



УКРАЇНА

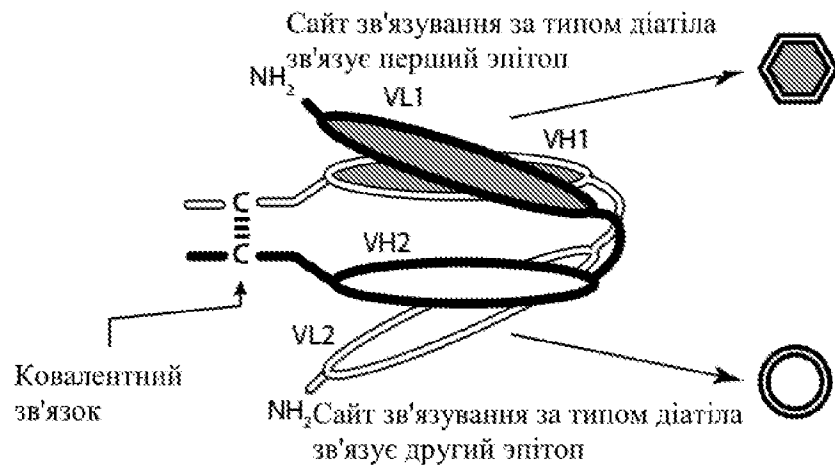
(19) **UA** (11) **119673** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)**C07K 16/28** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)**A61P 31/04** (2006.01)**A61P 31/10** (2006.01)**A61P 31/12** (2006.01)**A61P 35/00**МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2017 00685	(72) Винахідник(и): Бонвіні Езіо (US), Джонсон Леслі С. (US), Шах Калпана (US), Ла Мотт-Мос Росс (US), Мур Пол А. (US), Кеніг Скотт (US)
(22) Дата подання заявки: 19.06.2015	(73) Власник(и): МАКРОДЖЕНІКС, ІНК., 9704 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.07.2019	(74) Представник: Кістерський Кирило Арсенійович, реєстр. №207
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/017,467	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2014012479 A1, 23.01.2014 WO 2012162068 A2, 29.11.2012 WO 2011159877 A2, 22.12.2011 US 200900609 A1, 05.03.2009 WO 2014008218 A1, 09.01.2014
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 26.06.2014	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.05.2017, Бюл.№ 10	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.07.2019, Бюл.№ 14	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2015/036634, 19.06.2015	

(54) БІСПЕЦИФІЧНЕ Fc-ДІАТІЛО, ЗДАТНЕ ІМУНОСПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУВАТИСЯ З ЕПІТОПОМ PD-1 І З ЕПІТОПОМ LAG-3, ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ**(57) Реферат:**

Винахід стосується біспецифічного Fc-діатіла, здатного зв'язуватися з епітопом PD-1 і з епітопом LAG-3. Також винахід стосується фармацевтичної композиції та застосування біспецифічного Fc-діатіла у виробництві лікарського засобу для лікування злоякісних пухлин та у виробництві лікарського засобу для лікування захворювань, асоційованих з наявністю патогену.

UA 119673 C2



Фіг. 1

Посилання на родинні заявки

Згідно з даної заявки заявляється пріоритет згідно із заявкою на видачу патенту США № 62/017467 (яка подана 26 червня 2014 року та знаходиться на розгляді), зміст якої, таким чином, включено у цей документ за допомогою посилання у повному її обсязі.

5 Посилання на перелік послідовностей

Дана заявка включає один або декілька переліків послідовностей відповідно до розділу 37 Зведення Федеральних Правил, пункту 1.821 і далі, які збережені на машиночитаемому носії (ім'я файлу: 1301_0115PCT_Sequence_Listing_ST25.txt, створений 2 червня 2015 року та має розмір 50015 байт), при цьому зміст файлу включено в цей документ за допомогою посилання у повному його обсязі.

