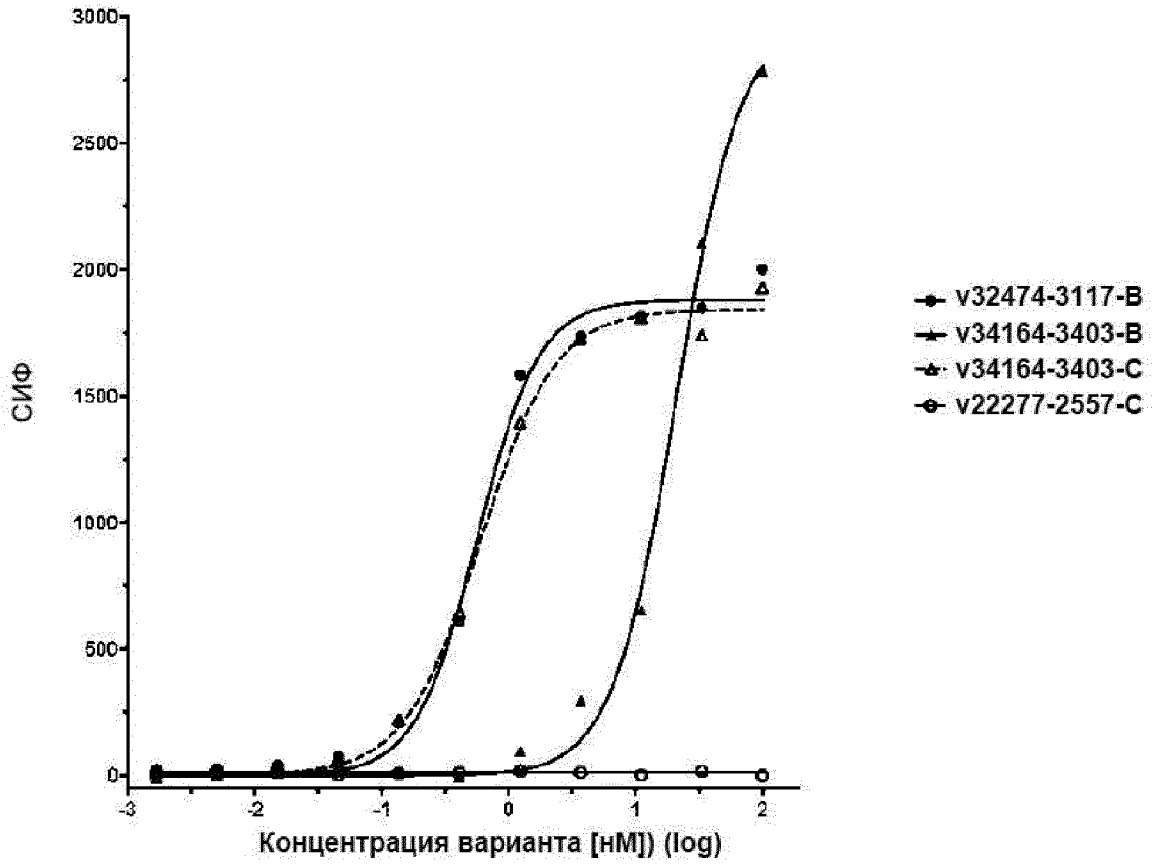



ФИГ. 28C



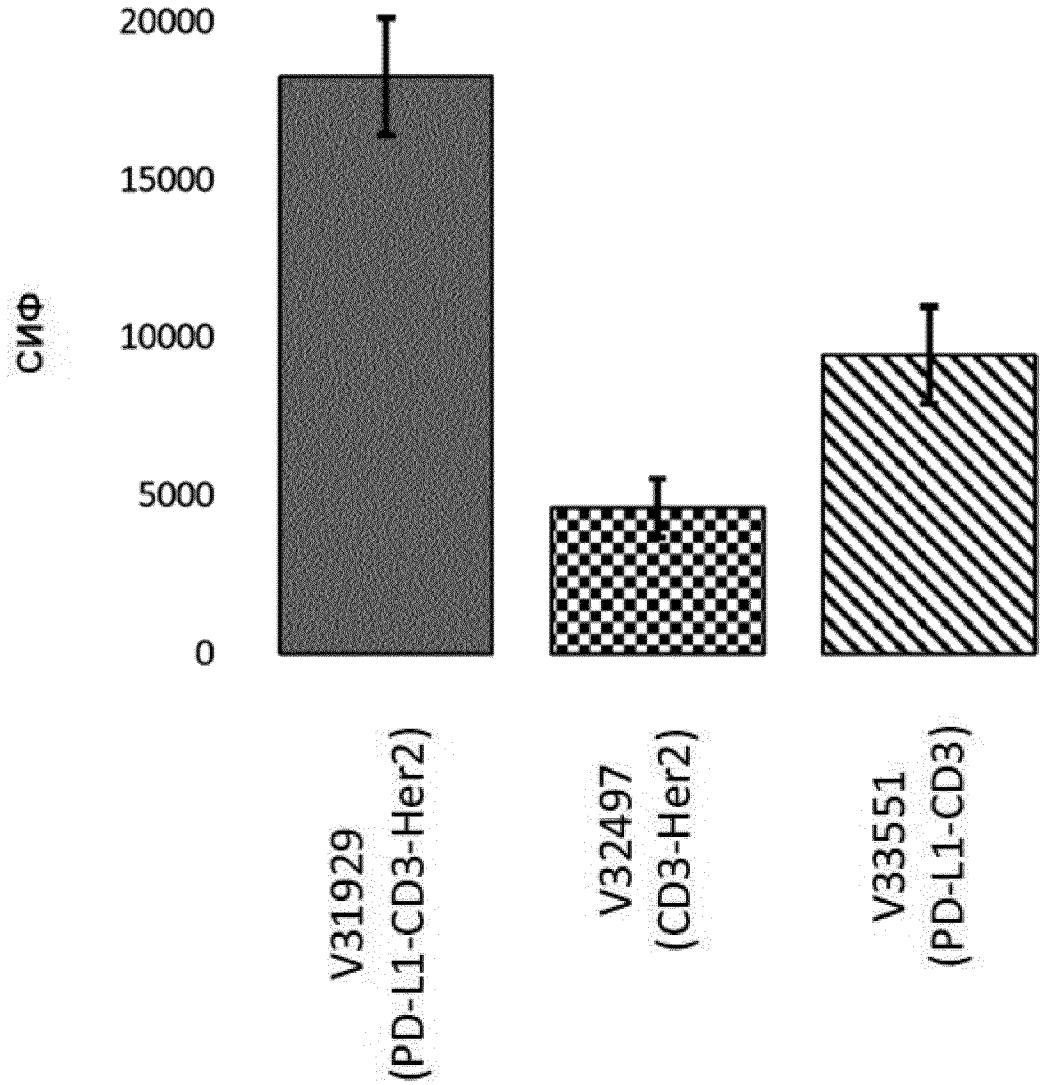
ФИГ. 29

Нативное связывание с клетками H292 (EGFR) по многопараметрическому анализу

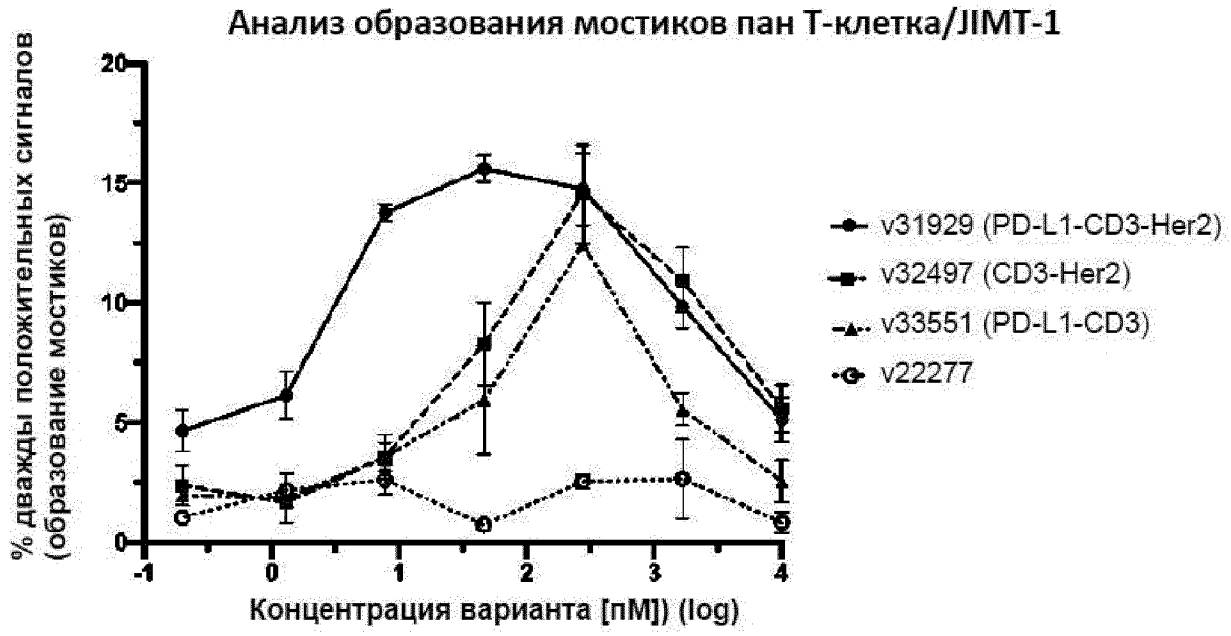



| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| v32474 | 5,7E-10 | 1,0 |
