

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390380 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.04.28

(51) Int. Cl. C07K 16/46 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.07.13

(54) УСОВЕРШЕНСТВОВАННАЯ МОЛЕКУЛА ПОЛИПЕПТИДА С ДВОЙНОЙ
СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

(31) 10 2017 115 966.5; 62/532,713; 10 2017
119 866.0; 10 2018 108 995.3; 62/658,318
(32) 2017.07.14; 2017.07.14; 2017.08.30;
2018.04.16; 2018.04.16
(33) DE; US; DE; DE; US
(62) 202090250; 2018.07.13

(71) Заявитель:
ИММАТИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИЗ
ГМБХ (DE)

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

(57) Изобретение относится к биспецифической молекуле полипептида, содержащей первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, обеспечивающие связывающий участок, полученный из Т-клеточного рецептора (ТКР), специфичного к пептидному эпитопу, ассоциированному с главным комплексом гистосовместимости (МНС), и связывающий участок, полученный из антитела, способного к привлечению иммунных эффекторных клеток человека за счет специфического связывания с поверхностным антигеном указанных клеток, а также к способам получения биспецифической молекулы полипептида и их применению.

A2

202390380

202390380

A2

УСОВЕРШЕНСТВОВАННАЯ МОЛЕКУЛА ПОЛИПЕПТИДА С ДВОЙНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Настоящее изобретение относится к биспецифической молекуле полипептида, включающей первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, обеспечивающие связывающий участок, полученный из Т-клеточного рецептора (ТКР), специфичного к пептидному эпитопу, ассоциированному с главным комплексом гистосовместимости (МНС), и связывающий участок, полученный из антитела, способного к привлечению иммунных эффекторных клеток человека за счет специфического связывания с поверхностным антигеном указанных клеток, а также к способам получения биспецифической молекулы полипептида и ее применению.

Уровень техники

С разработкой технологии молекулярного клонирования и получением глубоких познаний в области инженерии антител появились различные форматы биспецифических антител («биспецифики»), из которых можно выбирать в целях получения оптимальной биологической активности и достижения клинических целей. В рамках противораковой терапии биспецифические антитела были разработаны, чтобы перенаправить активность иммунных эффекторных клеток в очаг опухоли за счет первого домена связывания, специфичного к эпитопу опухолевых клеток, и второго домена связывания, специфичного к эпитопу иммунных эффекторных клеток. Биспецифические антитела для перенаправления иммунных эффекторных клеток были разработаны в различных форматах, в том числе форматах без кристаллизуемого фрагмента (Fc)-области и образованных из IgG форматах с симметричной или асимметричной конструкцией. Кроме перенаправления эффекторных клеток к очагу опухоли, для биспецифических антител были установлены новые виды применения. Биспецифики, способные ингибировать две соотносимые сигнальные молекулы одновременно, могут быть разработаны для преодоления

наследственной или приобретенной резистентности и быть более эффективными ингибиторами ангиогенеза. Кроме того, биспецифические антитела могут использоваться в качестве многообещающих иммуностимулирующих веществ для лечения различных заболеваний, таких как рак. Биспецифические антитела могут также применяться для лечения гемофилии типа А за счет имитации функции фактора VIII. У биспецифических антител также имеется широкий спектр сфер потенциального применения при нарушениях и инфекционных заболеваниях костей и заболеваниях центральной нервной системы (обзор дан в работе Yang F. et al. Bispecific Antibodies as a Development Platform for New Concepts and Treatment Strategies. *Int J Mol Sci.* 2016 Dec 28;18(1)).

Т-клетки экспрессируют комплексы Т-клеточного рецептора (ТКР), которые способны индуцировать антиген-специфические иммунные реакции. Привлечение антигенного пептида/молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса к клетке-мишени с ТКР вызывает образование иммунного синапса и приводит к передаче сигналов через CD3 ко-рецепторы, являющиеся компонентами Т-рецепторного (ТКР) комплекса сигнальной трансдукции. Этот сигнальный каскад контролирует опосредованное Т-клетками уничтожение клетки, экспрессирующей антиген, за счет высвобождения и переноса гранзимов и перфорина с Т-клетки на клетку-мишень.

С исторической точки зрения открытие и получение антител с соединенными в одну цепь вариабельными доменами (scFvs, описанные в работе Bird et al. 1988), послужило основным импульсом для разработки биспецифических антител. Эта концепция в конечном итоге привела к созданию молекул формата BiTE и их клинического признания в качестве эффективного лекарственного средства для лечения лейкоза (Baeuerle, P.A.; Reinhardt, C. Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res.* 2009, 69, 4941–4944). При раковых заболеваниях биспецифические антитела, которые совместно привлекают субъединицу CD3 эпсилон и поверхностный антиген на опухолевой клетке, вызывают

опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевой клетки, при этом обходя необходимость прямого взаимодействия между ТКР и молекулы МНС I класса в комплексе с антигеном. Это расширяет репертуар Т-клеток в отношении возможностей распознавания опухоли и выполнения функции эффекторных клеток (Baeuerle, P.A.; Reinhardt, C. Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res.* 2009, 69, 4941–4944).

Stieglmaier J., и соавт. (в: Utilizing the BiTE (bispecific T-cell engager) platform for immunotherapy of cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(8):1093-9) описывают, что в данный момент идут исследования различных подходов раковой иммунотерапии на основе Т-клеток, среди них конструкции антител по технологии BiTE® (биспецифические активаторы Т-клеток), обладающие уникальным дизайном и механизмом действия. Они сконструированы с помощью генетического связывания на отдельной полипептидной цепи: минимальных доменов связывания моноклональных антител к опухолеассоциированным поверхностным антигенам и к ассоциированной с Т-клеточным рецептором молекулы CD3. Одновременное привлечение антигена клетки-мишени и молекулы CD3 приводит к активации поликлональных цитотоксических Т-клеток, в результате чего происходит лизис клетки-мишени. Блинатумомаб, созданный по технологии BiTE®, мишенью которого является CD19, проходит исследование для широкого спектра злокачественных заболеваний В-клеток и недавно был одобрен в США Управлением FDA для лечения В-клеточного отрицательного по филадельфийской хромосоме рецидивирующего/рефракторного острого В-линейного лимфобластного лейкоза под торговой маркой Блинцито™ (BLINCYTO™). Платформа BiTE® является одним из наиболее передовых в клиническом отношении вариантов Т-клеточной иммунотерапии.

Тем не менее, было обнаружено, что недостатками малых биспецифических молекул, таких как BiTE®, является низкий выход при производстве, сложные процессы очистки, тенденция к агрегации, а также очень короткий полупериод жизни в сыворотке. Чтобы преодолеть присущие данному классу молекул ограничения, были разработаны

различные биспецифические форматы на основе IgG человека, начиная с концепции рекомбинантных биспецифических прототипных иммуноглобулин (Ig)-G-подобных антител, разработанных более двух десятилетий назад, когда Morrison и коллеги произвели слияние гибких линкерных пептидов с С-концами тяжелых цепей молекулы IgG, а затем одноцепочечных вариабельных доменов, с различной специфичностью связывания (Coloma, M.J. and Morrison, S.L. (1997) Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies. *Nat. Biotechnol.* 15, 159–163). Эти молекулы можно было отличить от «нормальных» антител, поскольку они обладали двойной функциональностью. Технические препятствия первоначально затрудняли дальнейшее развитие, что приводило к тому, что биспецифические антитела (bsAb) оставались темой для НИОКР (R&D), в первую очередь, в академических и биотехнологических кругах. Тем не менее, развивающиеся быстрыми темпами технологии, которые открыли возможности для конструирования, производства и разработки производных рекомбинантных белков, в комбинации с возникшим вновь интересом со стороны фармацевтической промышленности, дали решительный толчок исследованиям в области bsAb. Сейчас имеется множество различных форматов bsAb, подходящих для разработки терапевтических белков (обзоры см. в работе Gramer, *mAbs*. 2013;5(6):962-973, Weidle, *Cancer Genomics Proteomics*. 2013 Nov-Dec;10(6):239-50, Brinkmann, *MAbs*. 2017 Feb/Mar;9(2):182-212.). Вкратце, включение Fc-частей (кристаллизующийся фрагмент), состоящих из доменов CH2 и CH3, привело к повышению продуктивности, упрощению процессов очистки и увеличению стабильности. Кроме того, полупериод жизни в сыворотке таких основанных на IgG лекарственных препаратов был увеличен вследствие i) увеличения в размере и ii) взаимодействия Fc-фрагмента с Fc-рецептором FcRn человека.

Разработка основанных на IgG биспецифических форматов далее подпитывалась открытием и внедрением сконструированных мутаций для облегчения гетеродимеризации двух различающихся CH3-доменов, тем самым связывая две различные полипептидные цепи. Основное понятие

было введено Ridgway JB, и соавт. (в работе: 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng.* 1996 Jul;9(7):617-21), которые предложили принцип «выступ-во-впадину (*knobs-into-holes*)» в качестве новой и эффективной стратегии дизайна конструкций гомодимеров тяжелой цепи антител для гетеродимеризации. В рамках этого подхода вариант «выступа» был впервые получен посредством замены малой аминокислоты более крупной в домене CH3 в иммуноадгезине CD4-IgG: T366Y. «Выступ» был сконструирован так, чтобы внедряться во впадину в домене CH3 гуманизированного антитела к CD3, полученного в результате целесообразной замены крупного остатка более малым: Y407T. Химерное антитело к CD3/CD4-IgG представляет собой белковый пул с содержанием очищенного белка А вплоть до 92%, полученный совместной экспрессией данных двух тяжелых цепей вместе с легкой цепью антитела к CD3. Напротив, лишь вплоть до 57% химерного антитела к CD3/CD4-IgG возможно было получить вследствие совместной экспрессии, при которой тяжелые цепи содержали домены CH3 дикого типа. Таким образом, модификация типа «выступ-во-впадину» упрощает конструирование гибридов из антитела и иммуноадгезинов и, скорее всего, других бифункциональных терапевтических средств, содержащих фрагмент Fc, включая биспецифические иммуноадгезины и биспецифические антитела. Atwell и соавт., 1997, *J Mol Biol* (Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library) в целях улучшения гетеродимеризации предлагают мутацию «выступ-во-впадину» (выступ: T366W/впадина: T366S+L368A+Y407V) в домене CH3 домена Fc. Данная концепция была далее усовершенствована за счет дополнительного введения остатков цистеина в целях образования стабилизирующей дисульфидной связи между гетеродимерными доменами CH3, как это описано в работе Merchant и соавт. 1998, *Nature Biotechnology* (An Efficient Route to Human Bispecific IgG).

Другие концепции получения гетеродимерных молекул были предложены Muda и соавт. 2011, *PEDS* (Therapeutic assessment of SEED: a new engineered antibody platform designed to generate mono- and bispecific

antibodies); Gunasekaran и соавт. 2010, *J Biol Chem* (Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG); Moore и соавт. 2011, *MAbs* (A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and monovalent co-engagement of distinct target antigens); Von Kreudenstein и соавт. 2013, *MAbs* (Improving biophysical properties of a bispecific antibody scaffold to aid developability: quality by molecular design.) Обзорная информация о этих концепциях приводится в работах На и соавт. 2016, *Front Immunol* (Immunoglobulin Fc Heterodimer Platform Technology: From Design to Application in Therapeutic Antibodies and Proteins) и Liu и соавт. 2017, *Front Immunol* (Fc Engineering for Developing Therapeutic Bispecific Antibodies and Novel scaffolds).

С введением Fc-фрагментов, состоящих из шарниров, доменов CH2 и CH3, или их частей, в биспецифические молекулы возникла проблема неспецифической иммобилизации этих молекул, индуцированной взаимодействием фрагмента Fc и рецептора Fc-гамма (FcγR). FcγRs состоят из различных поверхностных молекул клеток (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIII), связывающихся с различной аффинностью с эпитопами, представленными Fc-фрагментами молекул IgG. Как таковая неспецифическая (т. е. не индуцированная ни одним из двух доменов связывания биспецифической молекулы) иммобилизация неблагоприятна в связи с выявленными i) влиянием на фармакокинетику молекулы и ii) нецелевой активации иммунных эффекторных клеток различных Fc-вариантов и мутаций, препятствующих связыванию FcγR.

Morgan и соавт. 1995, *Immunology* (The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, FcγRI and FcγRIII binding) предложили замену остатков 233-236 молекулы IgG1 человека на соответствующие последовательности IgG2 человека, приводящую к полному ингибированию связывания FcγRI, полному ингибированию связывания C1q и снижению связывания FcγRIII.

В патенте EP1075496 предложены антитела и другие содержащие фрагмент Fc молекулы с вариациями в Fc-области (233P, 234V, 235A и отсутствие остатка или с G в положении 236 и 327G, 330S и 331S), где рекомбинантное антитело способно связываться с молекулой-мишенью без индукции существенного комплемент-зависимого лизиса или опосредованного клеткой разрушения мишени.

Переориентирующиеся молекулы с двойной аффинностью (DART) применяют, к примеру, для получения оптимального переориентированного уничтожения клеток В-клеточной лимфомы за счет Т-клеток. Впервые технология DART описана в работе Moore и соавт. (в: Application of dual affinity retargeting molecules to achieve optimal redirected T-cell killing of B-cell lymphoma, Blood. 2011 Apr 28;117(17):4542-51). Как показало сравнение с одноцепочечным биспецифическим антителом, несущим идентичные Fv-последовательности антител к CD19 и CD3, молекулы DART обладают большим потенциалом вызывать лизис В-клеток. Дальнейшим шагом в развитии технологии DART стали молекулы DART-Fc, которые описаны в работе Root и соавт, 2016 *antibodies* (Development of PF-06671008, a Highly Potent Anti-P-cadherin/Anti-CD3 Bispecific DART Molecule with Extended Half-Life for the Treatment of Cancer). В этой молекуле сочетаются высокая активность конструкции DART и, среди других положительных характеристик, увеличенный период полужизни молекул на основе Fc в сыворотке.

$\alpha\beta$ ТКР (ТКР) распознает антигенные пептиды, презентируемые молекулами МНС, и он является ответственным за специфичность Т-клеток. Как α -, так и β -цепи ТКР имеют переменные (V) и константные домены. V-домены участвуют в связывании антигенного пептида, а константные домены проникают через мембрану Т-клетки. Исходя из анализа кристаллической структуры ТКР, связанного с комплексом пептида и МНС, области, определяющие комплементарность (CDR) 3, обеих цепей V_α и V_β , предпочтительно взаимодействуют с пептидом, тогда как CDR 1 и 2 взаимодействуют с молекулой МНС. Тем не менее, также было описано

распознавание пептида областью CDR 1 и распознавание молекулы MHC областью CDR 3 (Piepenbrink et al, The basis for limited specificity and MHC restriction in a T cell receptor interface, *Nat Commun*, 2013; 4, 1948). $\alpha\beta$ -гетеродимер ТКР тесно ассоциируется с белками CD3, CD4 или CD8, и другими белками адгезии и сигнальной трансдукции. Связывание антигенного пептида за счет V-областей ТКР стимулирует активацию Т-клеток с помощи сигнальной трансдукции посредством константных доменов ТКР через цитоплазматические белки CD3 и CD4 или CD8.

В отличие от формата с ТКР полной длины одноцепочечные ТКР (scTKP) имеют существенные преимущества в отношении конструирования, экспрессии растворимого белка и клинического потенциала. Что касается перспективности для экспрессии растворимого белка (т. е. производства), scTKP получают в виде индивидуального полипептида, избегая необходимости получать каждую цепь ТКР в виде отдельных полипептидов и позволяя получать большое количество scTKP правильной конструкции, который связывается со своим лигандом комплекса пептид-MHC. Данная характеристика позволяет получать выход при производстве, необходимый для клинического применения. Наконец, с клинической точки зрения scTKP, состоящий только из V-областей (scTv), может иметь формат терапевтических средств или реактивов для диагностических целей, аналогично фрагментам scFv.

В заявке США 2006-0166875 предложен одноцепочечный Т-клеточный рецептор (scTKP), включающий сегмент, состоящий из последовательности вариабельной области альфа-цепи ТКР, слитой с N-концом внеклеточной последовательности константной области альфа-цепи ТКР, бета-сегмент, состоящий из вариабельной области бета-цепи ТКР, слитой с N-концом внеклеточной последовательности константной области бета-цепи ТКР, и линкерную последовательность, связывающую C-конец альфа-сегмента с N-концом бета-сегмента, или наоборот, причем внеклеточные последовательности константной области альфа- и бета-сегментов связаны дисульфидной связью, длина линкерной последовательности и

положение дисульфидной связи таковы, что последовательности вариабельной области альфа- и бета-сегментов взаимно ориентированы, по существу, как в природных альфа-/бета-Т-клеточных рецепторах. Также предложены комплексы из двух или более таких scTKP и применение этих scTKP в терапии и различных видах скрининга. В отличие от scTKP, описанных в заявке США 2006-0166875, в заявке США 2012-0252742 предложен растворимый одноцепочечный ТКР человека без константных доменов, состоящий только из вариабельных фрагментов ТКР (scTv), который полезен для многих целей, в том числе при лечении раковых, вирусных и аутоиммунных заболеваний.

McCormack E, и соавт. (в: Bi-specific TCR-anti CD3 redirected T-cell targeting of NY-ESO-1- and LAGE-1-positive tumors. Cancer Immunol Immunother. 2013 Apr;62(4):773-85) раскрывают, что NY-ESO-1 и LAGE-1 являются раково-тестикулярными антигенами с идеальным профилем для противоопухолевой иммунотерапии, комбинирующими повышенный уровень при многих видах рака с высоко ограниченной экспрессией в нормальных тканях, и имеющими общий эпитоп HLA-A*0201, 157-165. Они предоставляют данные для описания специфичности и противоопухолевой активности бифункциональной конструкции ImmTAC, содержащей растворимый, высокоаффинный Т-клеточный рецептор (ТКР), специфический для NY-ESO-1157-165, слитого с анти-CD3 scFv. Данный реактив, ImmTAC-NYE, как было показано, уничтожает HLA-A2, антиген-положительные опухолевые клеточные линии, и свежевыделенные HLA-A2- и LAGE-1-положительные клетки НМРЛ. При использовании оптической визуализации *in vivo* результаты демонстрируют адресное направление *in vivo* высокоаффинных NYESO-специфических ТКР с флуоресцентными метками к HLA-A2-, NY-ESO-1157-165-положительных опухолям у мышей с трансплантатами. Активность ImmTAC-NYE *in vivo* проверяли на модели опухоли, в которой человеческие лимфоциты были устойчиво совместно трансплантированы иммунодефицитным мышам линии NSG, имеющим трансплантаты опухоли; активность наблюдали как в моделях предупреждения опухоли, так и в моделях с развившейся опухолью при

использовании флуоресцентного считывания зеленого флуоресцирующего белка (GFP). Количественную ОТ-ПЦР использовали для анализа экспрессии как антигенов NY-ESO-1, так и LAGE-1 в 15 нормальных тканях, 5 линиях раковых клеток, 10 НМПЛ и 10 образцах рака яичника. В целом, РНК LAGE-1 экспрессировалась в опухолевых образцах с большей частотой и на более высоком уровне, чем NY-ESO-1. ImmTACs включает одноцепочечный фрагмент Fv, образованный из антитела к CD3 UCNT-1, ковалентно связанного с С- или N-концом альфа- или бета-цепи ТКР.

Патент EP1868650 относится к молекулам диател и их применению в лечении спектра заболеваний и нарушений, в том числе иммунологических нарушений, инфекционного заболевания, интоксикации и раковых заболеваний. Молекулы диател включают две полипептидные цепи, которые ассоциируются с образованием по меньшей мере двух эпитоп-связывающих сайтов, которые могут распознавать один и тот же или различные эпитопы на одном и том же или различающихся антигенах. Кроме того, антигены могут быть из одной и той же или разных молекул. Отдельные полипептидные цепи молекулы диатела могут быть ковалентно связаны с помощью непептидных ковалентных связей, таких как дисульфидное связывание остатков цистеина, находящихся в каждой полипептидной цепи, но не ограничиваясь ими. В конкретных вариантах осуществления молекулы диатела далее включают область Fc, предложенную в настоящем документе, поскольку это позволяет с помощью конструирования встраивать в молекулу присущие антителу свойства (например, длинный полупериод). В патенте EP1868650 сформулирована необходимость присутствия связывающих областей вариабельных доменов легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина, и широко обсуждается тема функциональных связывающих агентов Fc-рецептора.

В заявке WO 2016/184592 A1 предложены биспецифические молекулы, в которых одна специфичность вносится ТКР, а другая – антителом, которое направлено против антигена или эпитопа на поверхности лимфоцитов, но в

ней не раскрывается конкретное расположение элементов ТКР и переменных областей антитела, предложенных в настоящем документе.