Попередній рівень техніки даного винаходу

Галузь техніки, до якої відноситься даний винахід

Даний винахід відноситься до біспецифічних діатіл, які містять два або більше поліпептидних ланцюгів і які мають щонайменше один епітоп-зв'язувальний сайт, який є імуноспецифічним до епітопу PD-1, і щонайменше один епітоп-зв'язувальний сайт, який є імуноспецифічним до епітопу LAG-3 (тобто до «біспецифічного діатіла PD-1 × LAG-3»). Більш переважно даний винахід відноситься до біспецифічних діатіл, які містять чотири поліпептидні ланцюги та які мають два епітоп-зв'язувальні сайти, які є імуноспецифічними до одного (або двох) епітопу(-ів) PD-1, і два епітоп-зв'язувальні сайти, які є імуноспецифічними до одного (або двох) епітопу(-ів) LAG-3 (тобто до «біспецифічного тетравалентного діатіла PD-1 × LAG-3»). Даний винахід також відноситься до таких діатіл, що додатково містять імуноглобуліновий Fc-домен («біспецифічних Fc-діатіл» і «біспецифічних тетравалентних Fc-діатіл»). Діатіла за даним винаходом здатні водночас зв'язуватися з PD-1 і з LAG-3, зокрема оскільки такі молекули розташовані на поверхнях клітин людини. Даний винахід відноситься до фармацевтичних композицій, що містять такі діатіла, та до способів, які передбачають застосування таких діатіл для лікування злоякісної пухлини й інших захворювань і станів.

Опис рівня техніки

I. Клітинні імунні відповіді

Імунна система у людей та інших ссавців відповідає за забезпечення захисту від інфекції та захворювання. Такий захист забезпечується як за допомогою гуморальної імунної відповіді, так і за допомогою клітинної імунної відповіді. Гуморальна відповідь приводить у результаті до продукування антитіл та інших біомолекул, які здатні розпізнавати та нейтралізувати чужорідні цілі (антигени). На відміну від цього, клітинна імунна відповідь включає активацію макрофагів, натуральних кілерів (NK) і антиген-специфічних цитотоксичних Т-лімфоцитів за допомогою Т-клітин і вивільнення різних цитокінів у відповідь на розпізнавання антигену (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules", *Immunolog. Res.* 28(1):39-48).

Здатність Т-клітин оптимально опосередковувати імунну відповідь до антигену потребує дві різні сигнальні взаємодії (Viglietta, V. et al. (2007) "Modulating Co-Stimulation", *Neurotherapeutics* 4:666-675; Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy", *Adv. Immunol.* 90: 297-339). По-перше, антиген, який розташований на поверхні антиген-презентуючих клітин (APC), повинен бути презентованим антиген-специфічній наївній CD4⁺ Т-клітині. У ході такої презентації доставляється сигнал за допомогою Т-клітинного рецептора (TCR), що змушує Т-клітину ініціювати імунну відповідь, яка буде специфічною до презентованого антигену. По-друге, серія коstimулюючих та інгібуючих сигналів, опосередкованих взаємодіями між APC і різними молекулами на поверхні Т-клітин, запускає спочатку активацію та проліферацію Т-клітин, а наприкінці - їх інгібування. Таким чином, перший сигнал надає специфічність імунній відповіді, тоді як другий сигнал призначений для визначення природи, величини та тривалості відповіді.

Імунна система жорстко контролюється за допомогою коstimулюючих і коінгібуючих лігандів і рецепторів. Такі молекули забезпечують другий сигнал для Т-клітинної активації та забезпечують збалансовану мережу позитивних і негативних сигналів для максимізації імунних відповідей на інфекцію, при цьому обмежуючи імунітет до власного організму (Wang, L. et al. (March 7, 2011) "VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses", *J. Exp. Med.* 10.1084/jem.20100619:1-16; Lepenies, B. et al. (2008) "The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections", *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 8:279-288). Особливо важливим є зв'язування між лігандами B7.1 (CD80) і B7.2 (CD86) у антиген-презентуючої клітини та рецепторами CD28 і CTLA-4 у CD4⁺ Т-лімфоцита (Sharpe, AH et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules", *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation", *Immunol. Rev.* 229:307-

321). Зв'язування B7.1 або B7.2 з CD28 стимулює Т-клітинну активацію; зв'язування B7.1 або B7.2 з CTLA-4 інгібує таку активацію (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules", *Immunol. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation", *Immunol. Rev.* 229:307-321; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited", *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548). CD28 постійно експресується на поверхні Т-клітин (Gross, J., et al. (1992) "Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse", *J. Immunol.* 149:380-388), тоді як експресія CTLA4 піддається швидкій позитивній регуляції після Т-клітинної активації (Linsley, P. et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement", *Immunity* 4:535-543). Оскільки CTLA4 є рецептором з більш високою афінністю (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126), зв'язування спочатку ініціює Т-клітинну проліферацію (за допомогою CD28), а потім інгібує її (шляхом старту експресії CTLA4), тим самим послаблюючи ефект, якщо проліферація більш не потрібна.