| v34164 -uPa | 2,1E-08 | 37 |
| v34164 +uPa | 6,0E-10 | 1,1 |
| v22277 | Н.С. | н.о. |

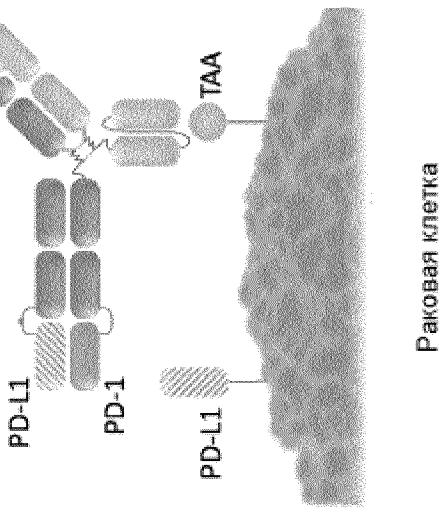
ФИГ. 30А


20000
15000
10000
5000
0
СИФ
V31929
(PD-L1-CD3-Her2)
V32497
(CD3-Her2)
V33551
(PD-L1-CD3)

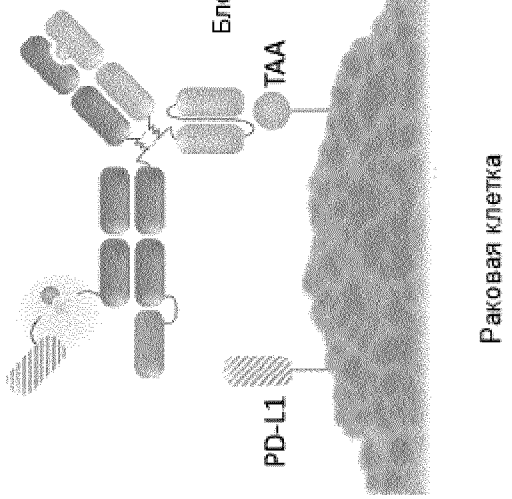
ФИГ. 30B


Анализ образования мостиков пан Т-клетка/JIMT-1
% дважды положительных сигналов (образование мостиков)
20
15
10
5
0
-1
0
1
2
3
4
Концентрация варианта [пМ]) (log)
v31929 (PD-L1-CD3-Her2)
v32497 (CD3-Her2)
v33551 (PD-L1-CD3)
v22277