Патент EP2258720A1 относится к слитому белку (TFP) функционального Т-клеточного рецептора (ТКР), распознающего и связывающегося по меньшей мере с одним эпитопом, презентируемым МНС, и содержащему по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, распознающую и связывающуюся с антигеном.

Целью настоящего изобретения является предложить улучшенные биспецифические молекулы, способные к нацеливанию на комплексы пептида с МНС, которые могут быть легко получены, обладают высокой стабильностью, а также обеспечивают высокую активность при связывании с соответствующими антигенными эпитопами. Другие цели и преимущества настоящего изобретения станут очевидными при изучении последующего описания и его предпочтительных вариантов осуществления, а также соответствующих примеров.

В первом аспекте изобретения указанная выше задача решена предложением молекулы полипептида с двойной специфичностью, выбранной из группы молекул, включающих первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где:

первая полипептидная цепь включает первый участок связывания переменного домена (VD1) антитела, специфически связывающийся с поверхностным антигеном иммунной эффекторной клетки человека, и первый участок связывания переменного домена (VR1) ТКР, специфически связывающийся с МНС-ассоциированным пептидным эпитопом, и

первый линкер (LINK1), соединяющий указанные домены;

вторая полипептидная цепь включает второй участок связывания переменного домена (VR2) ТКР, специфически связывающийся с МНС-ассоциированным пептидным эпитопом, и

второй участок связывания переменного домена (VD2) антитела, специфически связывающийся с поверхностным антигеном иммунной эффекторной клетки человека, и

второй линкер (LINK2), соединяющий указанные домены;

где указанный первый участок связывания (VD1) и указанный второй участок связывания (VD2) ассоциируются с образованием первого сайта связывания (VD1)(VD2), который связывается с эпитопом молекулы клеточной поверхности;

указанный первый участок связывания (VR1) и указанный второй участок связывания (VR2) ассоциируются с образованием второго сайта связывания (VR1)(VR2), который связывается с MHC-ассоциированным пептидным эпитопом;

где указанные две полипептидные цепи слиты с шарнирными доменами IgG человека и/или Fc-доменами IgG человека или их димеризующимися областями; и

где указанные две полипептидные цепи соединены ковалентными и/или нековалентными связями между указанными шарнирными доменами и/или Fc-доменами; и

где указанная молекула полипептида с двойной специфичностью способна одновременно связываться с молекулой клеточной поверхности и MHC-ассоциированным пептидным эпитопом, и

молекулы полипептидов с двойной специфичностью, где порядок участков связывания в полипептидной цепи выбирается из VD1-VR1; VD1-VR2; VD2-VR1; VD2-VR2; VR1-VD1; VR1-VD2; VR2-VD1; VR2-VD2, и где домены соединены с помощью либо LINK1, либо LINK2.

Предпочтительной является молекула полипептида с двойной специфичностью, включающая первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где: первая полипептидная цепь включает первый участок связывания переменного домена (VD1), образованного из антитела, способного рекрутировать иммунные эффекторные клетки человека за счет специфического связывания с поверхностным антигеном указанных клеток, и первый участок связывания переменного домена

(VR1), образованного из ТКР, специфичного к МНС-ассоциированному пептидному эпитопу, и первый линкерный участок (LINK1), соединяющий два домена; вторая полипептидная цепь включает второй участок связывания переменного домена (VR2), образованного из ТКР, специфичного к МНС-ассоциированному пептидному эпитопу, и второй участок связывания переменного домена (VD2), образованного из антитела, способного рекрутировать иммунные эффекторные клетки человека за счет специфического связывания с поверхностным антигеном указанных клеток, и второй линкерный участок (LINK2), соединяющий два домена; где указанный первый участок связывания (VD1) и указанный второй участок связывания (VD2) ассоциируются с образованием первого сайта связывания (VD1)(VD2), который связывается с эпитопом молекулы клеточной поверхности; указанный первый участок связывания (VR1) и указанный второй участок связывания (VR2) ассоциируются с образованием второго сайта связывания (VR1)(VR2), который связывается с МНС-ассоциированным пептидным эпитопом; где по меньшей мере одна из указанных полипептидных цепей соединена на своем С-конце с шарнирными областями, СН2- и/или СН3-доменами или их частями, полученными из IgG человека; и где указанная молекула полипептида с двойной специфичностью способна одновременно связываться с антигеном иммунной эффекторной клетки и МНС-ассоциированным пептидным эпитопом.

Предпочтительно, если молекула полипептида с двойной специфичностью согласно настоящему изобретению связывается с высокой специфичностью как с антигеном иммунной эффекторной клетки, так и конкретным эпитопом антигена, презентруемым в виде комплекса пептида с молекулой МНС, например, с аффинностью связывания (KD), составляющей около 100 нМ или ниже, около 30 нМ или ниже, около 10 нМ или ниже, около 3 нМ или ниже, около 1 нМ или ниже, например, измеренной методом биослойной интерферометрии, как это описано в Примере 6, или как это определено с помощью проточной цитометрии.

Молекулы полипептидов с двойной специфичностью согласно настоящему изобретению показаны в настоящем контексте на примере молекулы полипептида с двойной специфичностью, содержащей первую полипептидную цепь, включающую последовательность с SEQ ID No. 16, и вторую полипептидную цепь, включающую последовательность с SEQ ID No. 17.

Во втором аспекте изобретения указанная выше задача решена предложением нуклеиновой(ых) кислоты(кислот), кодирующих первую полипептидную цепь и/или вторую полипептидную цепь, как предложено в настоящем документе, или вектора(ов) экспрессии, включающего(их) такую нуклеиновую кислоту. В третьем аспекте изобретения указанная выше задача решена предложением клетки-хозяина, включающей вектор(ы), как определено в настоящем документе.

В четвертом аспекте изобретения указанная выше задача решена предложением способа получения молекулы полипептида с двойной специфичностью в соответствии с настоящим изобретением, включающего подходящую экспрессию указанного(ых) вектора(ов) экспрессии, включающего(их) нуклеиновую(ые) кислоту(ы) по изобретению в подходящей клетке-хозяине, и подходящую очистку молекулы(молекул) из клетки и/или их среды.

В пятом аспекте изобретения указанная выше задача решена предложением фармацевтической композиции, содержащей молекулу полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением, нуклеиновую кислоту или вектор(ы) экспрессии в соответствии с изобретением, или клетку в соответствии с изобретением вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями или вспомогательными веществами.

В шестом аспекте изобретения изобретение относится к молекуле полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением,

нуклеиновой(ым) кислоте(ам) или вектору(ам) экспрессии в соответствии с изобретением, клетке в соответствии с изобретением, или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением для применения в медицине.

В седьмом аспекте изобретения изобретение относится к молекуле полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением, нуклеиновой(ым) кислоте(ам) или вектору(ам) экспрессии в соответствии с изобретением, к клетке в соответствии с изобретением, или к фармацевтической композиции в соответствии с изобретением, для применения в лечении заболевания или нарушения согласно настоящему описанию, в частности, выбранному из раковых и инфекционных заболеваний.

В восьмом аспекте изобретения изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения, включающему введение терапевтически эффективного количества молекулы полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением, нуклеиновой кислоты или вектора(ов) экспрессии в соответствии с изобретением, клетки в соответствии с изобретением, или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением.

В девятом аспекте изобретения изобретение относится к способу вызывания иммунного ответа у пациента или субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества молекулы полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением.

В десятом аспекте изобретения изобретение относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента или субъекта, включающему введение пациенту эффективного количества молекулы полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением.

Как было упомянуто выше, в изобретении предложены новые усовершенствованные молекулы полипептидов с двойной специфичностью. Молекулы в общем включают первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где цепи совместно обеспечивают переменный домен антитела, специфичного к эпитопу поверхностного антигена иммунной эффекторной клетки, и переменный домен ТКР, который является специфичным к МНС-ассоциированному пептидному эпитопу, например, эпитопу рака или эпитопам, презентруемым в связи с инфекцией, например, вирусной инфекцией, такой как ВИЧ. Антитело и образованные из ТКР переменные домены стабилизируются посредством ковалентных и нековалентных связей, образованных между Fc-фрагментами или их участками, расположенными на обеих полипептидных цепях. Молекула полипептида с двойной специфичностью способна в связи с этим одновременно связываться с клеточным рецептором и МНС-ассоциированным пептидным эпитопом.

В контексте настоящего изобретения переменные домены (VD1) и (VD2) образованы из антител, способных рекрутировать иммунные эффекторные клетки человека за счет специфического связывания с поверхностным антигеном указанных эффекторных клеток. В одном конкретном варианте осуществления указанные антитела специфически связываются с эпитопами комплекса ТКР и CD3 Т-клеток человека, включающими пептидные цепи ТКР-альфа, ТКР-бета, CD3-гамма, CD3-дельта, CD3-эпсилон и CD3-дзета.

Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с настоящим изобретением включает первую полипептидную и вторую полипептидную цепь, образуя первый (VD1) и второй (VD2) участок связывания, соответственно, переменного домена, полученного из антитела, способного рекрутировать иммунные эффекторные клетки человека за счет специфического связывания с поверхностным антигеном указанных клеток. Данный первый участок связывания (VD1) и указанный второй участок связывания (VD2) ассоциируются с образованием первого

сайта связывания (VD1)(VD2), который связывается с эпитопом поверхностного антигена иммунной эффекторной клетки; Кроме того, первая и вторая полипептидная цепь молекулы полипептида включает первый (VR1) и второй (VR2) участок связывания, соответственно, переменного домена, образованного из ТКР, специфичного к МНС-ассоциированному пептидному эпитопу. Указанный первый участок связывания (VR1) и указанный второй участок связывания (VR2) ассоциируются с образованием второго сайта связывания (VR1)(VR2), который связывается с указанным МНС-ассоциированным пептидным эпитопом. В одном варианте осуществления молекулы полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением порядок/ориентация участков в первой полипептидной цепи выбрана из VD1-LINK1-VR1, и VR1-LINK1-VD1; в другом варианте осуществления порядок/ориентация участков во второй полипептидной цепи выбрана из VD2-LINK2-VR2, и VR2-LINK2-VD2, то есть расположение сайтов связывания может быть изменено с получением «левой» или «правой» молекулы (см., например, Фигуру 5). Кроме того, конфигурация альфа-и бета-цепей относящейся к ТКР части может быть изменена.

В контексте настоящего изобретения молекула полипептида с двойной аффинностью в соответствии с изобретением показана на примере структуры, которая связывается с пептидом SLYNTVATL (SEQ ID No. 7) при презентации в виде комплекса пептида и МНС. Тем не менее, концепция изобретения, разумеется, не ограничивается этим конкретным пептидом и включает в сущности любой связанный с заболеванием или нарушением эпитоп, презентуемый при участии молекулы МНС. Данная презентация может быть связана с молекулами МНС как I, так и II класса. Молекулы главного комплекса гистосовместимости человека (МНС-I) представлены на поверхности всех клеток с ядром и отображают обширный ряд пептидных эпитопов для контроля, осуществляемого различными CD8⁺ Т-клетками. Ответы CD8⁺ Т-клеток необходимы для контроля и подавления вирусных инфекций, а также для уничтожения трансформированных и онкогенных клеток. Примеры предпочтительных распознаваемых пептидных эпитопов

представлены в соответствующей литературе и, в частности, включают пептиды, раскрытые в таблицах 1 – 5 заявки WO 2016/170139; таблицах 1 – 5 заявки WO 2016/102272; таблицах 1 или 2 заявки WO 2016/156202; таблицах 1 – 4 заявки WO 2016/146751; таблице 2 заявки WO 2011/113819; таблицах 1 – 4b заявки WO 2016/156230; таблицах 1 – 4b заявки WO 2016/177784; таблицах 1 – 4 заявки WO 2016/202963; таблицах 1 и 2 заявки WO 2016/207164; таблицах 1 – 4 заявки WO 2017/001491; таблицах 1 – 4 заявки WO 2017/005733; таблицах 1 – 8 заявки WO 2017/021527; таблицах 1 – 3 заявки WO 2017/036936; таблицах 1 – 4 заявки PCT/EP2016/073416 для препаратов для лечения рака, в патентной заявке США 2016-0187351, в патентной заявке США 2017-0165335, в патентной заявке США 2017-0035807, в патентной заявке США 2016-0280759, в патентной заявке США 2016-0287687, в патентной заявке США 2016-0346371, в патентной заявке США 2016-0368965, в патентной заявке США 2017-0022251, в патентной заявке США 2017-0002055, в патентной заявке США 2017-0029486, в патентной заявке США 2017-0037089, в патентной заявке США 2017-0136108, в патентной заявке США 2017-0101473, в патентной заявке США 2017-0096461, в патентной заявке США 2017-0165337, в патентной заявке США 2017-0189505, в патентной заявке США 2017-0173132, в патентной заявке США 2017-0296640, в патентной заявке США 2017-0253633 и в патентной заявке США 2017-0260249, содержание которых включено в данное описание во всей полноте путем ссылки. В другом аспекте молекула полипептида с двойной аффинностью в соответствии с изобретением распознает пептид, состоящий из любого из пептидов, описанных в приводимых выше патентных заявках.

В одном аспекте молекула полипептида с двойной аффинностью в соответствии с изобретением связывается с или способна быть специфически распознана/способна связываться с одним или несколькими пептидами с общей длиной от 8 до 100 аминокислот, от 8 и 30 аминокислот, от 8 до 16 аминокислот, предпочтительно, от 8 и 14 аминокислот, а именно 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 аминокислот, в случае удлиненных пептидов, связывающихся с молекулами II класса, длина может быть также 15, 16, 17,

18, 19, 20, 21 или 22 аминокислот. В еще в одном аспекте молекула полипептида с двойной аффинностью в соответствии с изобретением связывается с или способна быть специфически распознана/способна связываться с одним или несколькими пептидами с общей длиной от 8 до 12 аминокислот, от 8 до 10 аминокислот, от 9 до 15 аминокислот, от 9 до 14 аминокислот, от 9 до 13 аминокислот, от 9 до 12 аминокислот, от 9 до 11 аминокислот; от 10 до 15 аминокислот, от 10 до 14 аминокислот, от 10 до 13 аминокислот или от 10 до 12 аминокислот.

Другие подходящие эпитопы могут быть идентифицированы из баз данных, таких как, например, Базы данных иммунных эпитопов (доступ по адресу: www.iedb.org).

Понятие «иммунная(ые) эффекторная(ые) клетка(и) человека» относится к клетке в контексте природного разнообразия клеток иммунной системы человека, которая в активированном состоянии способна обуславливать изменение в жизнеспособности клетки-мишени. Понятие «жизнеспособность клетки-мишени» может относиться в рамках изобретения к способности клетки-мишени к выживанию, пролиферации и/или взаимодействию с другими клетками. Такое взаимодействие может быть либо прямым, например, когда клетка-мишень контактирует с другой клеткой, либо косвенным, например, когда клетка-мишень секретирует вещества, которые оказывают влияние на функционирование другой отдаленной клетки. Клетка-мишень по отношению к человеку может быть либо природной, либо чужеродной. В случае если клетка является природной по отношению к человеку, предпочтительно, чтобы клетка-мишень подверглась трансформации, став злокачественной клеткой. Природная клетка дополнительно может быть патологически модифицированной природной клеткой, например, природной клеткой, инфицированной организмом, таким как вирус, *плазмодий* или бактерия. В случае если клетка является чужеродной по отношению к человеку, предпочтительно, чтобы клетка-мишень являлась инвазивным патогеном, например, инвазивной бактерией или *плазмодием*.

Предпочтительной является молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением, где указанные первая и вторая полипептидная цепи дополнительно включают по меньшей мере один шарнирный домен и/или Fc-домен или его фрагмент. В антителах «шарнир» или «шарнирная область» или «шарнирный домен» относится к гибкому участку тяжелой цепи, расположенному между CH1-доменом и CH2-доменом. Он имеет длину приблизительно в 25 аминокислот и подразделяется на «верхнюю шарнирную область», «среднюю шарнирную область» или «основную шарнирную область» и «нижнюю шарнирную область». «Шарнирный субдомен» относится к верхней шарнирной области, средней (или основной) шарнирной области или нижней шарнирной области. Аминокислотные последовательности шарниров молекул IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 являются (указана нумерация ЕС):

IgG1: E₂₁₆PKSCDKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID No. 1)

IgG2: E₂₁₆RKCCVECPGPCPAPPVAGP (SEQ ID No. 2)

IgG3:

ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPE₂₁₆PKSCDTPPPCPRCPAPELLG (SEQ ID No. 3)

IgG4: E₂₁₆SKYGPPCPSCPAPEFLG (SEQ ID No. 4)

Основная шарнирная область обычно содержит по меньшей мере один цистеиновый мостик, соединяющий две тяжелые цепи. Кроме того, в целях снижения нежелательной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) в нижнюю шарнирную область могут быть введены мутации.

Предпочтительной является молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с настоящим изобретением, включающая по меньшей мере один домен кристаллизующегося фрагмента (Fc) IgG, т. е. область кристаллизующегося фрагмента (Fc-область), хвостовая область антитела, которая взаимодействует с Fc-рецепторами и некоторыми белками системы комплемента. Fc-области содержат два или три константных домена тяжелой цепи (CH-домены 2, 3, и 4) в каждой

полипептидной цепи. Fc-области молекул IgG также вмещают высоко консервативный сайт N-гликозилирования. Гликозилирование Fc-фрагмента необходимо для опосредованной Fc-рецептором активности. Форматы биспецифических антител малого размера, такие как BiTE® и DART (~50 кДа) могут приводить к быстрому выведению и короткому времени полужизни. Поэтому для получения улучшенных фармакокинетических свойств молекула полипептида scTv-клеточного рецептора с двойной специфичностью (например, CD3) может быть слита с Fc-доменом (IgG1 человека), что увеличивает молекулярную массу. Как было показано, несколько мутаций, расположенных на поверхности раздела между доменами CH2 и CH3, таких как T250Q/M428L и M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F, повышают аффинность связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) и время полужизни IgG1 *in vivo*. Тем самым время полужизни в сыворотке Fc-содержащей молекулы может быть дополнительно увеличено.

В молекулах полипептидов с двойной специфичностью по изобретению указанный Fc-домен может включать CH2-домен, включающий по меньшей мере одну мутацию, подавляющую эффекторную функцию. Предпочтительно, если эти мутации вводят в последовательность ELLGGP (SEQ ID No. 50) молекулы IgG1 человека (остатки 233-238) или соответствующие остатки других изотипов), которые, как известно, связаны с эффекторными функциями. В принципе, одну или несколько мутаций, соответствующих остаткам, полученным из IgG2 и/или IgG4, вводят в фрагмент IgG1 Fc. Предпочтительными являются: E233P, L234V, L235A и отсутствие остатка или G в положении 236. Другой мутацией является P331S. В патенте № EP1075496 раскрыто рекомбинантное антитело, включающее химерный домен, который получен из двух или более CH2-доменов тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина человека, где молекулы иммуноглобулина человека выбраны из IgG1, IgG2 и IgG4, и где химерный домен является CH2-доменом тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина человека, имеющим следующие блоки аминокислот в указанных положениях: 233P, 234V, 235A и отсутствие остатка или G в положении 236

и 327G, 330S и 331S в соответствии с системой нумерации EU, и его последовательность по меньшей мере на 98% идентична последовательности CH2 (остатки 231-340) молекул IgG1, IgG2 или IgG4 человека, имеющих указанные модификации аминокислот.

Примерами предпочтительных частичных последовательностей CH2 для использования могут быть (полностью или частично) следующие:

231-

APPVA-GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASPSIEK-
334 (SEQ ID No. 5);

и

231-

APPVA-GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASPSIEK-
334 (SEQ ID No. 6), где изменения подчеркнуты, что в положении 297 находится N (гликозилированный вариант) или остаток, выбранный из группы с A, G и Q (дегликозилированный вариант).

В молекулах полипептидов с двойной специфичностью по изобретению указанный Fc-домен может включать CH3-домен, включающий по меньшей мере одну мутацию, способствующую образованию гетеродимеров. В целях максимального увеличения выхода интересующего гетеродимерного Fc-белка с двойной специфичностью и упрощения очистки, в Fc-домен могут быть встроены мутации типа «выступ-во-впадину». За счет воздействия такой конструкции с добавлением выступающих массивных гидрофобных остатков («выступ») в одну цепь и созданием комплементарных гидрофобных карманов («впадин») на другой цепи Fc-домены образуют гетеродимеры вместо обычных для них гомодимеров. Вариант «выступа» может быть получен за счет замены малой аминокислоты на более крупную для введения во «впадину» в противоположном домене, созданную за счет замены крупного остатка на более малый (Ridgway, J.B.B.; Presta, L.G.;

Carter, P. "Knobs-into-holes" engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng.* 1996, 9, 617–621; WO 2002/002781).