Подальші дослідження лігандів рецептора CD28 привели до виявлення та опису характеристик набору споріднених молекул B7 («суперсімейство B7») (Coyle, A.J. et al. (2001) "The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T-Cell Function", *Nature Immunol.* 2(3):203-209; Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited", *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548; Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands", *Genome Biol.* 6:223.1-223.7; Loke, P. et al. (2004) "Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T-Cells." *Arthritis Res. Ther.* 6:208-214; Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy", *Adv. Immunol.* 90:297-339; Flies, D.B. et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity", *J. Immunother.* 30(3):251-260; Agarwal, A. et al. (2008) "The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance", *Curr. Opin. Organ Transplant.* 13:366-372; Lenschow, D.J. et al. (1996) "CD28/B7 System of T-Cell Costimulation", *Ann. Rev. Immunol.* 14:233-258; Wang, S. et al. (2004) "Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses", *Microbes Infect.* 6:759-766). У даний час відомо кілька представників цього сімейства: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), індукований костимулюючий ліганд (ICOS-L), ліганд запрограмованої загибелі клітин 1 (PD-L1; B7-H1), ліганд запрограмованої загибелі клітин 2 (PD-L2; B7-DC), B7-H3, B7-H4 і B7-H6 (Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands", *Genome Biol.* 6:223.1-223.7; Flajnik, M.F. et al. (2012) "Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC", *Immunogenetics* epub doi.org/10.1007/s00251-012-0616-2).

II. PD-1

Білок запрограмованої загибелі клітин 1 («PD-1») являє собою мембранний білок I типу з масою приблизно 31 кДа, який є представником великого сімейства CD28/CTLA4 Т-клітинних регуляторів, які беруть участь у різноманітній негативній регуляції імунних відповідей (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death", *EMBO J.* 11:3887-3895; публікації заявки на видачу патенту США № 2007/0202100, 2008/0311117, 2009/00110667, патенти США № 6808710, 7101550, 7488802, 7635757, 7722868, РСТ публікація № WO 01/14557). У порівнянні з CTLA4, PD-1 - більше.

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

Позаклітинна ділянка PD-1 складається з окремого імуноглобулінового (Ig) домену V з 23% ідентичністю з еквівалентним доменом у CTLA4 (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity", *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298). Позаклітинний домен IgV знаходиться за трансмембранною ділянкою та внутрішньоклітинним кінцем. Внутрішньоклітинний кінець містить два сайти фосфорилування, розташованих в імунорецепторному тирозиновому інгібуючому мотиві й імунорецепторному тирозиновому перемикаючому мотиві, що свідчить про те, що PD-1 здійснює негативну регуляцію щодо сигналів TCR (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death", *EMBO J.* 11:3887-3895; Blank, C. et al. (Epub 2006 Dec 29) "Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An

Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer", Immunol. Immunother. 56(5):739-745).

PD-1 опосередковує інгібування імунної системи за допомогою зв'язування з B7-H1 і B7-DC (Flies, D.B. et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity", J. Immunother. 30(3):251-260; патенти США № 6803192, 7794710, публікації заявок на видачу патентів США № 2005/0059051, 2009/0055944, 2009/0274666, 2009/0313687, РСТ публікації № WO 01/39722, WO 02/086083).

B7-H1 і B7-DC являють собою зв'язувальні ліганди, які широко експресуються на поверхнях мишачих і людських тканин, таких як серцева, плацентарна, м'язова тканина, тканини ембріональної печінки, селезінки, лімфовузлів і тимуса, а також мишачої печінки, легені, нирки, на острівцевих клітинах підшлункової залози та тканини тонкого кишечника (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity", Semin. Cancer Biol. 17(4):288-298). У людей експресія білка B7-H1 була виявлена в ендотеліальних клітинах (Chen, Y. et al. (2005) "Expression of B7-H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells", Nephron. Exp. Nephrol. 102:e81-e92; de Haij, S. et al. (2005) "Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell Responses Via ICOS-L And B7-H1" Kidney Int. 68:2091-2102; Mazanet, M.M. et al. (2002) "B7-H1 Is Expressed By Human Endothelial Cells And Suppresses T-Cell Cytokine Synthesis", J. Immunol. 169:3581-3588), міокарді (Brown, J.A. et al. (2003) "Blockade Of Programmed Death-1 Ligands On Dendritic Cells Enhances T-Cell Activation And Cytokine Production", J. Immunol. 170:1257-1266), синцитіотрофобластах (Petroff, M.G. et al. (2002) "B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface", Placenta 23:S95-S101). Ці молекули також експресуються резидентними макрофагами деяких тканин, макрофагами, які були активовані за допомогою інтерферону (IFN)- γ або фактора некрозу пухлини (TNF)- α (Latchman, Y. et al. (2001) "PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation", Nat. Immunol. 2:261-268), і в пухлинах (Dong, H. (2003) "B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity", J. Mol. Med. 81:281-287).