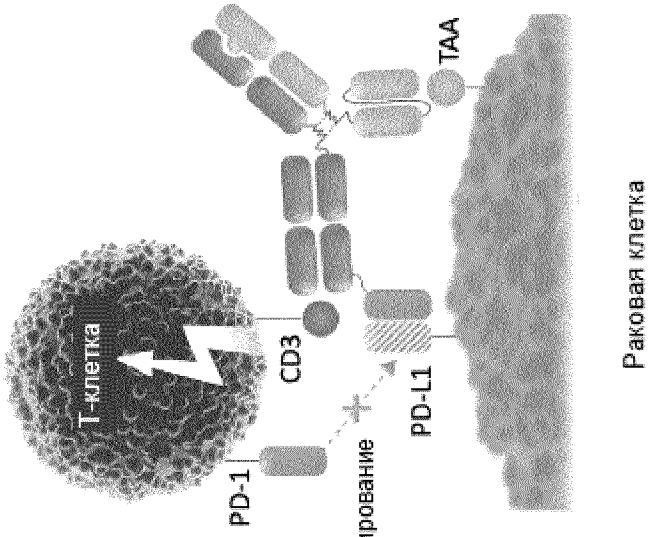
ФИГ. 31A



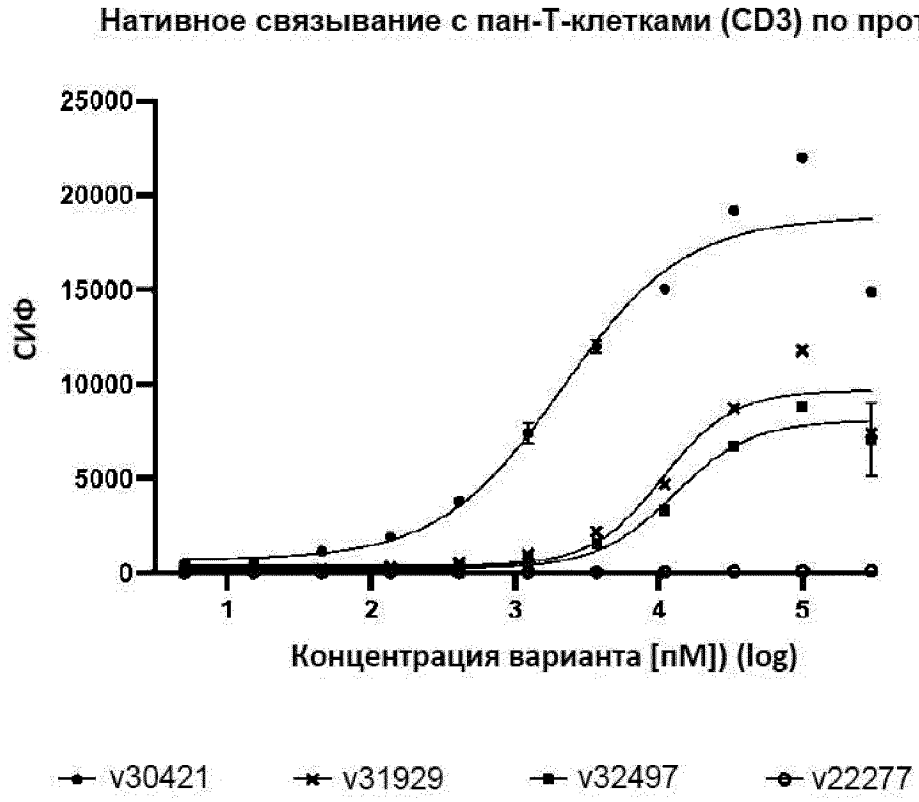

ФИГ. 31B




ФИГ. 31C

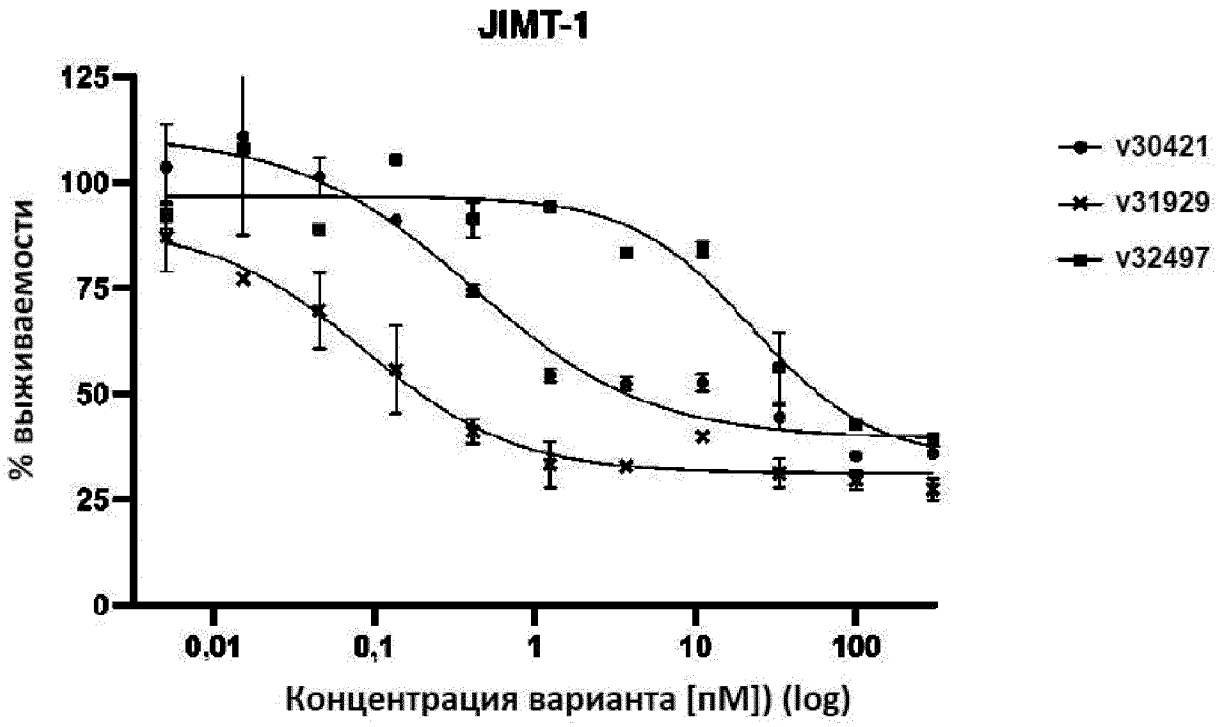


ФИГ. 32