Предпочтительной является молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением, в которой указанная мутация типа «выступ-во-впадину» выбрана из T366W в качестве выступа и T366'S, L368'A и Y407'V в качестве впадины в CH3-домене (см., например, заявку WO 98/50431). Данный набор мутаций может быть дополнительно расширен включением мутаций K409A и F405'K, как это описано в работе Wei и соавт. (Structural basis of a novel heterodimeric Fc for bispecific antibody production, *Oncotarget*. 2017). Другим выступом может быть T366Y, а впадиной – Y407'T.

Молекулы полипептидов с двойной специфичностью по изобретению дополнительно могут включать искусственно введенные цистеиновые мостики между по меньшей мере одним остатком цистеина на первой полипептидной цепи и по меньшей мере одним остатком цистеина на второй полипептидной цепи в целях улучшения стабильности молекул, в оптимальном случае не оказывающие негативного влияния на характеристики связывания бивалентной молекулы, и/или улучшения гетеродимеризации. Для дополнительной стабильности в CH3-домен обеих цепей, выступа и впадины, с помощью добавления одиночного цистеина может быть введена дисульфидная связь. Предпочтительной является молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением, в которой Fc-домен включает CH3-домен, включающий по меньшей мере один дополнительный остаток цистеина, например, S354C и/или Y349C.

Предпочтительной является молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением, в которой указанная молекула CD выбрана из группы CD-молекул, связанных с иммунным ответом, CD3, таких как цепи CD3γ, CD3δ, и CD3ε, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD22, CD25, CD28, CD32a, CD32b, CD33,

CD41, CD41b, CD42a, CD42b, CD44, CD45RA, CD49, CD55, CD56, CD61, CD64, CD68, CD94, CD90, CD117, CD123, CD125, CD134, CD137, CD152, CD163, CD193, CD203c, CD235a, CD278, CD279, CD287, Nkp46, NKG2D, GITR, FcεRI, TCR-альфа/-бета, TCR-гамма/-дельта и HLA-DR. В зависимости от комбинации двух антиген-связывающих единиц молекулы полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением могут быть достигнуты определенные преимущества, относящиеся к функции молекулы, в частности повышение активности.

Предпочтительной является типичная молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением, в которой области в первой полипептидной цепи последовательности с SEQ ID No. 28 для VD1, SEQ ID No. 29 для VR1, SEQ ID No. 30 для LINK1; и области во второй полипептидной цепи включают последовательность с SEQ ID No. 31 для VD2, SEQ ID No. 32 для VR2 и SEQ ID No. 30 для LINK2.

Кроме того, предпочтительной является типичная молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением, в которой Fc-область в первой полипептидной цепи включает последовательность с SEQ ID No. 26 (Fc1), и Fc-область во второй полипептидной цепи включает последовательность с SEQ ID No. 27 (Fc2).

Кроме того, предпочтительной является типичная молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением, включающая первую полипептидную цепь, включающую последовательность с SEQ ID No. 16 (1-ая цепь молекулы целиком) и вторую полипептидную цепь, включающую последовательность с SEQ ID No. 17 (2-ая цепь молекулы целиком).

Кроме того, еще более предпочтительной является типичная молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением, где указанный первый участок связывания (VD1)(VD2), который связывается с эпитопом антигена поверхности иммунных клеток человека

(например, CD3) гуманизирован; и/или указанный второй участок связывания (VR1)(VR2), который связывается с указанным МНС-ассоциированным пептидным эпитопом имеет аффинную зрелость.

Гуманизированные антитела являются антителами (или их частями) видов, не являющихся человеком, белковые последовательности которых были модифицированы, чтобы увеличить их сходство с вариантами антител, вырабатываемыми естественным путем у человека. Процесс «гуманизации» обычно применяется к моноклональным антителам, разработанным для введения человеку (например, антитела, разработанные в качестве противораковых лекарственных препаратов). Подходящие способы гуманизации известны из литературы, и их обзор дан, например, в работах Olimpieri, Pier Paolo, Paolo Marcatili, and Anna Tramontano. "Tabhu: Tools for Antibody Humanization." *Bioinformatics* 31.3 (2015): 434–435. PMC; Safdari Y, Farajnia S, Asgharzadeh M, Khalili M. Antibody humanization methods - a review and update. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2013;29:175-86; or Ahmadzadeh V, Farajnia S, Feizi MA, Nejad RA. Antibody humanization methods for development of therapeutic applications. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2014 Apr;33(2):67-73.

В основном, аффинная зрелость *in vitro* ТКР и антител может быть получена в соответствии с методиками, описываемыми в литературе, в частности, при использовании поверхностного дисплея на основе дрожжей или фагов (на основе, например, работы Holler PD, и соавт. *In vitro* evolution of a T cell receptor with high affinity for peptide/MHC. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 May 9; 97(10):5387-92; Boder ET и соавт., Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 Sep 26; 97(20):10701-5; и, в качестве более нового примера, Zhao Q, и соавт. Affinity maturation of T-cell receptor-like antibodies for Wilms tumor 1 peptide greatly enhances therapeutic potential. *Leukemia.* 2015; 29(11):2238-2247).

Сайты связывания (VD1)(VD2) и (VR1)(VR2) по настоящему изобретению предпочтительно специфически связываются с поверхностным антигеном иммунных клеток человека и комплексом пептид-молекула HLA, соответственно. Понятие «специфическое связывание», используемое в связи с понятием «сайты связывания» согласно настоящему описанию, и его грамматические варианты используются для обозначения сайта с аффинностью связывания (KD) для комплекса пептид-молекула HLA и/или эпитопа антитела со значением 100 мкМ или ниже. Сайты связывания (VD1)(VD2) и (VR1)(VR2) по настоящему изобретению связываются с эпитопом антитела CD или комплексом пептида и молекулы HLA, соответственно, с аффинностью связывания (KD) около 100 мкМ или ниже, около 50 мкМ или ниже, около 25 мкМ или ниже или около 10 мкМ или ниже. Более предпочтительными являются высокоаффинные сайты связывания с аффинностью связывания, составляющей около 1 мкМ или ниже, около 100 нМ или ниже, около 50 нМ или ниже, около 25 нМ или ниже, около 10 нМ или ниже, около 5 нМ или ниже, около 2 нМ или ниже, около 1 нМ или ниже, около 500 пМ или ниже, около 200 пМ или ниже, около 100 пМ или ниже. Неограничивающие примеры диапазонов предпочтительной аффинности связывания для сайтов связывания по настоящему изобретению включают значения от около 10 пМ до около 100 пМ, от 100 пМ до около 1 нМ, от 1 нМ до около 10 нМ; от около 10 нМ до около 20 нМ; от около 20 нМ до около 30 нМ; от около 30 нМ до около 40 нМ; от около 40 нМ до около 50 нМ; от около 50 нМ до около 60 нМ; от около 60 нМ до около 70 нМ; от около 70 нМ до около 80 нМ; от около 80 нМ до около 90 нМ; и от около 90 нМ до около 100 нМ, например, измеренные с помощью метода биослойной интерферометрии, как это описано в Примере 6.

В одном аспекте в изобретении раскрыт полипептид, последовательность которого по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, описанной в настоящем документе,

например аминокислотным последовательностям с SEQ ID NO: 1 по 58. В другом аспекте в изобретении раскрыт первый или второй полипептид, последовательность которого по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности, описанной в настоящем документе. В еще одном другом аспекте в изобретении раскрыта молекула полипептида с двойной специфичностью, последовательность которой по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична одной или нескольким аминокислотным последовательностям, описанным в настоящем документе. В изобретении дополнительно раскрыты аспекты, в которых процентная доля идентичности, составляющая по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%, применима к любым последовательностям структурных областей, описанных на Фигуре 1, например, VD1, VR1, Link1, VR2, VD2, Link2 или шарнирной области, и соответствует описанию или является частью последовательностей, предложенных в настоящем описании.

В одном аспекте полипептиды или молекулы полипептидов с двойной специфичностью, описанные в настоящем контексте, могут быть изменены различными способами, включая замены, делеции, усечения и вставки одной или нескольких аминокислот. В другом аспекте полипептиды или молекулы полипептидов с двойной специфичностью, описанные в настоящем контексте, могут включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 или более аминокислотных замен, делеций или вставок. В еще одном другом аспекте полипептиды или молекулы полипептидов с двойной специфичностью, описанные в настоящем

контексте, могут включать 1 – 5, 1 – 10, 1 – 20, 2 – 5, 2 – 10, 5 – 20, 5 – 50 или 10 – 100 аминокислотных замен, делеций или вставок. В одном аспекте 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 или более аминокислотных замен, делеций или вставок применимо к любой из структурных областей, описанных на Фигуре 1, например, VD1, VR1, Link1, VR2, VD2, Link2 или шарнирным областям. В изобретении дополнительно раскрыты аспекты, в которых 1 – 5, 1 – 10, 1 – 20, 2 – 5, 2 – 10, 5 – 20, 5 – 50 или 10 – 100 аминокислотных замен, делеций или вставок применимо к последовательностям любой из структурных областей, описанных на Фигуре 1, например, VD1, VR1, Link1, VR2, VD2, Link2 или шарнирной области, и соответствует описанию или является частью последовательностей, предложенных в настоящем документе.

В одном аспекте 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 или более аминокислот могут быть добавлены в N-конец или C-конец полипептида или молекулы полипептида, описанным в настоящем документе, например, аминокислотные последовательности 1 – 58.

В одном аспекте VD1 может быть по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 28.

В одном аспекте VR1 может быть по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 29.

мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 29.

В одном аспекте LINK1 или LINK2 может быть по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 30.

В одном аспекте VD2 может быть по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 31.

В одном аспекте VR2 может быть по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 32.

В одном аспекте шарнир может быть по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%,

по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. В одном аспекте CH₂ может быть по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В одном аспекте Fc-участок может быть по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичен аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27.

В одном аспекте в изобретении раскрыт полипептид, последовательность которого по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 43, 44, 45 или 46.

В одном аспекте полипептиды или молекулы полипептидов с двойной специфичностью, раскрываемые в данном описании, могут быть

модифицированы путем замены одного или нескольких остатков в различных, возможно селективных, участках по длине полипептидной цепи. Такие замены могут носить консервативный характер, например, когда одна аминокислота заменяется аминокислотой с похожей структурой и характеристиками, так же как при замене гидрофобной аминокислоты на другую гидрофобную аминокислоту. Еще более консервативной будет замена аминокислот одинакового или похожего размера и химического характера, как, например, при замене лейцина на изолейцин. В исследованиях вариаций последовательностей внутри семейств встречающихся в природе гомологичных белков определенные замены аминокислот допускаются чаще, чем другие, и они часто связаны со сходствами по размеру, заряду, полярности и гидрофобности между исходной аминокислотой и ее заменой; и таковой является основа определения «консервативных замен».

В другом предпочтительном варианте осуществления молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением, указанная молекула несет активное вещество или его участок, которое связано или конъюгировано с ней. Указанное активное вещество может быть выбрано из группы, состоящей из поддающейся обнаружению метки, иммуностимулирующей молекулы и терапевтического средства.

Поддающаяся обнаружению метка может быть выбрана из группы, состоящей из биотина, стрептавидина, фермента или его каталитически активного фрагмента, радионуклида, наночастицы, иона парамагнитного металла, или флуоресцентной, фосфоресцентной или хемилюминисцентной молекулы. Поддающиеся обнаружению метки для диагностических целей включают, например, флуоресцентные метки, радиометки, ферменты, зонды нуклеиновых кислот и контрастные вещества.

Терапевтические средства, которые могут ассоциироваться с молекулами по изобретению включают иммуномодуляторы, радиоактивные соединения,

ферменты (например, перфорин), химиотерапевтические вещества (например, цисплатин) или токсин. Другие подходящие терапевтические средства включают низкомолекулярные цитотоксические вещества, т. е. соединения со способностью уничтожать клетки млекопитающих, имеющие молекулярную массу ниже 700 Дальтон. Такие соединения также могут содержать токсичные металлы, способные оказывать цитотоксический эффект. Кроме того, следует понимать, что данные низкомолекулярные цитотоксические вещества также включают пролекарства, т. е. соединения, которые, распадаясь или превращаясь под воздействием физиологических условий, высвобождают цитотоксические вещества. Примеры таких веществ включают цисплатин, производные майтанзина, рачелмицин, рейчелмицин, калихеамицин, доцетаксел, этопозид, гемцитабин, ифосфамид, иринотекан, мелфалан, митоксантрон, сорфимер, натрийфотифрин II, темозоломид, топотекан, триметреат глюкуронат, ауристатин Е, винкристин и доксорубицин; пептидные цитотоксины, т. е. белки или их фрагменты, способные уничтожать клетки млекопитающих. Например, рицин, дифтерийный токсин, бактериальный экзотоксин А псевдомонас, ДНК-азу и РНК-азу; радионуклиды, т. е. нестабильные изотопы элементов, которые распадаются с одновременной эмиссией одной или более α - или β -частиц или γ -лучей. Например, иод 131, рений 186, индий 111, иттрий 90, висмут 210 и 213, актиний 225 и астатин 213; хелатирующие вещества могут быть использованы для упрощения ассоциации данных радионуклидов с молекулами, или их мультимеры; иммуностимуляторы, т.е. иммунные эффекторные молекулы, которые стимулируют иммунный ответ. Например, цитокины, такие как ИЛ-2 и IFN- γ , хемокины, такие как ИЛ-8, фактор тромбоцитов-4, белок-стимулятор роста меланомы, активаторы комплемента; или домены ксеногенных белков, домены аллогенных белков, домены вирусных/бактериальных белков, вирусные/бактериальные пептиды.

Другой аспект настоящего изобретения относится затем к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей первую полипептидную цепь и/или вторую полипептидную цепь, как раскрыто в настоящем документе, или

вектору экспрессии, включающему такую нуклеиновую кислоту. Молекула нуклеиновой кислоты может быть ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинациями. Нуклеотидная последовательность, кодирующая конкретный пептид, олигопептид или полипептид, может быть встречающейся в природе или может быть синтезирована. В целом, сегменты ДНК, кодирующие пептиды, полипептиды и белки данного изобретения, собраны из фрагментов кДНК и коротких олигонуклеотидных линкеров или же из серий олигонуклеотидов для получения синтетического гена, который способен экспрессироваться в рекомбинантной транскрипционной единице, содержащей регуляторные элементы, образованные из микробного или вирусного оперона. Понятие «продукт экспрессии» означает полипептид или белок, являющийся естественным продуктом трансляции гена и любой последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей эквиваленты, образующиеся в результате вырожденности генетического кода и, таким образом, кодирующей ту/те же самую(ые) нуклеиновую(ую) кислоту(ы). Понятие «фрагмент», если относится к кодирующей последовательности, означает участок ДНК, включающий меньше, чем полную кодирующую область, продукт экспрессии которого по существу сохраняет ту же самую биологическую функцию или активность, что и продукт экспрессии целой кодирующей области. В зависимости от предназначенного использования нуклеиновая кислота может быть кодон-оптимизирована для экспрессии в подходящей (например, микробиологической) клетке-хозяине. Избыточность генетического кода позволяет кодирование некоторых аминокислот более чем одним кодоном, однако некоторые конкретные кодоны менее «оптимальны», чем другие, по причине относительной доступности подходящих тРНК, а также других факторов (Gustafsson et al., 2004).

Нуклеиновая кислота может быть, например, ДНК, кДНК, ПНК, РНК или их комбинациями, как одно-, так и/или двухнитевыми; природными или стабилизированными формами полинуклеотидов, такими как, например, полинуклеотиды с фосфоротиоатным остовом, и может содержать или не содержать интроны при условии, что он кодирует полипептидные цепи.

Нуклеиновая кислота (например, ДНК), затем, может входить и/или экспрессироваться в подходящем хозяине с получением полипептида, включающего полипептидную цепь по изобретению. Таким образом, нуклеиновая кислота (например, ДНК), кодирующая полипептидную цепь по изобретению, может быть использована в соответствии с известными методиками, модифицированными соответствующим образом с учетом раскрытых в данном описании идей, для конструирования вектора экспрессии, который затем используется для трансформации подходящей клетки-хозяина для экспрессии и получения полипептида по изобретению, как это известно из уровня техники. Нуклеиновая кислота (например, ДНК, или в случае ретровирусных векторов – РНК), кодирующая полипептидную(ые) цепь(и), представляющую собой соединение по изобретению, может быть присоединена к обширному ряду других последовательностей нуклеиновых кислот (например, ДНК) для введения в соответствующего хозяина. Нуклеиновая кислота-спутник будет зависеть от природы хозяина, способа введения ДНК хозяину и от того, желательно ли поддержание в эписомальной или интеграционной форме. Как правило, нуклеиновая кислота вводится в вектор экспрессии, такой как плаزمид, с соответствующей ориентацией и правильной рамкой считывания для экспрессии. Если необходимо, то нуклеиновая кислота может быть соединена с соответствующими нуклеотидными последовательностями, обеспечивающими координацию транскрипции и трансляции, распознаваемыми желательным хозяином, хотя такие контрольные элементы обычно имеются в векторе экспрессии. Вектор вводится затем хозяину с помощью стандартных способов. Как правило, не все хозяева трансформируются вектором. Поэтому будет необходимо выделить трансформированные клетки-хозяева. Одна из методик отбора включает введение в вектор экспрессии последовательности нуклеиновой кислоты с любыми необходимыми элементами контроля, которая кодирует выбранный признак в трансформированной клетке, такой как устойчивость к антибиотикам. В качестве альтернативы ген для такого выбираемого признака может быть на другом векторе, который используется для

совместной трансформации желаемой клетки-хозяина. Клетки-хозяева, которые были трансформированы рекомбинантной нуклеиновой кислоты по изобретению, культивируют затем в течение достаточного времени и при соответствующих условиях, известных специалистам данной области, с учетом раскрытых в данном описании идей, что ведет к экспрессии полипептида, который после этого может быть выделен.

Известно множество систем экспрессии, включающих бактерии (например, *E. coli* и *Bacillus subtilis*), дрожжи (например, *Saccharomyces cerevisiae*), мицелиальные грибы (например, *Aspergillus spec.*), растительные клетки, клетки животных и насекомых. Предпочтительно, чтобы система была клетками млекопитающих, такими как клетки CHO, имеющимися в наличии в Американской коллекции типовых культур ATCC.

В одном варианте осуществления согласно описанию предложен способ получения молекулы, согласно настоящему описанию, причем способ включает культивацию клетки-хозяина, способной экспрессировать полипептидную(ые) цепь(и) в условиях, подходящих для стимуляции экспрессии указанной(ых) цепи(ей).

В одном аспекте для получения клеток, экспрессирующих молекулы согласно настоящему описанию, нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептидные цепи, включающие домены связывания ТКР-альфа и/или ТКР-бета, клонируют в векторы экспрессии, такие как гамма-ретровирус или -лентивирус. В другом аспекте для получения клеток, экспрессирующих молекулы согласно настоящему описанию, РНК синтезируют с помощью методик, известных из уровня техники, например, транскрипционных систем *in vitro*. Синтезированные *in vitro* РНК затем вводят в подходящие клетки с помощью электропорации в целях экспрессии полипептидных цепей.

Для увеличения уровня экспрессии нуклеиновые кислоты, кодирующие цепи согласно настоящему описанию, могут быть функционально связаны с сильными промоторами, такими как длинные терминальные повторы

ретровируса (LTR), цитомегаловируса (CMV), вируса стволовых клеток мыши (MSCV) U3, фосфоглицерат-киназой (PGK), β -актином, убиквитином и комбинированным промотором вируса обезьян 40 (SV40)/CD43, фактором элонгации (EF)-1a и промотором вируса некроза селезёнки (SFFV). В предпочтительном варианте осуществления промотор является гетерологичным по отношению к экспрессируемой нуклеиновой кислоте. В дополнение к сильным промоторам экспрессионные кассеты согласно настоящему описанию могут содержать дополнительные элементы, которые могут усиливать экспрессию трансгена, включая центральный полипуриновый тракт (сPPT), который способствует ядерной транслокации лентивирусных конструкций (Follenzi et al., 2000), и пост-транскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (wPRE), который повышает уровень экспрессии трансгена за счет увеличения стабильности РНК (Zufferey et al., 1999) (Zufferey et al., 1999).

Альфа- и бета-цепи домена связывания молекулы по настоящему изобретению могут кодироваться нуклеиновыми кислотами, локализованными в отдельных векторах, или могут кодироваться полинуклеотидами, локализованными в одном и том же векторе.

В одном варианте осуществления клетка-хозяин генетически модифицирована, чтобы экспрессировать молекулу согласно настоящему описанию. Клетки-хозяева согласно настоящему описанию могут быть аллогенными или аутологичными в отношении пациента, подлежащего лечению.