Було виявлено, що взаємодія між B7-H1 і PD-1 забезпечує ключовий негативний коstimулюючий сигнал для Т- і В-клітин (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity", Semin. Cancer Biol. 17 (4):288-298) і виконує роль індуктора загибелі клітин (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death", EMBO J. 11:3887-3895; Subudhi, S.K. et al. (2005) "The Balance Of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition", J. Molec. Med. 83:193-202). Більш конкретно, було виявлено, що взаємодія між рецептором PD-1 і лігандом B7-H1 у низьких концентраціях призводить у результаті до передачі інгібуючого сигналу, який сильно інгібує проліферацію антиген-специфічних CD8⁺ Т-клітин; взаємодії з PD-1 у більш високих концентраціях не інгібують Т-клітинну проліферацію, але значно зменшують продукування багатьох цитокінів (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", Nature Rev. Immunol. 2:116-126). Було виявлено, що Т-клітинна проліферація та продукування цитокінів як у стані спокою, так і раніше активованими CD4 і CD8 Т-клітинами, і навіть наївними Т-клітинами з пуповинної крові, інгібуються розчинними гібридними білками B7-H1-Fc (Freeman, G.J. et al. (2000) "Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation", J. Exp. Med. 192:1-9; Latchman, Y. et al. (2001) "PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation", Nature Immunol. 2:261-268; Carter, L. et al. (2002) "PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T-cells and is overcome by IL-2", Eur. J. Immunol. 32(3):634-643; Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", Nature Rev. Immunol. 2:116-126).

Було висунуто припущення, що завдяки ролі B7-H1 і PD-1 в інгібуванні Т-клітинної активації та проліферації такі біомолекули можуть слугувати як терапевтичні цілі для лікування запалення та злоякісної пухлини. Таким чином, було запропоновано застосування антитіл до PD-1 для лікування інфекцій і пухлин і позитивного модулювання адаптивної імунної відповіді (див. публікації заявок на видачу патентів США № 2010/0040614, 2010/0028330, 2004/0241745, 2008/0311117 2009/0217401, патенти США № 7521051, 7563869, 7595048, РСТ публікації № WO 2004/056875, WO 2008/083174). Про антитіла, які здатні імуноспецифічно зв'язуватися з PD-1, повідомлялося у роботах Agata, T. et al. (1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes", Int. Immunol. 8(5):765-772, і Berger, R. et al. (2008) "Phase I Safety And Pharmacokinetic Study Of CT-011, A Humanized Antibody Interacting With PD-1, In Patients With Advanced Hematologic Malignancies", Clin. Cancer Res. 14(10):3044-3051 (див. також патенти США № 8008449 та 8552154, патентні публікації США № 2007/0166281, 2012/0114648, 2012/0114649, 2013/0017199, 2013/0230514 і 2014/0044738 і патентні публікації РСТ WO 2003/099196, WO 2004/004771, WO 2004/056875, WO 2004/072286, WO 2006/121168,

WO 2007/005874, WO 2008/083174, WO 2009/014708, WO 2009/073533, WO 2012/135408, WO 2012/145549 і WO 2013/014668).

III. LAG-3

Продукт гена активації лімфоцитів 3 (LAG-3, CD223) являє собою рецепторний білок клітинної поверхні, що експресується активованими CD4⁺ і CD8⁺ Т-клітинами та NK-клітинами та конститутивно експресується плазмацитоїдними дендритними клітинами; LAG-3 не експресується В-клітинами, моноцитами або будь-якими іншими тестовними типами клітин (Workman, C.J. et al. (2009) "LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis", J. Immunol. 182(4):1885-1891).

Було виявлено, що LAG-3 є близькоспорідненим із Т-клітинним корецептором CD4 (Grosso, J.F. et al. (2009) "Functionally Distinct LAG-3 and PD-1 Subsets on Activated and Chronically Stimulated CD8 T-Cells", J. Immunol. 182(11):6659-6669; Huang, C.T. et al. (2004) "Role Of LAG-3 In Regulatory T-Cells", Immunity 21:503-513; Workman, C.J. et al. (2009) "LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis", J. Immunol. 182(4):1885-1891). Як і CD4, LAG-3 також зв'язується з молекулами MHC II класу, але із значно вищою афінністю (Workman, C.J. et al. (2002) "Phenotypic Analysis Of The Murine CD4-Related Glycoprotein, CD223 (LAG-3)", Eur. J. Immunol. 32:2255-2263; Huard, B. et al. (1995) "CD4/Major Histocompatibility Complex Class II Interaction Analyzed With CD4- And Lymphocyte Activation Gene-3 (LAG-3)-Ig Fusion Proteins", Eur. J. Immunol. 25:2718-2721; Huard, B. et al. (1994) "Cellular Expression And Tissue Distribution Of The Human LAG-3-Encoded Protein, An MHC Class II Ligand", Immunogenetics 39:213-217).