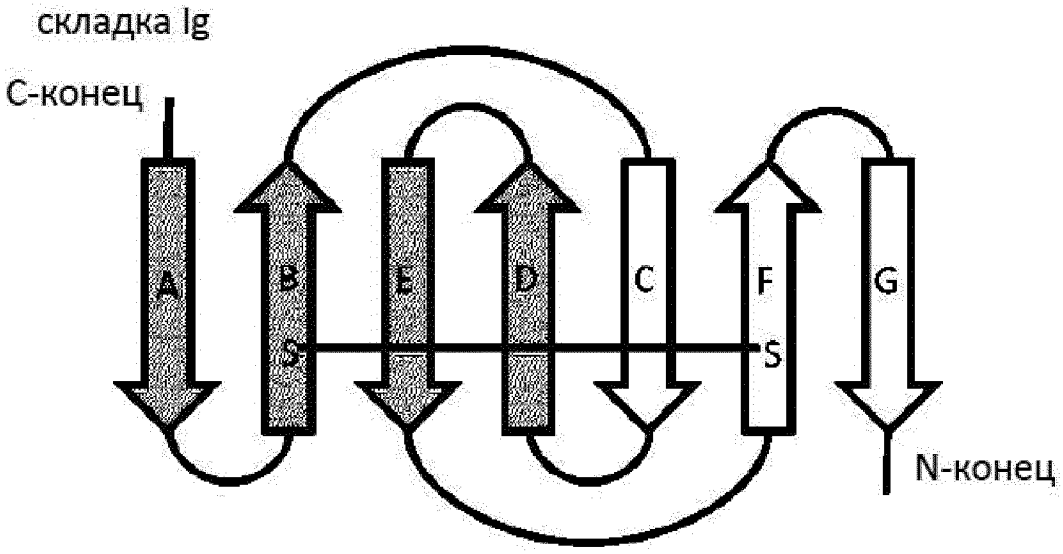

| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| v30421 | 2,1E-09 | 1,0 |
| v31929 | 1,1E-08 | 5,0 |
| v32497 | 1,3E-08 | 6,0 |
| V22277 | Н.С. | н.о. |

ФИГ. 33