В еще одном другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей молекулу полипептида с двойной специфичностью в соответствии с настоящим изобретением, нуклеиновую(ые) кислоту(ы) или вектор(ы) экспрессии в соответствии с настоящим изобретением, или клетку в соответствии с настоящим изобретением вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями или вспомогательными веществами.

Композиции по изобретению могут включать нерасфасованные композиции лекарственных средств, пригодные для производства фармацевтических композиций (например, неочищенных или нестерильных композиций) и фармацевтических композиций (т. е., композиций, которые подходят для введения субъекту или пациенту), которые могут быть использованы в получении единичных лекарственных форм. Такие композиции включают профилактически или терапевтически эффективное количество молекулы полипептида (вещества) с двойной специфичностью для профилактических и/или терапевтических целей, раскрытой в настоящем контексте, или комбинацию вещества и фармацевтически приемлемого носителя. Предпочтительно, если композиции по изобретению включают профилактически или терапевтически эффективное количество одного или нескольких видов молекул по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтические композиции предпочтительно включают молекулы либо в свободной форме, либо в виде соли. Предпочтительно, если соли являются фармацевтически приемлемыми солями молекул, такими как, например, хлорид или ацетат (трифторацетат). Следует заметить, что соли молекул в соответствии с настоящим изобретением существенно отличаются от молекул в их состоянии(ях) *in vivo*, так как молекулы не являются солями *in vivo*.

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится, таким образом, к не встречающейся в природе молекуле в соответствии с изобретением, которая получена синтетическим способом (например, синтезирована) в виде фармацевтически приемлемой соли. Способы синтетического получения пептидов и/или полипептидов хорошо известны в данной области. Соли молекул в соответствии с настоящим изобретением существенно отличаются от молекул по своему состоянию(ям) *in vivo*, так как синтезированные молекулы не являются солями *in vivo*. Предпочтительно, если соли являются фармацевтически приемлемыми солями молекул. Соли в соответствии с изобретением включают щелочные

и щелочноземельные соли, такие как соли рядов Гофмейстера, включающие в качестве анионов PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- и в качестве катионов NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} и Ba^{2+} . В частности, соли выбраны из $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , RbH_2PO_4 , Rb_2SO_4 , $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$, Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , KClO_4 , KI , KSCN , Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , NaCH_3COO , NaCl , NaBr , NaNO_3 , NaClO_4 , NaI , NaSCN , ZnCl_2 , Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , CsCH_3COO , CsCl , CsBr , CsNO_3 , CsClO_4 , CsI , CsSCN , Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , LiCH_3COO , LiCl , LiBr , LiNO_3 , LiClO_4 , LiI , LiSCN , Cu_2SO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, Mg_2SO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MgCl_2 , MgBr_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, MgI_2 , $\text{Mg}(\text{SCN})_2$, MnCl_2 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Ca_2HPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CaCl_2 , CaBr_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, CaI_2 , $\text{Ca}(\text{SCN})_2$, $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$, Ba_2HPO_4 , $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, BaSO_4 , $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, BaCl_2 , BaBr_2 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$, BaI_2 и $\text{Ba}(\text{SCN})_2$. Особенно предпочтительными являются ацетат NH, MgCl_2 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , KCl , NaCl и CaCl_2 , такие как например, хлоридные или ацетатные (трифторацетатные) соли.

В одном аспекте полипептид, описываемый в настоящем контексте, представлен в форме фармацевтически приемлемой соли. В другом аспекте полипептид представлен в форме фармацевтической соли в кристаллической форме.

В одном аспекте фармацевтически приемлемая соль, описываемая в настоящем контексте, относится к солям, имеющим профили токсичности в диапазоне, который приемлем для фармацевтического применения.

Используемое в контексте данного изобретения понятие «фармацевтически приемлемая соль» относится к производным раскрытых пептидов, причем пептид модифицирован путем получения кислых или основных солей вещества. Например, кислые соли получают из свободного основания (как

правило, где нейтральная форма лекарственного средства имеет нейтральную группу $-NH_2$) с применением реакции с подходящей кислотой. Подходящие кислоты для получения кислых солей включают как органические кислоты, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, яблочную кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, малеиновую кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, п-толуолсульфо кислоту, салициловую кислоту и подобные, так и неорганические кислоты, например, соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и тому подобные. И наоборот, приготовление основных солей кислотных компонентов, которые могут присутствовать на пептиде, производится при использовании фармацевтически приемлемого основания, такого как гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид аммония, гидроксид кальция, триметиламин и тому подобных.

В одном аспекте фармацевтически приемлемые соли могут повышать растворимость и/или стабильность пептидов, описываемых в настоящем контексте. В другом аспекте фармацевтические соли, описываемые в настоящем контексте, могут быть получены обычными средствами из соответствующего пептида-носителя или комплекса с помощью реакции, например, подходящей кислоты или основания с пептидами или комплексами, описываемыми в настоящем контексте. В другом аспекте фармацевтически приемлемые соли представлены в кристаллической или полукристаллической форме. В еще в одном аспекте фармацевтически приемлемые соли могут включать, например, те соли, что описаны в работе «Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use» авторов P. H. Stahl и C. G. Wermuth (Wiley-VCH 2002) и L. D. Bighley, S. M. Berge, D. C. Monkhouse, в «Encyclopedia of Pharmaceutical Technology». под редакцией J. Swarbrick and J. C. Boylan, Vol. 13, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel,

Hong Kong 1995, стр. 453-499, каждая из этих ссылок включена в настоящую заявку ссылкой в ее полном объеме.

Изобретение также включает фармацевтические композиции, включающие молекулу полипептида с двойной специфичностью по изобретению и терапевтическое антитело (например, опухолеспецифическое моноклональное антитело), специфичное к конкретному раковому антигену, и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном конкретном варианте осуществления понятие «фармацевтически приемлемый» означает одобренный надзорным органом федерального правительства или штата или находящийся в перечне фармакопеи США или других общепризнанных фармакопей для применения у животных, в частности, у человека. Понятие «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, вспомогательному веществу или средству доставки, вместе с которым вводится терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут быть стерильными жидкостями, такими как вода и масла, включая получаемые из углеводов, животного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное. Вода является предпочтительным носителем, если фармацевтическая композиция вводится внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина могут также использоваться в качестве жидких носителей, в частности, для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, фосфат натрия, ацетат натрия, L-гистидин, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и тому подобное. Композиция при необходимости также может содержать небольшие количества смачивающих или эмульгирующих веществ или pH-регулирующих веществ. Такие композиции могут быть в форме растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов пролонгированного высвобождения и тому подобного.

Как правило, ингредиенты композиций по изобретению поставляются либо в отдельности, либо в смешанном виде в единичной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или обезвоженного концентрата в герметически укупоренном контейнере, таком как ампула или пакетик «саше», с указанием количества активного вещества. Если композиция предназначена для введения с помощью инфузии, она может быть разведена в бутылки для инфузий, содержащей стерильную воду или физиологический раствор фармацевтического качества. Если композиция предназначена для введения с помощью инъекции, может быть предоставлена ампула стерильной воды для инъекций или физиологический раствор, чтобы ингредиенты можно было смешать до введения.

Другой аспект настоящего изобретения относится затем к молекуле полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением, нуклеиновой кислоте или вектору экспрессии в соответствии с изобретением, клетке в соответствии с изобретением, или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением для применения в медицине. Как правило, применение молекулы полипептида с двойной специфичностью зависит от особенностей медицинского применения пептидного(ых) антигена(ов), который(ые) распознается(ются) указанной молекулой, как это далее описано.

Предпочтительной является молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением, нуклеиновая кислота или вектор экспрессии в соответствии с изобретением, или клетка в соответствии с изобретением, или фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением для применения в лечении или предупреждении заболевания или нарушения, выбранных из: иммунологические нарушения, инфекционное заболевание, интоксикация и рак, включая лечение или предупреждение ряда раковых заболеваний или других аномальных пролиферативных состояний, включая (но без ограничения) следующие: карцинома, включая карциному мочевого пузыря,

молочной железы, толстой кишки, почки, печени, легких, яичника, поджелудочной железы, желудка, предстательной железы, шейки матки, щитовидной железы и кожи; включая плоскоклеточную карциному; опухоли кроветворной системы лимфоидного происхождения, включая острый лимфобластный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, лимфому Беркитта; опухоли кроветворной системы миелоидного происхождения, включая острый и хронический миелогенные лейкозы и промиелоцитарный лейкоз; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; другие опухолевые заболевания, включая меланому, семиному, тератоканциному, нейробластому и глиому; опухолевые заболевания центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, нейробластому, глиому, шванномы и остеосаркому; и другие опухолевые заболевания, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, семиному, фолликулярный рак щитовидной железы и тератоканциному. Дополнительные виды рака могут включать фолликулярные лимфомы, карциномы с мутацией p53, гормон-зависимые опухоли молочной железы, предстательной железы и яичника и предраковые поражения, такие как семейный аденоматозный полипоз и миелодиспластические синдромы, но не ограничиваясь ими. В конкретных вариантах осуществления лечение или предупреждение злокачественного заболевания или диспролиферативных изменений (таких как метаплазия и дисплазия) или гиперпролиферативных нарушений осуществляется с помощью способов и композиций согласно изобретению в яичнике, мочевом пузыре, молочной железе, толстой кишке, легких, коже, поджелудочной железе или матке. В других конкретных вариантах осуществления лечение или предупреждение саркомы, меланомы или лейкоза осуществляется с помощью способов и композиций согласно изобретению.

Изобретение также относится к способам вызывания иммунного ответа у пациента или субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества молекулы полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением или фармацевтической

композиции в соответствии с изобретением. В одном аспекте популяция молекулы полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением или фармацевтическая композиция в соответствии с изобретением вводится пациенту или субъекту, нуждающемуся в них.

Изобретение далее относится к способу уничтожения клеток-мишеней у пациента или субъекта, включающему введение пациенту эффективного количества молекулы полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением.

В изобретении также предложены способы предупреждения, лечения или контролирования одного или нескольких симптомов, ассоциированных с нарушением воспалительного характера у субъекта, дополнительно включающие введение указанному субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества одного или нескольких противовоспалительных веществ согласно изобретению. В изобретении также предложены способы предупреждения, лечения или контролирования симптомов, ассоциированных с аутоиммунным заболеванием, дополнительно включающие введение указанному субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества одного или нескольких иммуномодулирующих веществ согласно изобретению. Инфекционные заболевания, которые поддаются лечению или предупреждению с помощью молекул по изобретению, вызваны возбудителями инфекций, включая вирусы, бактерии, грибы, одноклеточные организмы и вирусы, но не ограничиваясь ими. Вирусные заболевания, лечение или предупреждение которых возможно с помощью молекул по изобретению в сочетании со способами настоящего изобретения включают вызванные вирусом гепатита А, гепатита В, гепатита С, гриппа, ветряной оспы, аденовирусом, вирусом простого герпеса I типа (ВПГ-I), вирусом простого герпеса II типа (ВПГ-II), чумы рогатого скота, риновирусом, эховирусом, ротавирусом, синцитиальным респираторным вирусом, папилломавирусом, паповавирусом, цитомегаловирусом, эхиновирусом, арбовирусом, хантавирусом, энтеровирусом Коксаки,

вирусом свинки, вирусом кори, вирусом краснухи, полиовирусом, вирусом оспы, вирусом Эпштейна-Барра, вирусом иммунодефицита человека I (ВИЧ-I), вирус иммунодефицита человека II (ВИЧ-II), но не ограничиваясь ими, и возбудителями вирусных заболеваний, таких как вирусный менингит, энцефалит, денге или оспа, но не ограничиваясь ими.

Бактериальные заболевания, лечение или предупреждение которых возможно с помощью молекул по изобретению в сочетании со способами настоящего изобретения включают те, что вызваны бактериями, включая микобактерии, риккетсиями, микоплазмы, бактерии семейства *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (боррелиоз Лайма), *Bacillus anthracis* (сибирская язва), столбнячные палочки, стрептококк, стафилококк, микобактерии, столбнячные палочки, бактерии, вызывающие коклюш, холеру, чуму, дифтерию, хламидии, бактерии семейства *S. aureus* и легионеллы, но не ограничиваясь ими.

Протозойные болезни, лечение или предупреждение которых возможно с помощью молекул по изобретению в сочетании со способами настоящего изобретения, которые вызваны простейшими организмами, включают лейшманию, кокцидиоз, трипаномы или малярию, но не ограничиваясь ими. Паразитарные болезни, лечение или предупреждение которых возможно с помощью молекул по изобретению в сочетании со способами настоящего изобретения, которые вызваны паразитами, включают хламидиоз и риккетсиоз, но не ограничиваясь ими.

Примеры возбудителей инфекций и инфекционные заболевания включают, но без ограничения, бактерии (например, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*), патоген (например, В-лимфотропный паповавирус (ЛПВ); коклюшная палочка; вирус болезни Борна (BDV); коронавирус крупного рогатого скота; вирус хориоменингита; вирус денге; вирус, *E. coli*; эбола; эховирус 1; эховирус-11 (EV); эндотоксин (LPS); энтеробактерии; энтероорфанный вирус;

энтеровирусы; вирусный лейкоз кошек; вирус ящура; вирус лейкоза гиббонов (GALV); грамотрицательные бактерии; *Helicobacter pylorii*; вирус гепатита В (HBV); вирус простого герпеса ; ВИЧ-I; цитомегаловирус человека; короновирус человека; вирус гриппа А, В и С; легионеллы; лейшмания мексиканская; листериоз; вирус кори; менингококки; морбилливирусы; вирус гепатита мышей; вирус лейкоза мышей; гамма-герпесвирус мышей; ретровирус мышей; коронавирус мышей, вирус гепатита мышей; микобактериальный комплекс М; гонококки; вирус псевдочумы птиц; парвовирус В 19; простейшие рода *Plasmodium falciparum*; поксвирус; синегнойная палочка; ротавирус; *Salmonella typhiurium*; шигеллы; стрептококки; лимфотропный Т-клеточный вирус 1; вирус коровьей оспы).

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу лечения заболевания или нарушения, включающему введение терапевтически эффективного количества молекулы полипептида с двойной специфичностью в соответствии с изобретением, нуклеиновой кислоты или вектора экспрессии в соответствии с изобретением, клетки в соответствии с изобретением, или фармацевтической композиции в соответствии с изобретением.

Молекула полипептида с двойной специфичностью по изобретению может применяться в способе предупреждения или лечения заболевания или состояния, интенсивность симптомов которого уменьшается за счет введения молекулы полипептида с двойной специфичностью. Такие лекарственные средства могут быть представлены в виде фармацевтической композиции вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями или вспомогательными веществами. Молекулы полипептидов с двойной специфичностью для терапевтических целей обычно поставляются как часть стерильной фармацевтической композиции, которая обычно включает фармацевтически приемлемый носитель. Эта фармацевтическая композиция может быть представлена любой подходящей формой, (в

зависимости от желаемого способа введения пациенту). Она может быть представлена в виде единичной лекарственной формы, обычно предоставляется в герметичном контейнере и может быть представлена как часть комплекта. Такой комплект обычно (хотя это не обязательно) содержит инструкцию по применению. Он может содержать множество указанных единичных лекарственных форм. Фармацевтическая композиция может быть приспособлена для введения любым подходящим способом, таким как парентеральный (включая подкожный, внутримышечный или внутривенный) способ. Такие композиции могут быть получены любым способом, известным из уровня техники фармацевтики, например, за счет смешивания активного ингредиента с носителем(ами) или вспомогательным(и) веществом(ами) в стерильных условиях.

В одном аспекте пептиды или другие молекулы, описанные в настоящем контексте, могут комбинироваться с водным носителем. В одном аспекте водный носитель выбирают из: ионообменное вещество, оксид алюминия, стеарат алюминия, стеарат магния, лецитин, сывороточные белки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, соли или электролиты, такие как протаминсульфат, двузамещенный фосфорнокислый натрий, дикальция фосфат, дикалия гидрофосфат, хлорид натрия, соли цинка, коллоидная двуокись кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, поливинилпирролидон-винилацетат, вещества на основе целлюлозы (например, микрокристаллическая целлюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, сукцинат ацетата гидроксипропилметилцеллюлозы, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы), крахмал, моногидрат лактозы, маннит, трегалоза, лаурилсульфат натрия и кроскармеллоза натрия, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлоза натрия, полиакрилаты, полиметакрилат, воски, полиэтилен-полиоксипропилен-блок-сополимеры, полиэтиленгликоль и ланолин.

В одном аспекте водный носитель содержит множество компонентов, таких как вода, вместе с компонентом в виде неводного носителя, таким как описанные в настоящем документе. В другом аспекте водный носитель способен обеспечивать улучшенные свойства в комбинации с пептидом или другой молекулой, описанными в настоящем документе, например, улучшенную растворимость, активность и/или улучшенные иммунотерапевтические свойства. Помимо того, композиция может содержать вспомогательные вещества, такие как буферы, связующие агенты, балластные вещества, разбавители, ароматизаторы, смазочные вещества и т. д. «Фармацевтически приемлемый разбавитель», например, может включать растворители, объемообразующие агенты, стабилизаторы, дисперсионные среды, вещества для покрытия оболочкой, антибактериальные и противогрибковые вещества, изотонические вещества и вещества, задерживающие всасывание и т. п., обладающие физиологической совместимостью. Примеры фармацевтически приемлемых разбавителей включают один или несколько физиологический раствор, физиологических растворов с фосфатным буфером, декстрозу, глицерин, этанол и т. п., а также их комбинации. Во многих случаях будет предпочтительно включить в состав одно или несколько изотонических веществ, например, сахара, такие как трегалоза и сахароза, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбитол или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые вещества, такие как смачивающие вещества или небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие вещества, консерванты или буферы, также входят в объем настоящего изобретения. Помимо этого, композиция может содержать вспомогательные вещества, такие как буферы, связующие агенты, балластные вещества, разбавители, ароматизаторы и смазывающие вещества.

Дозировки молекул полипептидов с двойной специфичностью согласно настоящему изобретению могут варьироваться в широких пределах в зависимости от заболевания или нарушения, подлежащего лечению, возраста и состояния индивида, подлежащего лечению и т. д.; например,

подходящий диапазон дозировки для молекулы полипептида с двойной специфичностью может быть между 25 нг/кг и 50 мкг/кг. Врач в конечном итоге определяет подходящую дозировку для использования.

Фармацевтические композиции, векторы, нуклеиновые кислоты и клетки по изобретению могут быть предложены в по существу чистой форме, например, чистыми по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%.

Предпочтительные характеристики каждого аспекта изобретения относятся и к каждому из других аспектов с учетом необходимых изменений. Документы из уровня техники, упоминаемые в настоящем документе, включены в их полном объеме, в той степени, в которой это разрешено законом. Несмотря на то, что настоящее изобретение и его преимущества подробно описаны, следует понимать, что могут быть осуществлены различные изменения, замены и модификации, не выходящие за рамки сущности и объема данного изобретения, как это определено в прилагающихся пунктах формулы изобретения. Настоящее изобретение будет проиллюстрировано далее с помощью последующих примеров, которые даны исключительно в целях иллюстрации и ни в коей мере не направлены на ограничение объема изобретения.

На Фигуре 1 представлена краткая обзорная схема предпочтительного варианта осуществления настоящего изобретения молекулы полипептида с двойной специфичностью, содержащей Fc IgG1 человека. VD1, VD2 = переменные домены, полученные из антитела; VR1, VR2 = переменные домены, полученные из ТКР; Link1, Link2 = соединительные линкеры; Cys-Cys = цистеиновые мостики.

На Фигуре 2 представлена краткая обзорная схема 4 различных конструкций молекул полипептидов с двойной специфичностью, содержащих Fc IgG человека, прошедших испытания в контексте настоящего изобретения. Черный = образованные из ТКР вариабельные домены; светло-серый = образованные из антител вариабельные домены; белый = константные домены, образованные из молекулы IgG человека. Мутации «выступ-во-впадину» представлены в виде цилиндра. Молекулы диател IA-ID в соответствии с изобретением.

На Фигуре 3 представлен анализ методом эксклюзионной ВЭЖХ различных биспецифических молекул ТКР/mAb с молекулярной структурой в соответствии с конструкциями, представленными на Фигуре 2, которые были очищены с помощью 2-колоночного процесса очистки. Содержание мономера различных молекул было определено следующим образом. II: 93,84%; III: 96,54%; IV: 98,49%; IA_1: 95,48%; IA_3: 98,45%; ID_1: 95,75%; IC_4: 95,22%; IC_5: 92,76%; ID_4: 99,31%; ID_5: 99,44%.