Дослідження показали, що LAG-3 відіграє важливу роль у негативній регуляції проліферації, функціонуванні та гомеостазі Т-клітин (Workman, C.J. et al. (2009) "LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homeostasis", J. Immunol. 182(4):1885-1891; Workman, C.J. et al. (2002) "Cutting Edge: Molecular Analysis Of The Negative Regulatory Function Of Lymphocyte Activation Gene-3", J. Immunol. 169:5392-5395; Workman, C.J. et al. (2003) "The CD4-Related Molecule, LAG-3 (CD223), Regulates The Expansion Of Activated T-Cells", Eur. J. Immunol. 33:970-979; Workman, C.J. (2005) "Negative Regulation Of T-Cell Homeostasis By Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223)", J. Immunol. 174:688-695; Hannier, S. et al. (1998) "CD3/TCR Complex-Associated Lymphocyte Activation Gene-3 Molecules Inhibit CD3/TCR Signaling", J. Immunol. 161:4058-4065; Huard, B. et al. (1994) "Lymphocyte-Activation Gene 3/Major Histocompatibility Complex Class II Interaction Modulates The Antigenic Response Of CD4⁺ T Lymphocytes", Eur. J. Immunol. 24:3216-3221).

Результати досліджень дозволили зробити висновок, що інгібування функції LAG-3 шляхом блокування антитілом може повністю обертати опосередковане LAG-3 інгібування імунної системи та частково відновлювати ефекторну функцію (Grosso, J.F. et al. (2009) "Functionally Distinct LAG-3 and PD-1 Subsets on Activated and Chronically Stimulated CD8 T-Cells", J. Immunol. 182(11):6659-6669; Grosso, J.F. et al. (2007) "LAG-3 Regulates CD8⁺ T-Cell Accumulation And Effector Function During Self And Tumor Tolerance", J. Clin. Invest. 117:3383-3392). Було виявлено, що LAG-3 негативно регулює розмноження Т-клітин шляхом інгібування індукованих Т-клітинним рецептором (TCR) викидів кальцію та контролює розмір пулу Т-клітин пам'яті (Matsuzaki, J. et al. (2010) "Tumor-Infiltrating NY-ESO-1-Specific CD8⁺ T-Cells Are Negatively Regulated By LAG-3 And PD-1 In Human Ovarian Cancer", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 107(17):7875-7880; Workman C.J., et al. (2004) "Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223) Regulates The Size Of The Expanding T-Cell Population Following Antigen Activation in vivo", J. Immunol. 172:5450-5455).

Незважаючи на раніше описані переваги, зберігається потреба в удосконалених композиціях, здатних сильніше змушувати імунну систему організму атакувати клітини злоякісної пухлини або інфіковані патогеном клітини, особливо у нижчих терапевтичних концентраціях. І хоча адаптивна імунна система може бути сильним захисним механізмом проти злоякісної пухлини та захворювання, вона часто призупиняється імуносупресивними механізмами у пухлинному мікрооточенні, такими як експресія PD-1 і LAG-3. Коінгібуючі молекули, що експресуються клітинами пухлини, імуніцитами та стромальними клітинами у пухлинному середовищі, можуть переважно зменшувати Т-клітинні відповіді до клітин злоякісної пухлини.

Як детально описано далі, даний винахід відноситься до вирішення такої потреби шляхом створення біспецифічного тетравалентного діатіла PD-1 × LAG-3. Такі діатіла здатні зв'язуватися з молекулами PD-1 і LAG-3 на поверхні клітин, які присутні на поверхнях виснажених і толерантних протипухлинних ефекторних лімфоцитів, і таким чином зменшувати здатність таких молекул на поверхні клітин зв'язуватися з їх рецепторними лігандами. Фактично, біспецифічні діатіла PD-1 × LAG-3 за даним винаходом сприяють блокуванню опосередкованого PD-1 і LAG-3 інгібування імунної системи і таким чином сприяють тривалій активації імунної системи. Ця якість робить такі біспецифічні діатіла корисними при лікуванні злоякісної пухлини

та патоген-асоційованих захворювань і станів. Даний винахід відноситься до таких діатіл і способів їх застосування.

Короткий опис графічних матеріалів

На фіг. 1 показано графічне представлення доменів основного DART®.