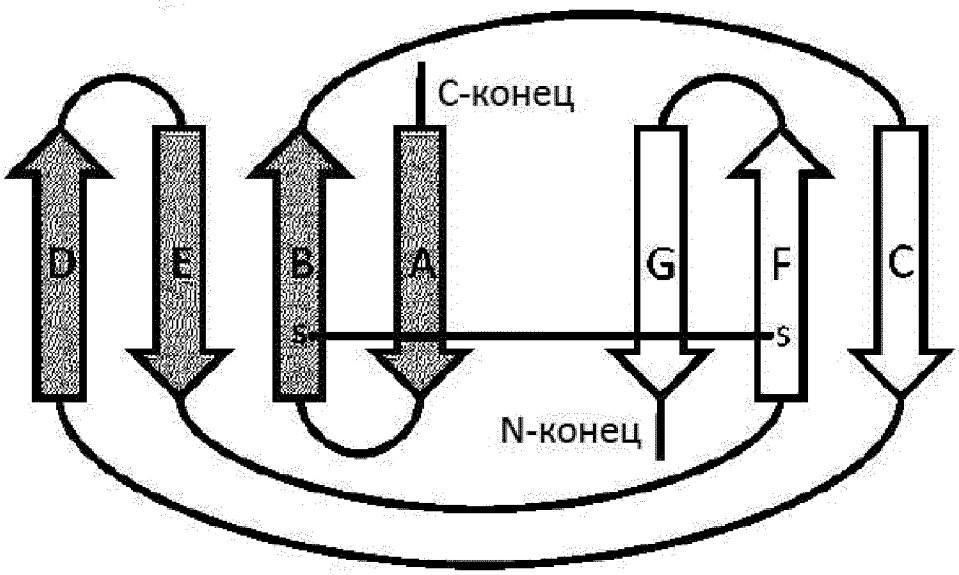



| Образец | EC50 (M) | Кратность относительно ДТ |
|---|---|---|
| V30421 | 4,1E-13 | 1,0 |
| V32497 | 2,2E-11 | 55 |
| V31929 | 8,6E-14 | 0,2 |