На Фигуре 4 представлены результаты анализа активности для различных биспецифических конструкций ТКР/mAb (как показано на Фигуре 2), сконструированных как молекулы на основе IgG4. Клетки линии Jurkat_NFATRE_luc2 инкубировали совместно с нагруженными ВИЧ-пептидом SLYNTVATL (SEQ ID No. 7) клетками T2 в присутствии возрастающих концентраций биспецифических молекул ТКР (bssТКР). Биспецифическая молекула ТКР/mAb-диател IA-IgG4 проявляла более высокую активность, чем две альтернативные молекулы ТКР/mAb с двойной специфичностью.

На Фигуре 5 представлены результаты анализа активности для различных биспецифических конструкций ТКР/mAb (как показано на Фигуре 2), сконструированных как молекулы на основе IgG1. Клетки линии Jurkat_NFATRE_luc2 инкубировали совместно с нагруженными ВИЧ-пептидом SLYNTVATL (SEQ ID No. 7) клетками T2 в присутствии возрастающих концентраций биспецифических молекул ТКР (bssТКР).

Биспецифические молекулы ТКР/mAb-диатело ID_1, IA_3 и IA1 проявляли значительно более высокую активность, чем три альтернативные молекулы ТКР/mAb-диатело с двойной специфичностью.

На Фигуре 6 представлены результаты анализа активности, проведенные для различных биспецифических конструкций ТКР/mAb на основе IgG1 (как показано на Фигуре 2), при использовании различных переменных доменов антител, оба из которых нацелены на комплекс ТКР-CD3. Конструкция ID_1 включает переменные домены антитела UCHL1(V9), нацеленного на CD3, где конструкции ID_4 и ID_5 включают переменные домены альфа/бета ТКР-специфического антитела BMA031. Клетки линии Jurkat_NFATRE_luc2 инкубировали совместно с нагруженными ВИЧ-пептидом SLYNTVATL (SEQ ID No. 7) клетками T2 в присутствии возрастающих концентраций биспецифических молекул ТКР (bssTKP).

На Фигуре 7 представлена краткая обзорная схема возможных ориентаций доменов VD и VR в молекулах по настоящему изобретению. VH: VH-домен, образованный из антитела, VL: VL-домен, образованный из антитела; V α : образованный из ТКР V-альфа; V β : образованный из ТКР V-бета.

На Фигуре 8 представлены результаты анализа методом эксклюзионной ВЭЖХ агрегатов (HMWS – высокомолекулярных фракций) среди различных биспецифических молекул ТКР/mAb на основе молекул IgG1. Агрегаты анализировали после очистки и после хранения молекул при 40°C в течение 1 недели и 2 недель, соответственно.

На Фигуре 9 представлены результаты анализа активности, проведенного для различных биспецифических молекул ТКР/mAb на основе молекул IgG1. Активность анализировали после очистки и после хранения молекул при 40°C в течение 1 недели и 2 недель, соответственно. Хранение в условиях стресса при 40°C не привело к существенной потере активности молекул, но для молекул III и IV было обнаружено резкое повышение

неспецифической (т. е. мишень-независимой) активации Т-клеток линии Jurkat.

На Фигуре 10 представлены результаты анализа высвобождения лактатдегидрогеназы для различных биспецифических конструкций ТКР/mAb (как показано на Фигуре 2), сконструированных как молекулы на основе IgG1. МКПК, выделенные у здорового донора, инкубировали совместно с нагруженными ВИЧ-пептидом SLYNTVATL (SEQ ID No. 7) клетками T2 в присутствии возрастающих концентраций биспецифических молекул ТКР (bssТКР). Биспецифические молекулы ТКР/mAb-диатело IA_3 и ID_1 вызывали значительно более сильный лизис клеток-мишеней, чем три альтернативные молекулы ТКР/mAb-диатело с двойной специфичностью. Как показано на графике с правой стороны, ни одна из проанализированных биспецифических конструкций ТКР/mAb не вызывала поддающегося обнаружению лизиса T2-клеток, нагруженных нерелевантным пептидом (SEQ ID No. 49).

На Фигуре 11 представлены результаты анализа высвобождения лактатдегидрогеназы для биспецифической конструкции ТКР/mAb-диатело IA_5, мишенью которого является опухолеассоциированный пептид PRAME-004 (SEQ ID No. 49), презентируемый на HLA-A*02. CD8-положительные Т-клетки, выделенные у здорового донора, инкубировали совместно с линиями раковых клеток UACC-257, SW982 и U2OS, презентирующих различные количества комплексов пептида PRAME-004 и HLA-A*02-1 на клеточной поверхности (прибл. 1100, прибл. 770 и прибл. 240 копий на клетку, соответственно, как было определено с помощью метода МС) при соотношении эффекторов к мишеням 5:1 в присутствии возрастающих концентраций молекул ТКР/mAb-диатело. Через 48 совместного культивирования проводили количественное определение лизиса клеток-мишеней при использовании анализа высвобождения лактатдегидрогеназы в соответствии с инструкциями производителя (Promega).

На Фигуре 12 представлены результаты анализа высвобождения лактатдегидрогеназы для биспецифических конструкций ТКР/mAb-диатело IA_5 и IA_6 при использовании ТКР с созревшей стабильностью/аффинностью и их улучшенной версии, соответственно, к опухолеассоциированному пептиду PRAME-004 (SEQ ID No. 49), презентiruемому на HLA-A*02. CD8-положительные Т-клетки, выделенные у здорового донора, инкубировали совместно с линией раковых клеток U2OS, презентiruющих приibl. 240 копий на клетку комплексов PRAME-004:HLA-A*02-1, или не нагруженные Т2-клетки (соотношение эффекторов к мишеням 5:1) в присутствии возрастающих концентраций молекул ТКР/mAb-диатело. Через 48 совместного культивирования проводили количественное определение лизиса клеток-мишеней при использовании анализа высвобождения лактатдегидрогеназы в соответствии с инструкциями производителя (Promega).

На Фигуре 13 представлены результаты изучения стабильности в условиях термического стресса для конструкций ТКР/mAb-диатело IA_5 и IA_6 при использовании ТКР с созревшей стабильностью/аффинностью и их улучшенной версии, соответственно, к опухолеассоциированному пептиду PRAME-004 (SEQ ID No. 49), презентiruемому на HLA-A*02. В этих целях белки переводили в лекарственную форму в PBS с концентрацией 1 мг/мл и затем хранили при 40°C в течение двух недель. Целостность и степень извлечения белка оценивали с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Так количество высокомолекулярных фракций определяли в соответствии с процентным значением площади пика, элюированного до основного пика. Степень извлечения мономерного белка подсчитывали, сравнивая площади основного пика образцов, не подвергавшихся и подвергавшихся стрессовому воздействию.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1:

Конструирование Fc-содержащих биспецифических ТКР/mAb-диател и контрольных молекул.

Fc-содержащие биспецифические ТКР/mAb-диатела и контрольные молекулы (как показано на Фигуре 2) были сконструированы для специфического связывания с комплексом ТКР-CD3 человека и комплексом пептида и молекулы МНС, включающих полученный из ВИЧ пептид SLYNTVATL (SQ ID No. 7), связанный с молекулой HLA-A2*01. Для нацеливания на комплекс ТКР-CD3 использовали домены VH и VL, полученные из CD3-специфического, гуманизированного антитела hUCHT1(V9), описанного в работе Zhu и соавт. (Identification of heavy chain residues in a humanized anti-CD3 antibody important for efficient antigen binding and T cell activation. *J Immunol*, 1995, 155, 1903–1910), или домены VH и VL, полученные из альфа-/бета-ТКР-специфического антитела BMA031, описанного в работе Shearman и соавт. (Construction, expression and characterization of humanized antibodies directed against the human alpha/beta T cell receptor. *J Immunol*, 1991, 147, 4366-73), и используемый в гуманизированной версии вариант 10 (собственные данные). Для нацеливания на комплекс пептида и молекулы МНС использовали домены V-альфа и V-бета описанного ранее одноцепочечного Т-клеточного рецептора 868Z11 человека с созревшей стабильностью/аффинностью, раскрытого в работе Aggen и соавт. (Identification and engineering of human variable regions that allow expression of stable single-chain T cell receptors. *PEDS*, 2011, 24, 361 – 372).

В случае Fc-содержащих биспецифических ТКР/mAb-диател последовательности ДНК, кодирующие различные комбинации VH и VL (соответствующие VD1 и VD2, соответственно) и Va и Vb (соответствующие VR1 и VR2, соответственно), а также кодирующие линкеры Link1 и Link2, были получены с помощью генетического синтеза. Полученные в результате последовательности ДНК клонировали в рамке в векторы экспрессии, кодирующие шарнирную область, CH2- и CH3-домен, полученный из IgG4 человека [код доступа №: K01316] и IgG1 человека [код доступа №: P01857], соответственно, и были далее генетически

модифицированы. Генетические модификации осуществляли в целях внедрения мутаций типа «выступ-во-впадину» в CH3-домены с дополнительной межцепочечной стабилизацией за счет дисульфидной связи и без нее; в целях удаления сайта N-гликозилирования в CH2 (например, мутация N297Q); в целях введения мутаций сайленсинга гена Fc; в целях введения, для дополнительной стабилизации, дисульфидной связи в VL и VH, соответственно, согласно способам, описанным в работе Reiter и соавт. (Stabilization of the Fv Fragments in Recombinant Immunotoxins by Disulfide Bonds Engineered into Conserved Framework Regions. *Biochemistry*, 1994, 33, 5451 – 5459). Обзор полученных биспецифических ТКР/mAb-диател, их варианты, а также соответствующие последовательности представлены в Таблице 1.

Таблица 1: Обзор всех полученных и оцененных Fc-содержащих биспецифических ТКР/mAb-диател:

KiH: «выступ-во-впадину»; K/O: сайленсинг гена Fc; KiH-ds: «выступ-во-впадину» со стабилизацией за счет искусственной дисульфидной связи для соединения CH3 и CH3'; ds-hUCHT1(V9): со стабилизацией за счет дисульфидной связи переменных доменов hUCHT1(V9); Link1: линкер, соединяющий VR1 и VD1.

Молекула	ТКР	Моноклональное антитело	SEQ ID	модификации
IA-IgG4	868Z11	hUCHT1(V9)	SEQ ID No. 8 SEQ ID No. 9	IgG4 (KiH)
IA_1	868Z11	hUCHT1(V9)	SEQ ID No. 10 SEQ ID No. 11	IgG1 (K/O, KiH)
IA_2	868Z11	hUCHT1(V9)	SEQ ID No. 12	IgG1 (K/O, KiH-ds)

			SEQ ID No. 13	
IA_3	868Z11	ds-hUCHT1(V9)	SEQ ID No. 14 SEQ ID No. 15	IgG1 (K/O, KiH-ds)
ID_1	868Z11	ds-hUCHT1(V9)	SEQ ID No. 16 SEQ ID No. 17	IgG1 (K/O, KiH-ds)
IC_4	868Z11	hBMA031(var10)	SEQ ID No. 18 SEQ ID No. 19	IgG1 (K/O, KiH-ds)
IC_5	868Z11	hBMA031(var10)	SEQ ID No. 20 SEQ ID No. 21	удлиненный Link1 IgG1 (K/O, KiH-ds)
ID_4	868Z11	hBMA031(var10)	SEQ ID No. 22 SEQ ID No. 23	IgG1 (K/O, KiH-ds)
ID_5	868Z11	hBMA031(var10)	SEQ ID No. 24 SEQ ID No. 25	удлиненный Link1 IgG1 (K/O, KiH-ds)
IA_5	R16P1C10I	hUCHT1(Var17)	SEQ ID No. 43 SEQ ID No. 44	IgG1 (K/O, KiH-ds)
IA_6	R16P1C10I#6	hUCHT1(Var17)	SEQ_ID No. 45	IgG1 (K/O, KiH-ds)

			SEQ ID No. 46	
--	--	--	------------------	--

Были сконструированы различные контрольные молекулы, обладающие такой же специфичностью, Таблица 2, с использованием указанных доменов VH, VL, V-альфа и V-бета в комбинациях с полученными из молекул IgG1 или IgG4 константными доменами, имеющими генетически модифицированные характеристики, описанные выше.

Таблица 2: Обзор всех полученных и оцененных Fc-содержащих биспецифических контрольных молекул:

KiH: «выступ-во-впадину»; K/O: сайленсинг гена Fc.

Молекула	TKP	Моноклональное антитело	SEQ ID	модификации
III-IgG4	868Z11	hUCHT1(V9)	SEQ ID No. 38 SEQ ID No. 39	IgG4 (KiH)
IV-IgG4	868Z11	hUCHT1(V9)	SEQ ID No. 40 SEQ ID No. 41	IgG4
II	868Z11	hUCHT1(V9)	SEQ ID No. 33 SEQ ID No. 34	IgG1 (K/O, KiH)
III	868Z11	hUCHT1(V9)	SEQ ID No. 35 SEQ ID No. 36	IgG1 (K/O, KiH)
IV	868Z11	hUCHT1(V9)	SEQ ID No. 37	IgG1 (K/O)

			SEQ ID No. 42	
--	--	--	------------------	--

ПРИМЕР 2:

Получение и очистка Fc-содержащих биспецифических ТКР/mAb-диател

Векторы для экспрессии рекомбинантных белков были сконструированы как моноцистронные, контролируемые образованными из цитомегаловируса человека (HCMV) элементами промотора, производными pUC19. Плазмидную ДНК амплифицировали в *E.coli* в соответствии со стандартными методиками культивации и затем производили очистку с помощью имеющихся в продаже наборов (Macherey & Nagel). Очищенную плазмидную ДНК использовали для временной трансфекции клеток штамма CHO-S согласно инструкциям производителя (ExpiCHO™ system; Thermo Fisher Scientific). Трансфицированные клетки CHO культивировали в течение 6–14 дней при 32°C–37°C с одной-двумя добавками питательного раствора ExpiCHO™ Feed.

Сбор кондиционированного клеточного супернатанта проводили с помощью центрифугирования (4000 x *g*; 30 минут) и осветляли фильтрацией (0,22 мкм). Биспецифические молекулы очищали при использовании системы жидкостной хроматографии быстрого разрешения Äkta Pure 25 L FPLC (GE Lifesciences), снабженной оборудованием для проведения одновременной аффинной и эксклюзионной хроматографии. Аффинную хроматографию проводили на колонках Protein A (GE Lifesciences), соблюдая стандартные протоколы для проведения аффинной хроматографии. Эксклюзионную хроматографию проводили сразу же после элюирования (pH 2,8) из аффинной колонки с получением мономерного белка высокой степени очистки с помощью системы Superdex 200 pg на колонках 16/600 (GE Lifesciences), соблюдая стандартные протоколы. Концентрации белка определяли на системе NanoDrop (Thermo Scientific) при использовании подсчитанных коэффициентов экстинкции в

соответствии с предсказанными последовательностями белка. Концентрирование, если необходимо, и обмен буферами производили с помощью устройств Vivaspin (Sartorius). Наконец, очищенные молекулы хранили в физиологическом растворе с фосфатным буфером с концентрацией около 1 мг/мл при температуре 2–8°C.

Поскольку белки для терапевтического применения должны обладать приемлемой стабильностью при воздействии кислоты, для обеспечения устойчивых процессов промышленной очистки проводили оценку процентного соотношения мономерного белка, элюируемого из поглотительной колонки Protein A (Таблица 3). Очевидно, что введение в молекулы стабилизирующих мутаций, а также выбор определенных ориентаций доменов связывания значительно влияют на стабильность при воздействии кислоты.

Таблица 3: Фракция мономерного белка после элюции кислотой из поглотительной колонки:

Молекула	Мономер, элюируемый из поглотительной колонки (% всей площади пика)
IA-IgG4 (VH-бета)	н. о.
IA_1 (VH-бета)	49
IA_2 (VH-бета)	54
IA_3 (dsVH-бета)	63
ID_1 (альфа-dsVH)	46
IC_4 (VH-альфа)	62
IC_5 (VH-альфа)	67
ID_4 (альфа-VH)	65
ID_5 (альфа-VH)	69
II	39
III	51
IV	76

После эксклюзионной хроматографии очищенные биспецифические молекулы демонстрировали высокую степень чистоты (>93% мономерного белка), как было определено с помощью эксклюзионной ВЭЖХ на колонках MabPac SEC-1 (5 мкм, 7,8x300 мм), при пропускании 50 мМ фосфата натрия при pH 6,8, содержащим 300 мМ NaCl в системе Agilent 1100 (см. Фигуру 3). ДНС-ПААГ в невосстанавливающих и в восстанавливающих условиях подтвердил чистоту и ожидаемый размер различных молекул с двойной специфичностью ТКР/mAb (данные не показаны).

ПРИМЕР 3:

Специфическая и зависящая от клеток-мишеней активация Т-клеток, индуцированная Fc-содержащими ТКР/mAb-диателами

Активность Fc-содержащих ТКР/mAb-диател в отношении активации Т-клеток оценивали с помощью метода T Cell Activation Bioassay (Promega). Анализ состоит из полученных методами генной инженерии Т-клеток линии Jurkat, которая экспрессирует люциферазный репортер, активируемый элементом отклика фактора NFAT (NFAT-RE). Анализы проводили согласно производителю. Вкратце, клетки T2 либо с нагруженным ВИЧ-специфическим пептидом SLYNTVATL (SEQ ID No. 7) или без нагруженного пептида (ненагруженный контроль) затем инкубировали совместно с модифицированными с помощью набора Promega's клетками линии Jurkat в присутствии возрастающих концентраций биспецифических молекул ТКР/mAb. Активацию репортерных Т-клеток линии Jurkat анализировали через 16-20 часов посредством измерения интенсивности люминесценции.

Репрезентативные результаты анализа активности выбраны для биспецифических молекул ТКР/mAb на основе IgG4 (Фигура 4) и на основе IgG1 (Фигура 5), соответственно. Данные указывают на то, что вне зависимости от изотипа IgG использованных константных доменов, Fc-содержащие конструкции ТКР/mAb-диатело IA и ID проявляли повышенную активацию Т-клеток по сравнению с альтернативными биспецифическими конструкциями ТКР/mAb II, III и IV, как это было измерено по степени

активации и/или соответствующим показателям EC50. Кроме того, индуцированная неспецифическая активация Т-клеток Fc-содержащими ТКР/mAb-диателами, в сравнении с ненагруженными клетками T2, была снижена или по меньшей мере была на уровне неспецифической активации, наблюдавшейся для альтернативных биспецифических конструкций ТКР/mAb. В соответствии с представленными выше результатами молекулы с двойной специфичностью ТКР/mAb-диатело являются предпочтительными молекулами для терапевтического вмешательства, поскольку они вызывают сильную активацию эффекторных Т-клеток по механизму, в высокой степени зависящему от мишени.

Кроме того, анализ по высвобождению лактатдегидрогеназы (Promega) использовали для количественного определения опосредованного МКПК лизиса, нагруженных пептидом SLYNTVATL (SEQ ID No. 7) клеток T2, вызванного различными биспецифическими молекулами ТКР/mAb (Фигура 10). В соответствии с представленными выше результатами анализа методом T Cell Activation Bioassay опять же, Fc-содержащие конструкции ТКР/mAb-диатело IA и ID имели преимущества над альтернативными биспецифическими конструкциями ТКР/mAb II, III и IV, как показывает возросший абсолютный уровень лизиса клеток-мишеней и более низкая концентрация ТКР в биспецифической молекуле, необходимая для получения половины максимального (EC50) уровня уничтожения клеток-мишеней. Что касается конструкций ТКР/mAb II, III и IV, конструкции ТКР/mAb-диатело IA и ID не вызывали лизис клеток T2, нагруженных нерелевантным пептидом (SEQ ID No. 49), подтверждая мишень-специфический лизис относительно клеток T2.

ПРИМЕР 4:

Разработка Fc-содержащих биспецифических ТКР/mAb-диател в качестве молекулярной платформы

Fc-содержащие биспецифические конструкции ТКР/mAb-диател были разработаны, чтобы служить в качестве молекулярной платформы, обеспечивающей каркасные области для различных переменных

доменов, полученных из ТКР и моноклональных антител, которые нацелены на различные комплексы пептида и молекулы МНС и антигены клеточной поверхности, соответственно. Чтобы провести валидацию пригодности в качестве платформы, в первом наборе молекул произвели замену переменных доменов, полученных из моноклональных антител. Переменные домены антитела hUCHT1(V9) к CD3 (конструкция ID_1) заменили на домены антитела hBMA031(var10) к ТКР, используя ту же самую ориентацию домена (конструкции ID_4 и ID_5) или отличную ориентацию (IC_4, IC_5) (более подробная информация представлена в Таблице 1 и на Фигуре 7). Экспрессию, очистку и определение характеристик данных молекул проводили как это описано выше. Степень очистки и целостность конечных препаратов превышала 92% согласно данным анализа методом эксклюзионной ВЭЖХ.