5 На фіг. 2 показано графічне представлення доменів Fc-несучих DART®.

На фіг. 3 показано графічне представлення доменів Fc-DART®.

10 На фіг. 4 показано графічне представлення доменів переважного біспецифічного тетравалентного діатіла PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом. Чотири поліпептидні ланцюги, два з яких мають домени поліпептидних ланцюгів 1 і 3, і два з яких мають домени поліпептидних ланцюгів 2 і 4, утворюють комплекс один з одним із формуванням діатіла. Дисульфідні зв'язки (показані пунктирними лініями) ковалентно з'єднують поліпептидні ланцюги 1 і 2, поліпептидні ланцюги 1 і 3 і поліпептидні ланцюги 3 і 4. Варіабельні домени легкого ланцюга та варіабельні домени важкого ланцюга одного та того ж поліпептидного ланцюга спрямовані на різні епітопи (або PD-1, або LAG-3), так щоб отримане в результаті діатіло мало два епітоп-зв'язувальних домени, які є імуноспецифічними до PD-1, і два епітоп-зв'язувальних домени, які є імуноспецифічними до LAG-3.

На фіг. 5 показана діаграма протоколу оцінки здатності антитіл до PD-1 і до LAG-3 посилювати проліферацію Т-клітин.

20 На фіг. 6 показано, що додавання PD-1 mAb 1 (5C4; BMS-936558), PD-1 mAb 2 (MK-3475; Merck, ламбrolізумабу) і PD-1 mAb 3 (EH12.2H7; Dana Farber) на початку аналізу ало-MLR індукувало сильну Т-клітинну проліферативну відповідь у порівнянні з контрольним антитілом ізотипу IgG1. Також показані проліферативні відповіді, отримані за допомогою PD-1 mAb 4 (CT-011; CureTech, BAT-1), mAb до CTLA і LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS). Імунокомпетентні клітини (R) являють собою пан-Т-клітини; стимулюючі клітини (S) є зрілими дендритними клітинами (mDC).

25 На фіг. 7 показані результати оцінки LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS) щодо Т-клітинного проліферативного потенціалу або окремо, або разом із PD-1 mAb 1 (5C4; BMS-936558), PD-1 mAb 2 (MK-3475; Merck, ламбrolізумабом). Імунокомпетентні клітини (R) являють собою пан-Т-клітини; стимулюючі клітини (S) є зрілими дендритними клітинами (mDC).

30 На фіг. 8 показано, що розчинний LAG-3 (shLAG-3) людини, який зв'язується з молекулами HLA II класу людини, які експресуються як на APC, так і на CD4 Т-клітинах, індукував сильну проліферативну відповідь у порівнянні з контрольними лунками з ізотипом IgG або імунокомпетентними клітинами (R) (пан-Т-клітинами) плюс стимулятор (S) (зрілі дендритні клітини (mDC)).

35 На фіг. 9A-9B показано, що біспецифічні діатіла PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом індукували високоактивні Т-клітинні проліферативні відповіді у порівнянні з mAb до PD-1 (5C4) або mAb до LAG-3 (25F7). На фіг. 9A показані Т-клітинні проліферативні відповіді, отримані за допомогою переважних біспецифічних тетравалентних діатіл PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом (PD-1 $\times$ LAG-Fc-DART®-1 і PD-1 $\times$ LAG-Fc-DART®-2), PD-1 mAb 1 (5C4; BMS-936558), LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS), розчинного LAG-3 (ShLAG-3) людини, контрольних IgG, імунокомпетентних + стимулюючих клітин (пан-Т-клітин і зрілих дендритних клітин; R + S) і стимулюючих клітин (зрілих дендритних клітин; S). На фіг. 9B показані ті ж дані для PD-1 $\times$ LAG-Fc-DART®-1 і PD-1 $\times$ LAG-Fc-DART®-2, PD-1 mAb 1 (5C4; BMS-936558), LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS) і PD-1 mAb 1 (5C4; BMS-936558) + LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS) з використанням іншої шкали за віссю у.