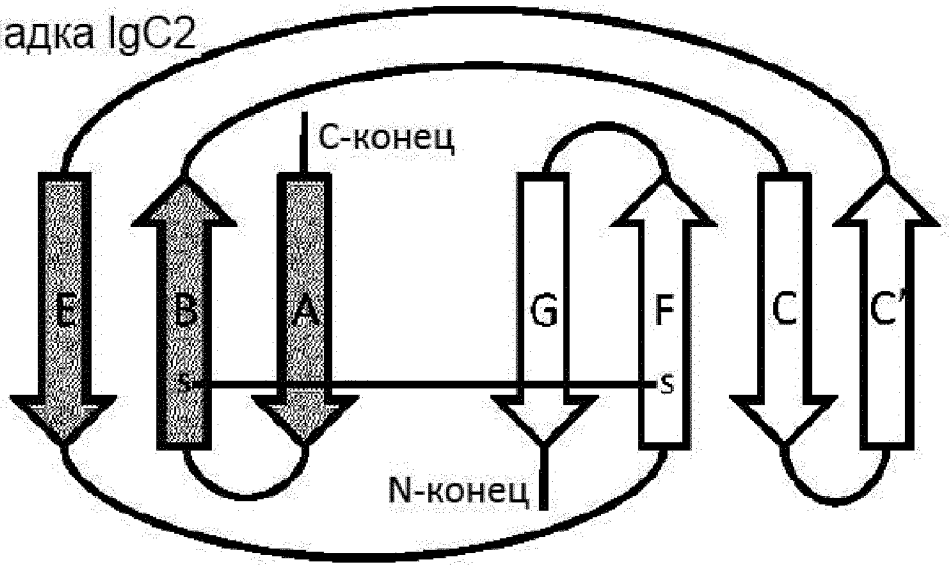
**ФИГ. 34A**



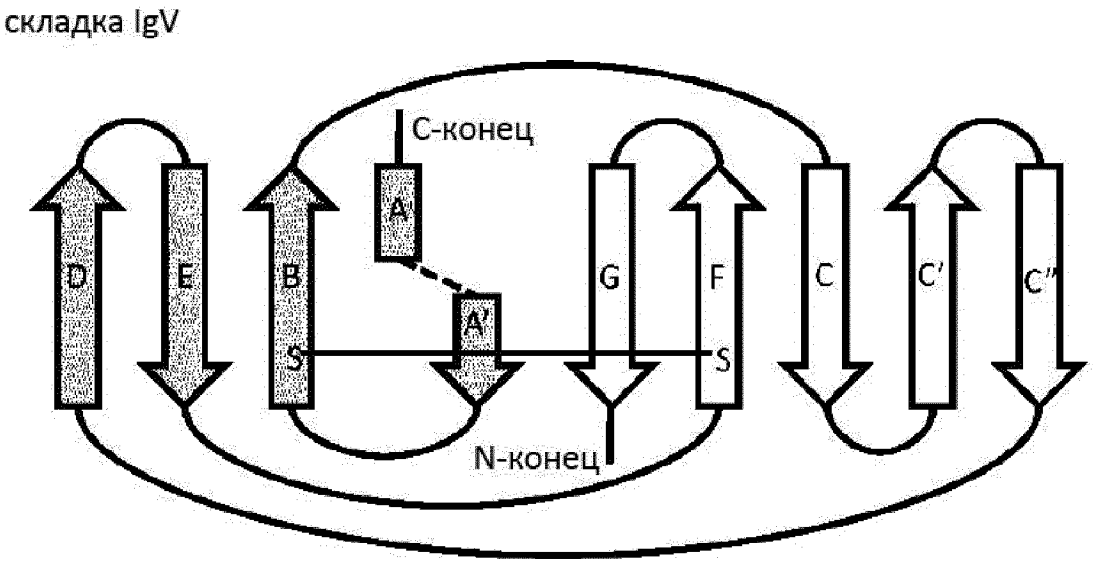

**ФИГ. 34B** складка IgC1




складка IgC2



ФИГ. 34C




ФИГ. 34D