Результаты анализа активности обнаружили мишень-зависимую активацию репортерных Т-клеток линии Jurkat и минимальную неспецифическую активность, направленную против ненагруженных клеток Т2, как в случае переменных доменов антитела hUCHT1 (конструкция ID_1), так и hBMA031 (конструкции ID_4 и ID_5), подтверждая пригодность платформы конструкций с двойной специфичностью на основе ТКР/mAb-диател (Фигура 6). Примечательно, что когда переменные домены ТКР и моноклонального антитела конструкций ID_4 и ID_5 были заменены на каждой из полипептидных цепей с получением конструкций IC_4 и IC_5, активации Т-клеток не наблюдалось (данные не показаны). Последний факт указывает на то, что несмотря на возможность использования биспецифических ТКР/mAb-диател в качестве платформы конструкций для внедрения различных переменных доменов ТКР и моноклонального антитела, для достижения оптимальной активности молекул необходима тщательная оптимизация ориентации домена.

ПРИМЕР 5:

Стабильность Fc-содержащих биспецифических ТКР/mAb-диател

Стабильность биспецифических молекул ТКР/mAb изначально оценивали с помощью анализа теплового сдвига у белков «Protein Thermal Shift Assay» (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкциям производителя при использовании системы ПЦР в режиме реального времени «7500 Real time PCR» (Applied Biosciences). Вкратце, очищенные молекулы смешивали с буфером PTS и красителем PTS и подвергали воздействию возрастающего температурного градиента при постоянном мониторинге флуоресценции образцов. Зафиксированные сигналы флуоресценции анализировали с помощью программы для PTS (Thermo Fisher Scientific) и рассчитывали температуры плавления (T_m) с помощью видоизмененной методики.

Исследования стабильности в условиях стресса проводили при хранении очищенных молекул после растворения в PBS при 40°C в течение срока вплоть до двух недель. Образцы анализировали в отношении целостности белка с помощью эксклюзионной ВЭЖХ и активности – с помощью анализа активации Т-клеток «T Cell Activation Assay» (Promega), как описано выше.

Как ожидалось, хранение при 40°C вызывало образование агрегатов / высокомолекулярных фракций, как это было определено с помощью анализов методом эксклюзионной ВЭЖХ (см. Фигуру 8). Результаты анализов активности молекул на основе IgG1 после очистки и инкубации при 40°C представлены на Фигуре 9. Хотя существенного снижения активности после хранения при 40°C не наблюдалось ни для какой из испытанных молекул, было замечено, что молекулы III и IV под воздействием стресса вызывали существенную долю неспецифической (т. е. мишень-независимой) активации Т-клеток Jurkat. Напротив, биспецифические ТКР/mAb-диатела сохраняли свою мишень-зависимую активность, вопреки присутствию некоторого количества агрегатов, как было выявлено методом эксклюзионной ВЭЖХ.

ПРИМЕР 6:

Получение нацеленных на рак биспецифических молекул ТКР/mAb-диатело

Чтобы провести дальнейшую валидацию потенциала платформы биспецифических конструкций ТКР/mAb-диатело, переменные домены, полученные из ТКР, были заменены на переменные домены ТКР, которые подвергли дозреванию по стабильности/аффинности посредством дрожжевого дисплея согласно описанному ранее способу (Smith et al, 2015, T Cell Receptor Engineering and Analysis Using the Yeast Display Platform. *Methods Mol Biol.* 1319:95-141). Переменные домены ТКР, специфически связывающиеся с полученным из ВИЧ пептидом SLYNTVATL (SEQ ID No. 7) в связи с молекулами HLA-A*02, были заменены на переменные домены ТКР, специфически связывающиеся с опухолеассоциированным пептидом PRAME-004 (SEQ ID No. 49), связанным с молекулой HLA-A*02. Кроме того, переменные домены гуманизированного антитела hUCHT1(V9), рекрутирующего Т-клетки, были заменены на переменные домены hUCHT1(Var17), недавно гуманизированной версии антитела UCHT1, с получением молекулы ТКР/mAb-диатело IA_5, мишенью которого является пептид PRAME-004 (включающий SEQ ID No. 43 и SEQ ID No. 44). Экспрессию, очистку и определение характеристик данной молекулы проводили, как это описано в Примере № 2. Степень очистки и целостность конечного препарата превышала 96% согласно данным анализа методом эксклюзионной ВЭЖХ.

Аффинности связывания биспецифических конструкций ТКР/mAb-диатело с PRAME-004:HLA-A*02 определяли с помощью биослойной интерферометрии. Измерения проводили на системе Octet RED384 с использованием настроек, рекомендованных производителем. Вкратце, очищенные биспецифические молекулы ТКР/mAb-диатело загружали на биосенсоры (АНС) до проведения анализа серийных разведений HLA-A*02/PRAME-004.

Активность данной конструкции ТКР/mAb-диатело, мишенью которой является пептид PRAME-004, в отношении индукции лизиса опухолевых клеток оценивали посредством анализа лизиса, опосредованного CD8-положительными Т-клетками человека, линий раковых клеток человека

UACC-257, SW982 и U2OS, презентующих различное количество копий пептида PRAME-004 в связи с молекулами HLA-A*02 на поверхности опухолевых клеток (UACC-257 – около 1100, SW982 – около 770, U2OS – около 240 копий PRAME-004 на клетку, как это было определено с помощью количественного МС-анализа), как определено в рамках анализа высвобождения лактатдегидрогеназы.

Как показано на Фигуре 11, конструкция ТКР/mAb-диатело IA_5, мишенью которой является пептид PRAME-004, вызвала зависящий от концентраций лизис PRAME-004-положительных линий опухолевых клеток. Эффективный лизис за счет данной молекулы ТКР/mAb-диатело наблюдался даже для опухолевых клеток линии U2OS, экспрессирующей лишь 240 копий PRAME-004 на опухолевую клетку. Данные результаты далее демонстрируют, что формат ТКР/mAb-диатело применим в качестве молекулярной платформы, позволяющей вводить вариабельные домены различных ТКР, а также вариабельные домены различных антител, рекрутирующих Т-клетки.

ПРИМЕР 7:

Возможность получения методами генной инженерии конструкций ТКР/mAb-диатело

Вариабельные домены ТКР, примененные в конструкции IA_5, были дополнительно усовершенствованы в отношении аффинности к пептиду PRAME-004 и стабильности ТКР, и были использованы для введения методами генной инженерии в каркас ТКР/mAb-диатела с получением конструкции IA_6 (содержащей SEQ ID No. 45 и SEQ ID No. 46). Экспрессию, очистку и определение характеристик молекул ТКР/mAb-диатело IA_5 и IA_6 проводили, как это описано в Примере № 2. Степень очистки и целостность конечных препаратов превышала 97% согласно данным анализа методом эксклюзионной ВЭЖХ.

Активность варианта ТКР/mAb-диатела IA_6, с улучшенной стабильностью и аффинностью, по отношению к пептиду PRAME-004 оценивали в рамках

экспериментального анализа цитотоксичности с опухолевыми клетками линии U2OS, презентирующей низкие количества комплекса PRAME-004 и HLA-A*02 или ненагруженными клетками T2 в качестве клеток-мишеней и CD8-положительными Т-клетками человека в качестве эффекторных клеток.

Как показано на Фигуре 12, авторы изобретения наблюдали повышение цитотоксической активности молекулы ТКР/mAb-диатело IA_6, содержащей переменные домены варианта ТКР с улучшенной стабильностью/аффинностью, в сравнении с конструкцией-предшественником IA_5. Для обеих конструкций, IA_5 и IA_6, мог быть подтвержден PRAME-004-зависимый лизис, так как цитолиз мишень-отрицательных клеток T2 выявлен не был.

Белковую конструкцию затем подвергали термическому стрессу при 40°C в течение срока вплоть до двух недель, чтобы проанализировать стабильность PRAME-004-специфических вариантов ТКР/mAb-диатело IA_5 и IA_6. Анализ методом эксклюзионной ВЭЖХ показал существенно улучшенную стабильность варианта IA_6 в сравнении с конструкцией-предшественником IA_5 (см. Фигуру 13). Вызванное температурой увеличение содержания конструкций высокомолекулярных фракций (т. е. элюируемых до основного пика) было менее выраженным в случае IA_6, чем в случае IA_5. В согласии с данным результатом степень извлечения интактного мономерного белка после термического стресса составила 87% и 92% для IA_5 и IA_6, соответственно.

Эти типичные данные конструирования демонстрируют, что высоко активные и стабильные конструкции ТКР/mAb-диатело могут быть дополнительно усовершенствованы за счет внедрения переменных доменов ТКР с улучшенной стабильностью/аффинностью, приводя к получению белков для терапевтического применения с улучшенными характеристиками.

ПРИМЕР 8:**Примеры предпочтительных конструкций**

В дополнение к ВИЧ-специфической биспецифической конструкции на основе ТКР, как описано в настоящем контексте (последовательности Seq ID No. 16 и Seq ID No. 17, с ориентацией D), в изобретении далее предложены несколько других типичных ВИЧ-специфических конструкций, прошедших проверку. Данные конструкции основаны на улучшенных гуманизированных вариантах лежащего в основе антитела к CD3 (UCHT1), которые были слиты с ВИЧ-специфическим ТКР 868, как раскрыто в настоящем документе, во всех четырех возможных ориентациях (последовательности с Seq ID No. 51 по Seq ID No. 58, в ориентациях A–D).

Гуманизацию UCHT1 производили с помощью VH-1-46 и VK1-018 в качестве каркасов-акцепторов для CDR тяжелой и легкой цепи, соответственно. Выбранными J-сегментами были JK1 и JH4, для легкой и тяжелой цепи, соответственно.

Полученные результаты сведены в последующую Таблицу 4:

	V9 (Zhu et al, 1995)	Настоящее изобретение
балл DRB1	1232	~1190
Титр [мг/л]	0,75	3
Тпл для F(ab) [°C]	83,0	86,4
EC50 активации эффекторных клеток [пМ]	63	8

Данные из Таблицы 4 демонстрируют, что гуманизация согласно изобретению является потенциально менее иммуногенной (более низкие баллы DRB1); молекулы являются более стабильными (повышение температуры плавления примерно на 3°C); и более активной (~8-кратное снижение EC50), по сравнению со стандартом (V9) (информацию по анализу см. в примере 3).

В частных аспектах настоящее изобретение может относиться к следующим вариантам:

Вариант 1. Молекула полипептида с двойной специфичностью, выбранная из группы молекул, содержащих первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где:

первая полипептидная цепь содержит первый участок связывания переменного домена (VD1) антитела, специфически связывающийся с поверхностным антигеном иммунной эффекторной клетки человека, и первый участок связывания переменного домена (VR1) ТКР, специфически связывающийся с МНС-ассоциированным пептидным эпитопом, и

первый линкер (LINK1), соединяющий указанные домены;

вторая полипептидная цепь содержит второй участок связывания переменного домена (VR2) ТКР, специфически связывающийся с МНС-ассоциированным пептидным эпитопом, и

второй участок связывания переменного домена (VD2) антитела, специфически связывающийся с поверхностным антигеном иммунной эффекторной клетки человека, и

второй линкер (LINK2), соединяющий указанные домены;

где указанный первый участок связывания (VD1) и указанный второй участок связывания (VD2) ассоциируются с образованием первого сайта связывания (VD1)(VD2), который связывается с антигеном клеточной поверхности иммунной эффекторной клетки человека;

указанный первый участок связывания (VR1) и указанный второй участок связывания (VR2) ассоциируются с образованием второго сайта связывания (VR1)(VR2), который связывается с МНС-ассоциированным пептидным эпитопом;

где указанные две полипептидные цепи слиты с шарнирными доменами IgG человека и/или Fc-доменами IgG человека или их димеризующимися областями; и

где указанные две полипептидные цепи соединены ковалентными и/или нековалентными связями между указанными шарнирными доменами и/или Fc-доменами; и

где указанная полипептидная молекула с двойной специфичностью способна одновременно связываться с молекулой клеточной поверхности и клетки и МНС-ассоциированным пептидным эпитопом, и

молекулы полипептидов с двойной специфичностью, где порядок участков связывания в двух полипептидных цепях выбирается из VD1-VR1 и VR2-VD2 или VD1-VR2 и VR1-VD2, или VD2-VR1 и VR2-VD1 или VD2-VR2 и VR1-VD1, и где домены соединены с помощью либо LINK1, либо LINK2.

Вариант 2. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с вариантом 1, где порядок участков связывания в полипептидных цепях выбирается из VD1-VR1 и VD2-VR2; и где домены соединены с помощью LINK1 или LINK2, соответственно.

Вариант 3. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с вариантом 1, где последовательности линкеров LINK1 и/или LINK2 содержат по меньшей мере один мотив последовательности, выбранный из GGGS, GGGGS, TVLRT, TVSSAS и TVLSSAS.

Вариант 4. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из вариантов 1–3, где указанные первая и вторая полипептидная цепи дополнительно содержат по меньшей мере один шарнирный домен и Fc-домен или его фрагменты, образованные из IgG1, IgG2 или IgG4 человека.

Вариант 5. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с вариантом 4, где указанный Fc-домен содержит по меньшей мере одну мутацию, подавляющую эффекторную функцию на остатке, выбранном из положений 233, 234, 235, 236, 297 и 331, предпочтительно где указанная мутация, подавляющая эффекторную функцию, получена посредством замены по меньшей мере одного остатка в положении 233, 234, 235, 236 и 331 соответствующим остатком, полученным из IgG2 или IgG4.

Вариант 6. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из вариантов 3–5, где указанный Fc-домен содержит CH3-домен, содержащий по меньшей мере одну мутацию, которая упрощает образование гетеродимеров.

Вариант 7. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с вариантом 6, где указанные мутации расположены в любом положении, выбранном из 366, 368, 405 и 407, предпочтительно где указанные мутации включают T366W и T366'S, L368A' и Y407'V в виде мутаций типа «выступ во впадину».

Вариант 8. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из вариантов 3–7, где указанный Fc-домен содержит СН₂- и СН₃-домен(ы), содержащие(ие) по меньшей мере два дополнительных остатка цистеина, например, S354C и Y349C или L242C и K334C.

Вариант 9. Молекулы полипептидов с двойной специфичностью в соответствии с любым из вариантов 1–8, где указанные полученные из антитела домены VD1 и VD2 имеют сконструированный дисульфидный мостик, вводящий ковалентную связь между VD1 и VD2, и где указанные цистеины введены в каркасную область (FR) 4 в случае VL и в каркасную область 2 в случае VH.

Вариант 10. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из вариантов 1–9, где известно, что указанная молекула клеточной поверхности вызывает активацию иммунных клеток, или по меньшей мере является такой, которая выбрана из группы, состоящей из молекул, связанных с иммунным ответом, CD3, таких как цепи CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ , CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD22, CD25, CD28, CD32a, CD32b, CD33, CD41, CD41b, CD42a, CD42b, CD44, CD45RA, CD49, CD55, CD56, CD61, CD64, CD68, CD94, CD90, CD117, CD123, CD125, CD134, CD137, CD152, CD163, CD193, CD203c, CD235a, CD278, CD279, CD287, Nkp46, NKG2D, GITR, Fc ϵ RI, TCR α/β и TCR γ/δ , HLA-DR.

Вариант 11. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из вариантов 1–10, где области в первой полипептидной цепи содержат последовательность с SEQ ID No. 28 для VD1, последовательность с SEQ ID No. 29 для VR1, последовательность с SEQ ID No. 30 для LINK1; а области во второй полипептидной цепи содержат последовательность с SEQ ID No. 31 для VD2,

последовательность с SEQ ID No. 32 для VR2 и последовательность с SEQ ID No. 30 для LINK2.

Вариант 12. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из вариантов 3–11, в которой Fc-область в первой полипептидной цепи содержит последовательность с SEQ ID No. 26 или с SEQ ID No. 47 (Fc1), и Fc-область во второй полипептидной цепи содержит последовательность с SEQ ID No. 27 или с SEQ ID No. 48 (Fc2).

Вариант 13. Молекула полипептида с двойной специфичностью, содержащая первую полипептидную цепь, содержащую последовательность с SEQ ID No. 16 или с SEQ ID No. 43 или с SEQ ID No. 45 или с SEQ ID No. 51, 53, 55 или 57, и вторую полипептидную цепь, содержащую последовательность с SEQ ID No. 17 или с SEQ ID 44 или с SEQ ID No. 46 или с SEQ ID No. 52, 54, 56 или 58.

Вариант 14. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из вариантов 1–13, где указанная молекула снабжена поддающейся обнаружению меткой.

Вариант 15. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из вариантов 1–14, где указанный первый участок связывания (VD1)(VD2), который связывает поверхностный антиген указанных иммунных клеток, гуманизирован; и/или указанный второй участок связывания (VR1)(VR2), который связывает указанный МНС-ассоциированный пептидный эпитоп, обладает зрелостью для достижения более высокой аффинности и/или стабильности.

Вариант 16. Нуклеиновая кислота, кодирующая первую полипептидную цепь и/или вторую полипептидную цепь в соответствии с любым из вариантов 1–15, или вектор экспрессии, содержащий по меньшей мере одну из указанных нуклеиновых кислот.

Вариант 17. Клетка-хозяин, содержащая и необязательно экспрессирующая вектор, как определено согласно варианту 16.

Вариант 18. Фармацевтическая композиция, содержащая молекулу полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из вариантов 1–15, нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии в соответствии с вариантом 16, или клетку в соответствии с вариантом 17,

вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями или вспомогательными веществами.

Вариант 19. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из вариантов 1–15, нуклеиновая кислота или вектор экспрессии в соответствии с вариантом 16, клетка в соответствии с вариантом 17, или фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом 18 для применения в медицине.

Вариант 20. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из вариантов 1–15, нуклеиновая кислота или вектор экспрессии в соответствии с вариантом 16, клетка в соответствии с вариантом 17, или фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом 18 для применения в предупреждении или лечении заболевания или нарушения, выбранного из ракового заболевания, инфекционного заболевания и иммунологических нарушений.

Вариант 21. Способ лечения заболевания или нарушения, включающий введение терапевтически эффективного количества молекулы полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из вариантов 1–15, нуклеиновой кислоты или вектора экспрессии в соответствии с вариантом 16, клетки в соответствии с вариантом 17, или фармацевтической композиции в соответствии с вариантом 18.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула полипептида с двойной специфичностью, содержащая первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где:

a) первая полипептидная цепь содержит

ai) первый переменный домен (VD1) антитела,

aii) первый переменный домен (VR1) Т-клеточного рецептора (ТКР), и

aiii) первый линкер (LINK1), соединяющий указанные домены;

b) вторая полипептидная цепь содержит

bi) второй переменный домен (VR2) ТКР,

bii) второй переменный домен (VD2) антитела, и

biii) второй линкер (LINK2), соединяющий указанные домены;

где указанный первый переменный домен (VD1) и указанный второй переменный домен (VD2) ассоциируются с образованием первого сайта связывания (VD1)(VD2), который специфически связывается с антигеном клеточной поверхности иммунной эффекторной клетки человека;

где первый переменный домен (VR1) является одним из домена ТКР V α и домена ТКР V β , а второй переменный домен (VR2) является другим из домена ТКР V α и домена ТКР V β , указанный первый переменный домен (VR1) и указанный второй переменный домен (VR2) ассоциируются с образованием второго сайта связывания (VR1)(VR2), который специфически связывается с МНС-ассоциированным пептидным эпитопом;

где указанные две полипептидные цепи слиты с шарнирными доменами IgG человека и/или Fc-доменами IgG человека или их димеризующимися областями;

где указанные две полипептидные цепи соединены ковалентными и/или нековалентными связями между указанными шарнирными доменами и/или Fc-доменами;

где указанная полипептидная молекула с двойной специфичностью способна одновременно связываться с молекулой клеточной поверхности и МНС-ассоциированным пептидным эпитопом; и

где порядок переменных доменов в двух полипептидных цепях выбирается из VD1-VR1 и VR2-VD2 или VD2-VR2 и VR1-VD1, причем

(i) первый и второй переменные домены VD1 и VD2 антитела содержат аминокислотные последовательности, характеризующиеся по меньшей мере 95%-

ной идентичностью к переменным доменам альфа/бета ТКР-специфичного антитела BMA031, представленным в SEQ ID NO: 18 и 19; или

(ii) первый и второй переменные домены VD1 и VD2 антитела содержат аминокислотные последовательности, характеризующиеся по меньшей мере 95%-ной идентичностью к переменным доменам гуманизированного антитела hUCHT1, рекрутирующего Т-клетки, представленным в SEQ ID NO: 43 и 44 или в SEQ ID NO: 41 и 42, соответственно.

2. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с п. 1, где последовательности линкеров LINK1 и/или LINK2 содержат по меньшей мере один мотив последовательности, выбранный из GGGS, GGGGS, TVLRT, TVSSAS, и TVLSSAS.

3. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из пп. 1–2, где указанные первая и вторая полипептидные цепи дополнительно содержат по меньшей мере шарнирный домен и Fc-домен или его фрагменты, образованные из IgG1, IgG2 или IgG4 человека, предпочтительно где указанный Fc-домен содержит по меньшей мере одну мутацию, подавляющую эффекторную функцию в последовательности SEQ ID No. 50 (ELLGGP) IgG1 человека, более предпочтительно где указанная мутация, подавляющая эффекторную функцию, получена посредством одной или более мутаций E1P, L2V, L3A, и отсутствием остатка в положении 4 SEQ ID No. 50.

4. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с п. 3, где указанный Fc-домен содержит CH3-домен, содержащий по меньшей мере одну мутацию, которая упрощает образование гетеродимеров, предпочтительно где указанные мутации включают мутации типа «выступ во впадину».

5. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из пп. 3 или 4, где указанный Fc-домен содержит CH2- и CH3-домен(ы), содержащий(ие) по меньшей мере два дополнительных остатка цистеина.

6. Молекулы полипептидов с двойной специфичностью в соответствии с любым из пп. 1–5, где указанные переменные домены антитела VD1 и VD2 имеют сконструированный дисульфидный мостик, вводящий ковалентную связь между VD1

и VD2, и где указанные цистеины введены в каркасную область (FR) 4 в случае VL и в каркасную область 2 в случае VH.

7. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из пп. 1–6, где указанная молекула клеточной поверхности, как известно, вызывает активацию иммунных клеток, или является по меньшей мере одной, выбранной из группы, состоящей из CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD22, CD25, CD28, CD32a, CD32b, CD33, CD41, CD41b, CD42a, CD42b, CD44, CD45RA, CD49, CD55, CD56, CD61, CD64, CD68, CD94, CD90, CD117, CD123, CD125, CD134, CD137, CD152, CD163, CD193, CD203c, CD235a, CD278, CD279, CD287, Nkp46, NKG2D, GITR, FcεRI, TCRα/β и TCRγ/δ, HLA-DR, предпочтительно где указанная молекула клеточной поверхности представляет собой CD3γ, CD3δ или CD3ε.

8. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из пп. 1–6,

(i) где первый и второй переменные домены VD1 и VD2 антитела содержат переменные домены альфа/бета TCR-специфичного антитела BMA031, представленные в SEQ ID NO: 18 и 19; или

(ii) где первый и второй переменные домены VD1 и VD2 антитела содержат переменные домены гуманизированного антитела hUCHT1, рекрутирующего Т-клетки, представленные в SEQ ID NO: 43 и 44 или в SEQ ID NO: 41 и 42, соответственно.

9. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из пп. 1–8, в которой первая полипептидная цепь содержит SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, и SEQ ID No. 30; а вторая полипептидная цепь содержит SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 32 и SEQ ID No. 30.

10. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из пп. 3–9, в которой Fc-область в первой полипептидной цепи содержит SEQ ID No. 26 или SEQ ID No. 47 (Fc1), и Fc-область во второй полипептидной цепи содержит SEQ ID No. 27 или SEQ ID No. 48 (Fc2).

11. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с п.1, где первая полипептидная цепь содержит SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 43, SEQ ID No. 45, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 55, или SEQ ID No. 57, и вторая полипептидная цепь содержит SEQ ID No. 17, SEQ ID 44, SEQ ID No. 46, SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 54, SEQ ID No. 56, или SEQ ID No. 58.

12. Молекула полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из пп. 1–11, где указанный первый участок связывания (VD1)(VD2), который связывает поверхностный антиген указанных иммунных клеток, гуманизирован; и/или указанный второй участок связывания (VR1)(VR2), который связывает указанный МНС-ассоциированный пептидный эпитоп, обладает созревшей аффинностью и/или созревшей стабильностью.

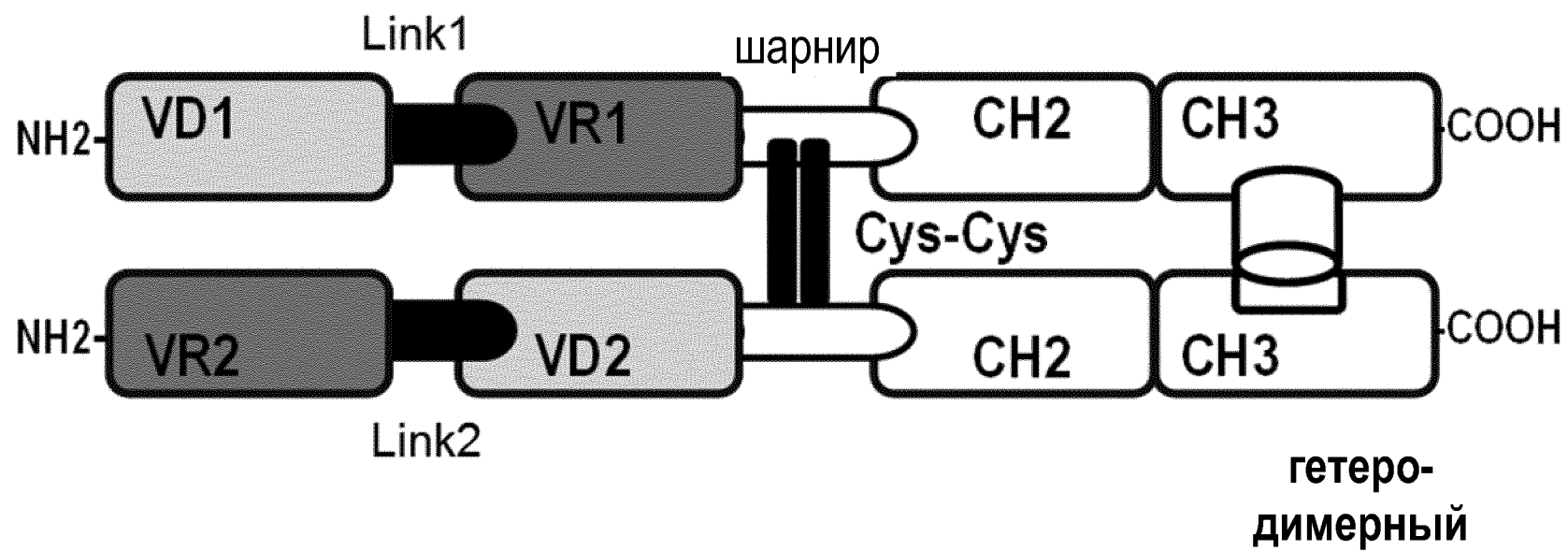
13. Нуклеиновая кислота, кодирующая первую полипептидную цепь и/или вторую полипептидную цепь в соответствии с любым из пп. 1–12, или вектор экспрессии, содержащий по меньшей мере одну из указанных нуклеиновых кислот.

14. Клетка-хозяин, содержащая вектор, как определено в п. 13, предпочтительно где указанная клетка-хозяин экспрессирует указанный вектор.

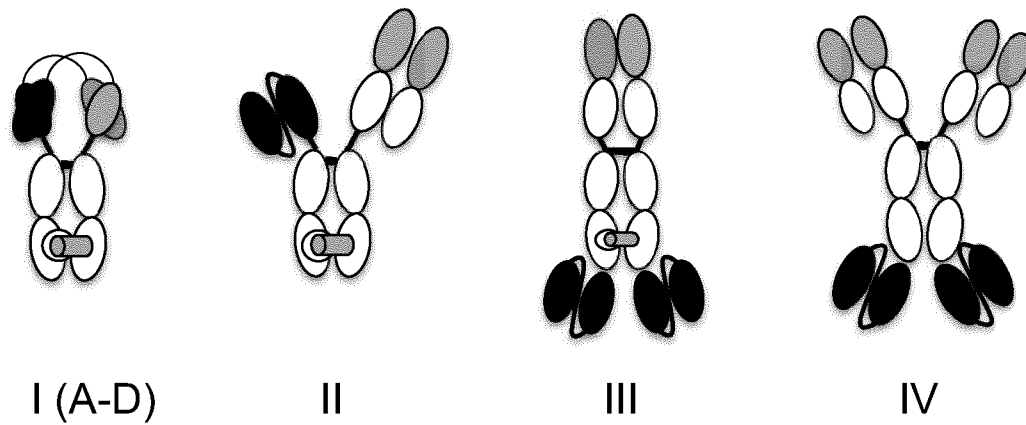
15. Фармацевтическая композиция, содержащая молекулу полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из пп. 1–12, нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии в соответствии с п. 13, или клетку в соответствии с п. 14, вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями или вспомогательными веществами.

16. Применение молекулы полипептида с двойной специфичностью в соответствии с любым из пп. 1–12, нуклеиновой кислоты или вектора экспрессии в соответствии с п. 13, клетки в соответствии с п. 14, или фармацевтической композиции в соответствии с п. 15, в лечении заболеваний или нарушений, предпочтительно для предупреждения или лечения заболевания или нарушения, выбранного из рака, инфекционных заболеваний и иммунологических нарушений.