45 Коротке розкриття даного винаходу

Даний винахід відноситься до біспецифічних діатіл, які містять два або більше поліпептидних ланцюгів і які мають щонайменше один епітоп-зв'язувальний сайт, який є імуноспецифічним до епітопу PD-1, і щонайменше один епітоп-зв'язувальний сайт, який є імуноспецифічним до епітопу LAG-3 (тобто до «біспецифічного діатіла PD-1 $\times$ LAG-3»). Більш переважно даний винахід відноситься до біспецифічних діатіл, які містять чотири поліпептидні ланцюги та які мають два епітоп-зв'язувальні сайти, які є імуноспецифічними до одного (або двох) епітопу(-ів) PD-1, і два епітоп-зв'язувальні сайти, які є імуноспецифічними до одного (або двох) епітопу(-ів) LAG-3 (тобто до «біспецифічного тетравалентного діатіла PD-1 $\times$ LAG-3»). Даний винахід також відноситься до таких діатіл, що додатково містять імуноглобуліновий Fc-домени (до «біспецифічних Fc-діатіл» і «біспецифічних тетравалентних Fc-діатіл»). Діатіла за даним винаходом здатні водночас зв'язуватися з PD-1 і з LAG-3, зокрема оскільки такі молекули розташовані на поверхнях клітин людини. Даний винахід відноситься до фармацевтичних композицій, що містять такі діатіла, та до способів, які передбачають застосування таких діатіл для лікування злоякісної пухлини та інших захворювань і станів.

Детальніше, даний винахід відноситься до біспецифічного Fc-діатіла, здатного імуноспецифічно зв'язуватися з епітопом PD-1 і з епітопом LAG-3, причому діатіло містить чотири поліпептидні ланцюги, кожний з яких має N-кінець і C-кінець, і в якому:

(A) перший і другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один з одним, перший і третій поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один з одним, і третій і четвертий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один з одним;

(B) кожний з першого та третього поліпептидних ланцюгів діатіла містить у напрямку від N-кінця до C-кінця варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до PD-1 або LAG-3, варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до LAG-3 або PD-1, домен, який полегшує утворення гетеродимеру, та домен CH2-CH3, причому варіабельні домени легкого ланцюга та варіабельні домени важкого ланцюга не здатні асоціюватися з формуванням епітоп-зв'язувального сайту, здатного зв'язувати епітоп PD-1 або епітоп LAG-3; і

(C) кожний з другого та четвертого поліпептидних ланцюгів діатіла містить у напрямку від N-кінця до C-кінця варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до PD-1 або LAG-3, варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до LAG-3 або PD-1, і домен, який полегшує утворення гетеродимеру, причому варіабельні домени легкого ланцюга та варіабельні домени важкого ланцюга не здатні асоціюватися з формуванням епітоп-зв'язувального сайту, здатного зв'язувати епітоп PD-1 або епітоп LAG-3;

і в якому:

(I) (1) варіабельний домен легкого ланцюга першого поліпептидного ланцюга та варіабельний домен важкого ланцюга другого поліпептидного ланцюга асоціюються з формуванням першого епітоп-зв'язувального сайту, а варіабельний домен важкого ланцюга першого поліпептидного ланцюга та варіабельний домен легкого ланцюга другого поліпептидного ланцюга асоціюються з формуванням другого епітоп-зв'язувального сайту; та

(2) варіабельний домен легкого ланцюга третього поліпептидного ланцюга та варіабельний домен важкого ланцюга четвертого поліпептидного ланцюга асоціюються з формуванням третього епітоп-зв'язувального сайту, а варіабельний домен важкого ланцюга третього поліпептидного ланцюга та варіабельний домен легкого ланцюга четвертого поліпептидного ланцюга асоціюються з формуванням четвертого епітоп-зв'язувального сайту;

причому два сформованих епітоп-зв'язувальних сайти здатні імуноспецифічно зв'язуватися з епітопом PD-1, а два сформованих епітоп-зв'язувальних сайти здатні імуноспецифічно зв'язуватися з епітопом LAG-3;

II. домени, які полегшують утворення гетеродимеру, у першому та другому поліпептидних ланцюгах відрізняються і мають амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з: SEQ ID NO:16 і SEQ ID NO:17; і

III. домени CH2-CH3 у першому та третьому поліпептидних ланцюгах асоціюються з формуванням Fc-домени.

Даний винахід також відноситься до варіанту здійснення такого біспецифічного Fc-діатіла, в якому кожен з доменів CH2-CH3 у першому та третьому поліпептидних ланцюгах має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:24.

Даний винахід також відноситься до варіанту здійснення таких біспецифічних Fc-діатілів, в яких варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до LAG-3, має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:11, а варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до LAG-3, має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:12.

Даний винахід також відноситься до варіанту здійснення таких біспецифічних Fc-діатілів, в яких варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до PD-1, має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:2, а варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до PD-1, має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3.

Даний винахід також відноситься до фармацевтичної композиції, яка містить ефективну кількість будь-якого із зазначених вище Fc-діатілів і фармацевтично прийнятний носій.