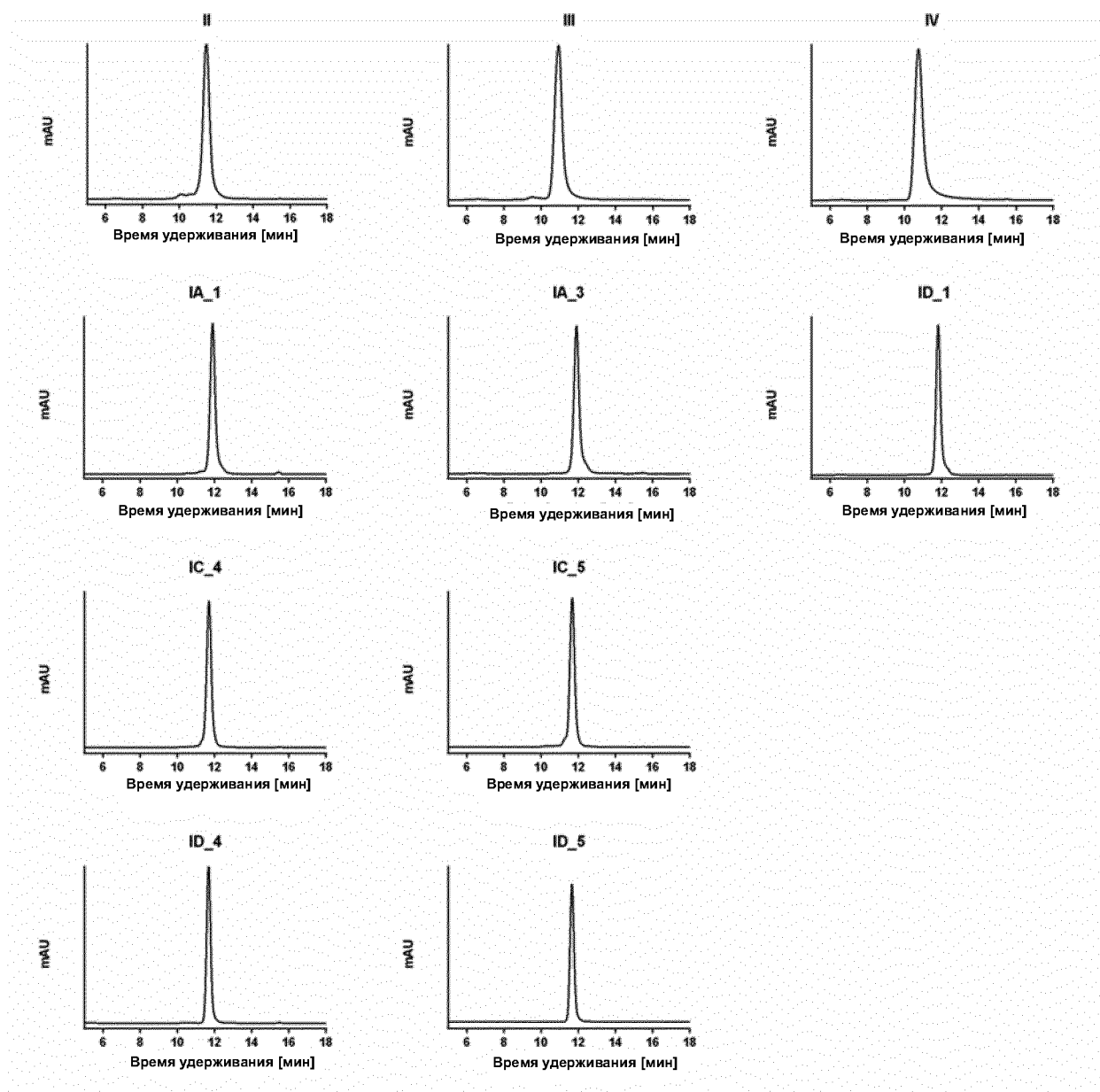
Фигура 1



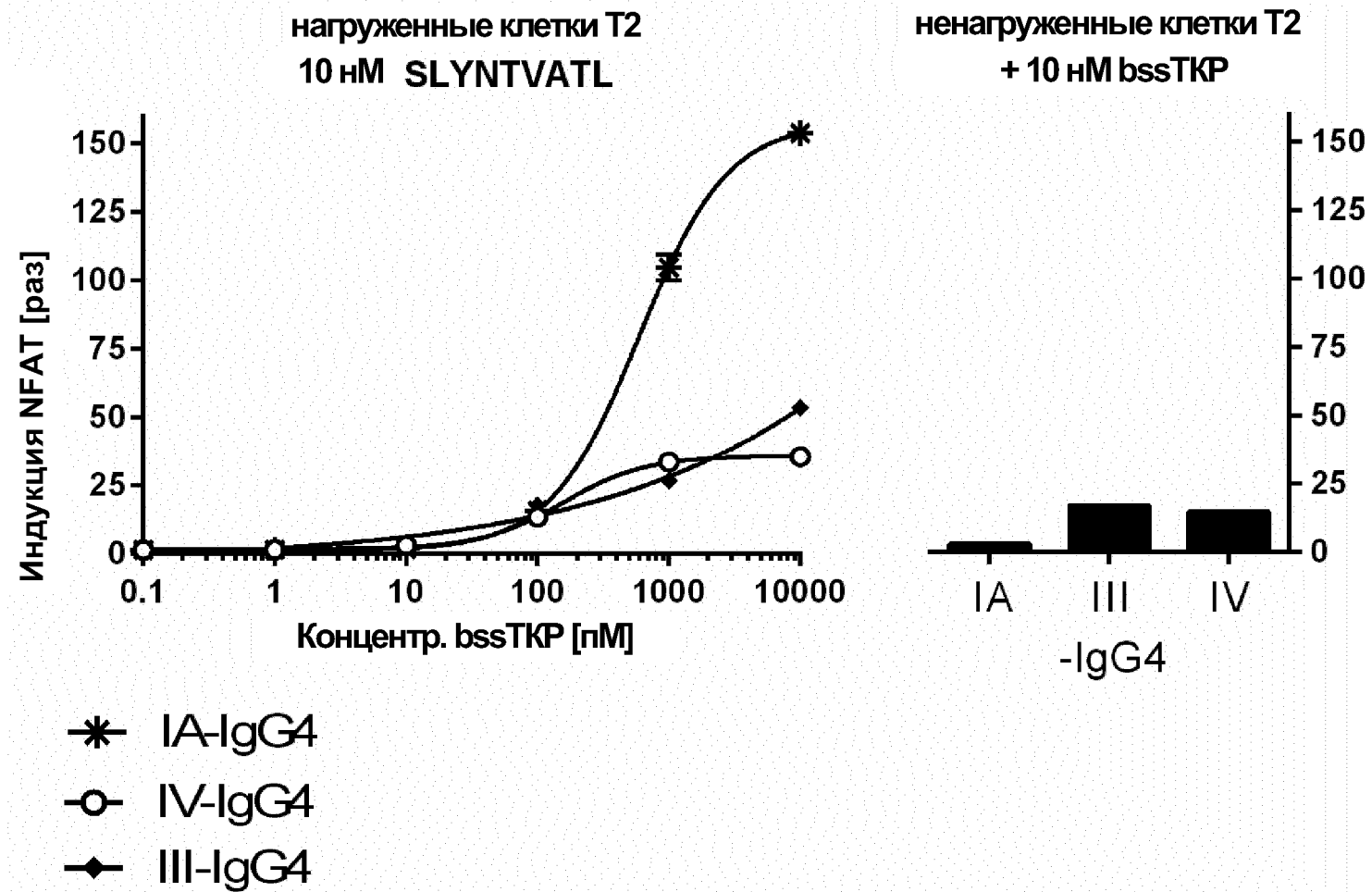
Фигура 2



Фигура 3

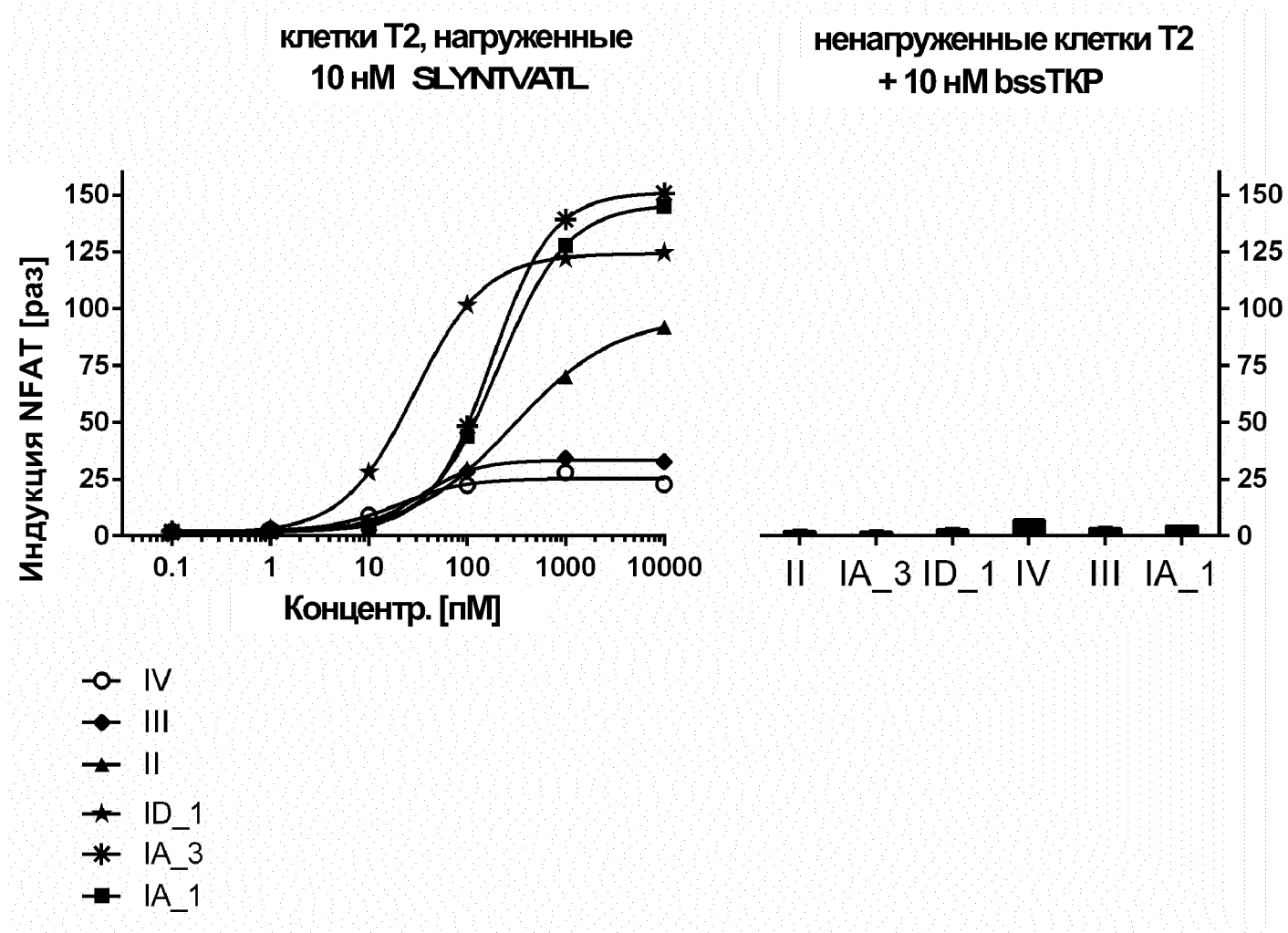


Фигура 4



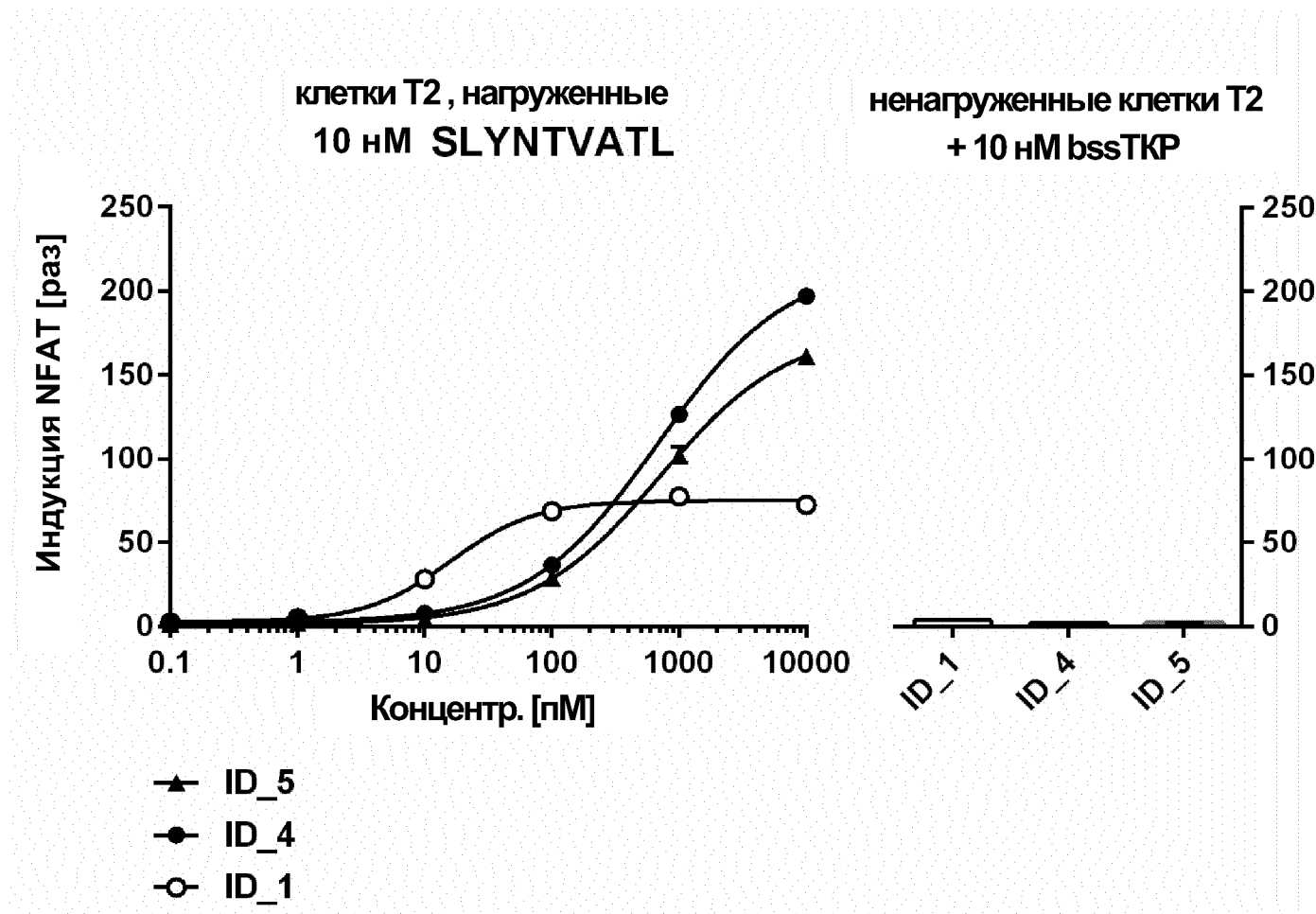
NFAT = ядерный фактор активированных Т-клеток

Фигура 5



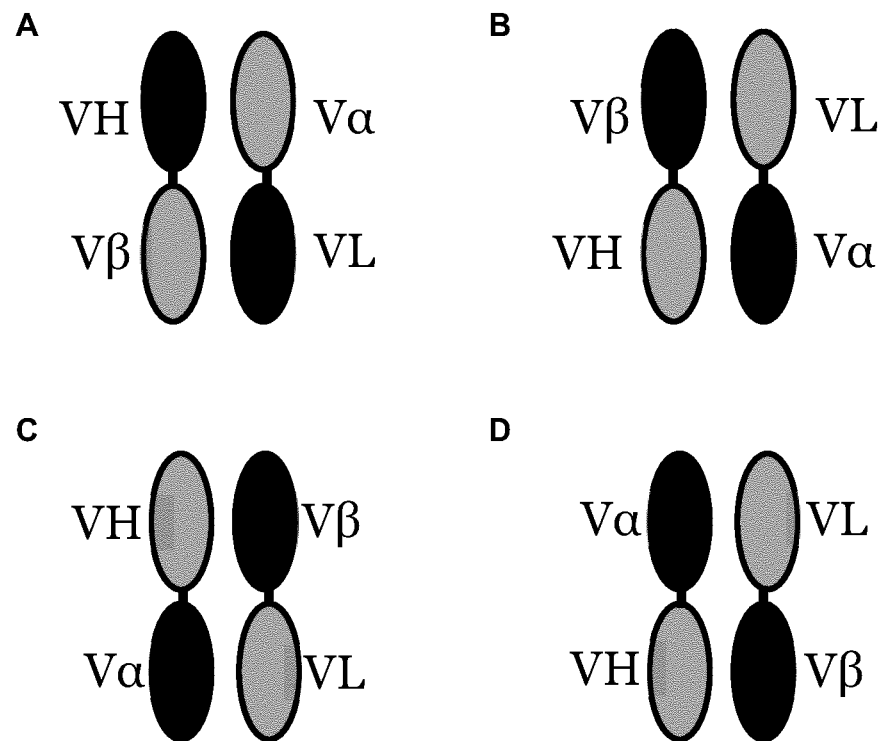
NFAT = ядерный фактор активированных Т-клеток

Фигура 6

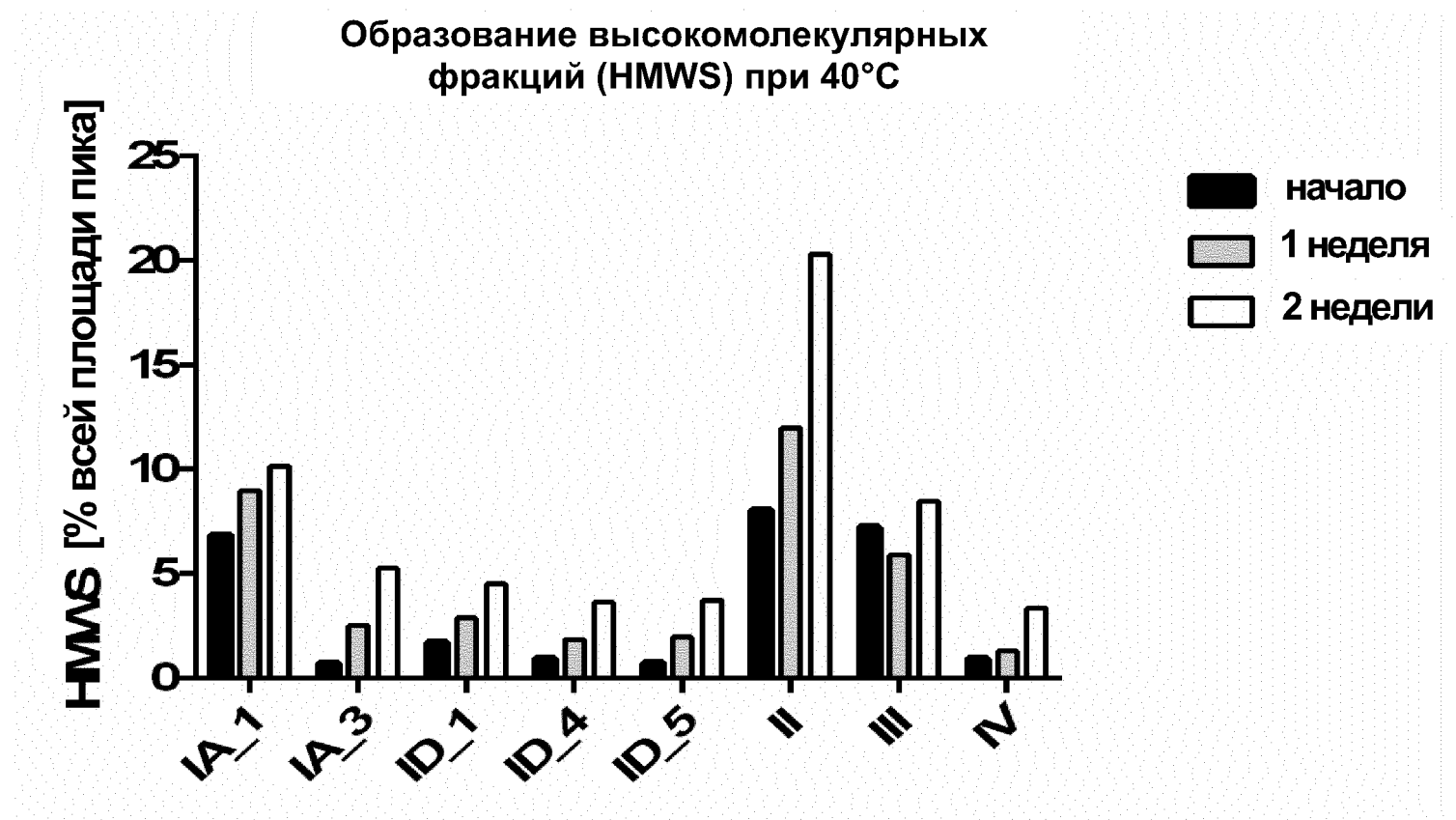


NFAT = ядерный фактор активированных Т-клеток

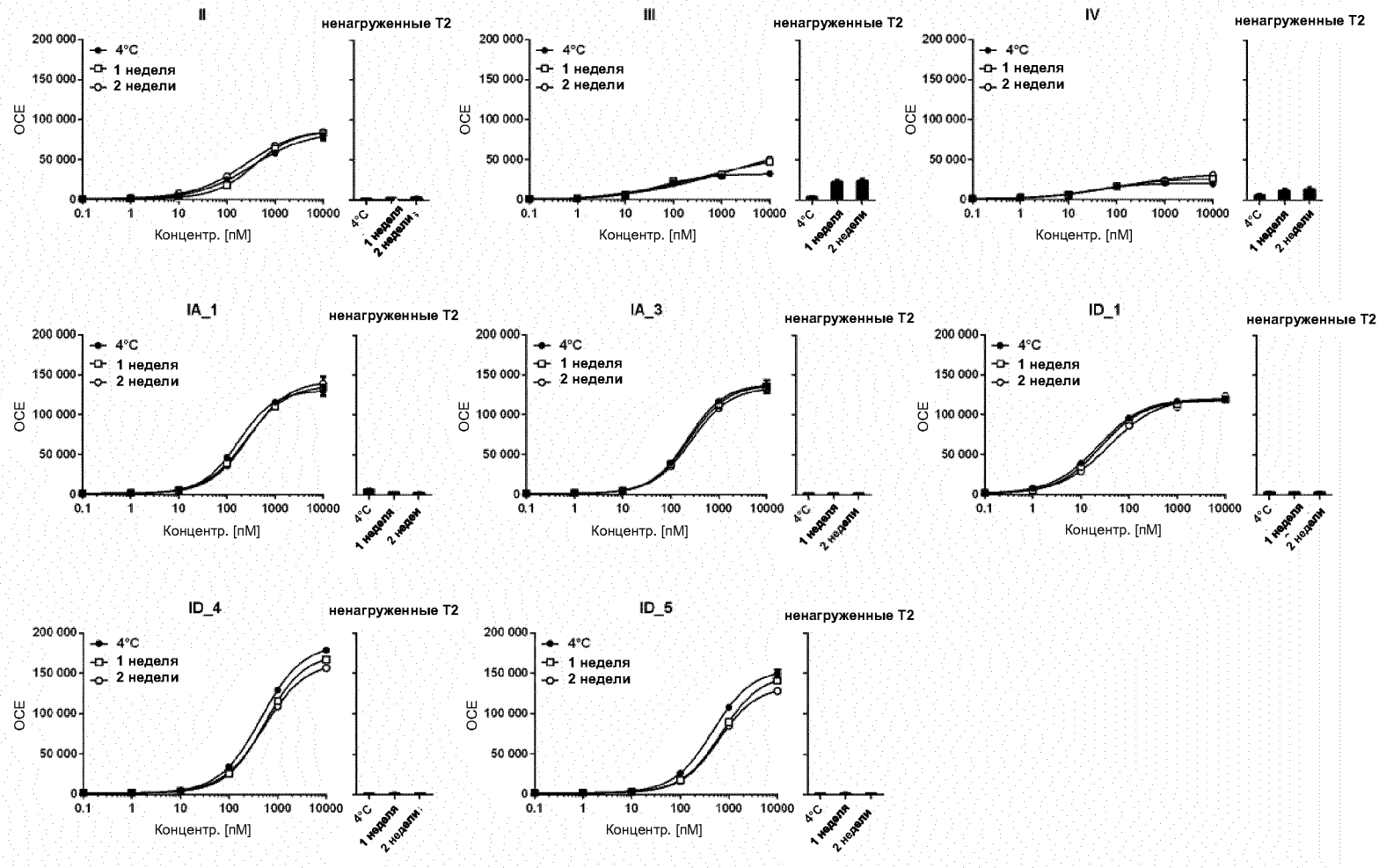
Фигура 7



Фигура 8

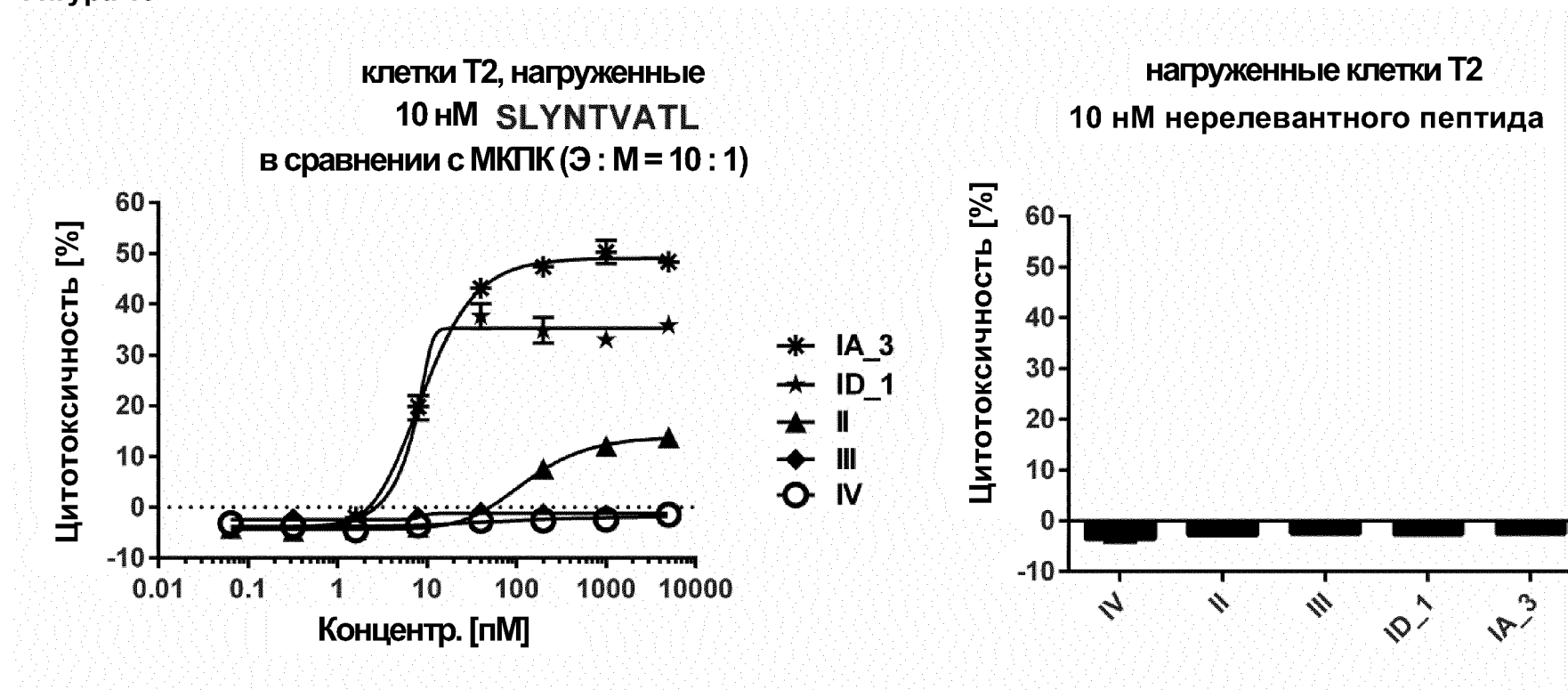


Фигура 9

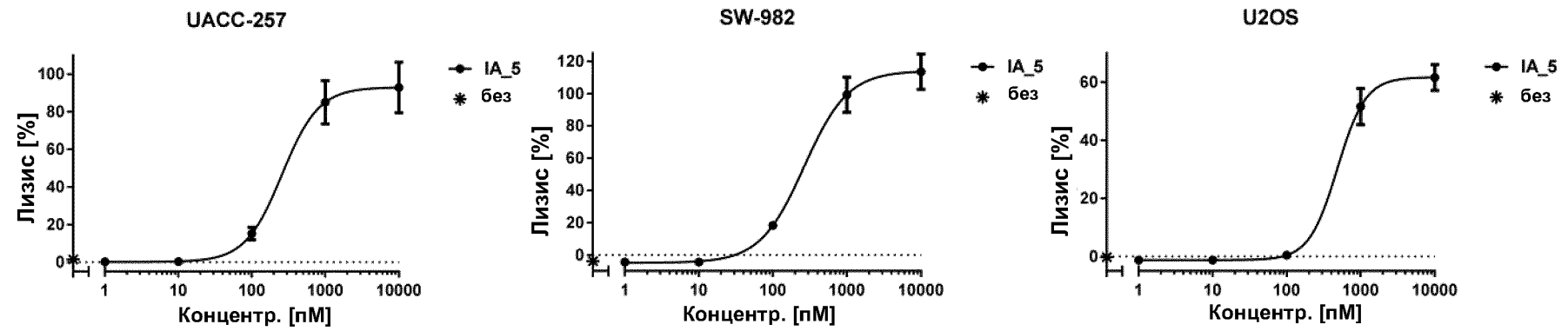


OCE = относительные световые единицы

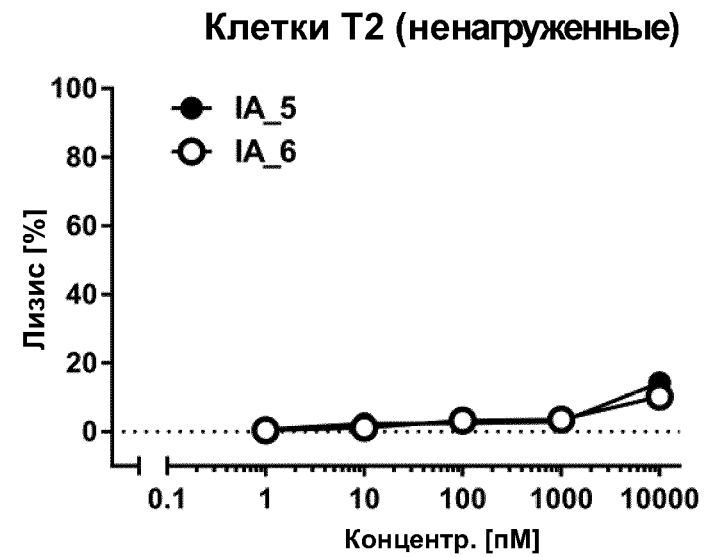
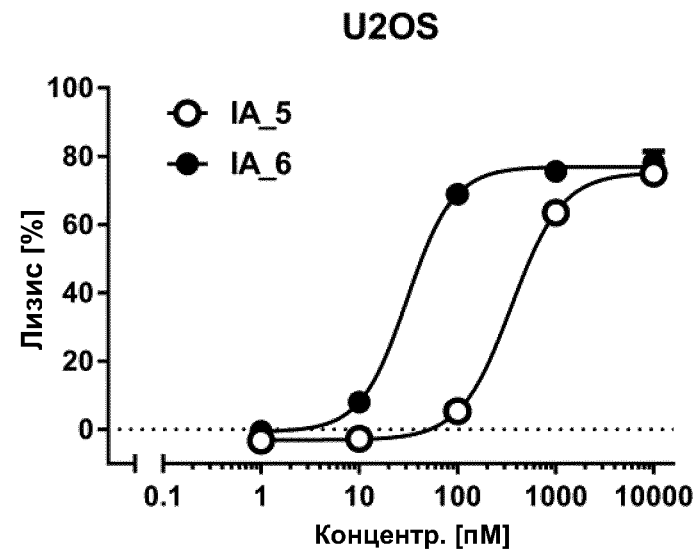
Фигура 10



Фигура 11



Фигура 12



Фигура 13