Даний винахід також відноситься до варіанту здійснення такої фармацевтичної композиції, в якій ефективна кількість біспецифічного Fc-діатіла являє собою кількість, ефективну для лікування злоякісної пухлини в індивідуума, який її приймає та який потребує такого лікування.

Даний винахід також відноситься до варіанту здійснення таких фармацевтичних композицій, причому злоякісна пухлина являє собою злоякісну пухлину надниркової залози, асоційовану зі СНІДом злоякісну пухлину, альвеолярну саркому м'яких тканин, астроцитарну пухлину, злоякісну пухлину сечового міхура, злоякісну пухлину кісток, злоякісну пухлину головного та спинного мозку, метастатичну пухлину головного мозку, злоякісну пухлину молочної залози, пухлину каротидного тільця, злоякісну пухлину шийки матки, хондросаркому, хордому,

хромофобну нирково-клітинну карциному, світлоклітинну карциному, злоякісну пухлину товстої кишки, колоректальну злоякісну пухлину, наскірну доброякісну фіброзну гістіоцитому, десмопластичну дрібнокруглоклітинну пухлину, епендіому, пухлину Юінга, позаскелетну слизоподібну хондросаркому, недосконалий кістковий фіброгенез, фіброзну дисплазію кістки, злоякісну пухлину жовчного міхура або жовчної протоки, гастральну злоякісну пухлину, гестаційну трофобластичну хворобу, ембріонально-клітинну пухлину, злоякісну пухлину голови та шиї, гепатоклітинну карциному, пухлину острівців підшлункової залози, саркому Капоші, злоякісну пухлину нирки, лейкоз, ліпому/доброякісну ліпоматозну пухлину, ліпосаркому/злоякісну ліпоматозну пухлину, злоякісну пухлину печінки, лімфому, злоякісну пухлину легені, гранулобластому, меланому, менінгіому, множинні ендокринні неоплазії, множинну мієлому, мієлодиспластичний синдром, нейробластому, нейроендокринні пухлини, злоякісну пухлину яєчника, злоякісну пухлину підшлункової залози, соскоподібну карциному щитоподібної залози, пухлину парашитоподібних залоз, злоякісну пухлину у дітей, пухлину піхви периферичного нерва, феохромоцитому, пухлину гіпофіза, злоякісну пухлину простати, пізню увеальну меланому, порушення, пов'язане з розрідженням крові, ниркову метастатичну злоякісну пухлину, паличкоподібну пухлину, рабдоміосаркому, саркому, злоякісну пухлину шкіри, саркому м'якої тканини, плоскоклітинну злоякісну пухлину, злоякісну пухлину шлунка, синовіальну саркому, злоякісну пухлину яєчка, тимусну карциному, тімому, метастатичну злоякісну пухлину щитоподібної залози або злоякісну пухлину матки.

Даний винахід також відноситься до варіанту здійснення таких фармацевтичних композицій, в яких ефективна кількість біспецифічного Fc-діатіла є кількістю, ефективною для лікування захворювання, асоційованого з наявністю патогену, в індивідуума, який її приймає та який потребує такого лікування.

Даний винахід також відноситься до варіанту здійснення такої фармацевтичної композиції, причому зазначеним патогеном є бактерія, гриб або вірус.

Даний винахід також відноситься до способу лікування злоякісної пухлини, який передбачає введення ефективної кількості таких фармацевтичних композицій індивідууму, який цього потребує.

Даний винахід також відноситься до способу лікування захворювання, асоційованого з наявністю патогену, який передбачає введення ефективної кількості фармацевтичної композиції за будь-яким з пунктів 8-9 формули винаходу індивідууму, який того потребує.

Докладне розкриття даного винаходу

Даний винахід відноситься до біспецифічних діатіл, які містять два або більше поліпептидних ланцюгів і які мають щонайменше один епітоп-зв'язувальний сайт, який є імуноспецифічним до епітопу PD-1, і щонайменше один епітоп-зв'язувальний сайт, який є імуноспецифічним до епітопу LAG-3 (тобто до «біспецифічного діатіла PD-1 × LAG-3»). Більш переважно даний винахід відноситься до біспецифічних діатіл, які містять чотири поліпептидні ланцюги і які мають два епітоп-зв'язувальні сайти, які є імуноспецифічними до одного (або двох) епітопу(-ів) PD-1, і два епітоп-зв'язувальні сайти, які є імуноспецифічними до одного (або двох) епітопу(-ів) LAG-3 (тобто до «біспецифічного тетравалентного діатіла PD-1 × LAG-3»). Даний винахід також відноситься до таких діатіл, що додатково містять імуноглобуліновий Fc-домен (до «біспецифічних Fc-діатіл» і «біспецифічних тетравалентних Fc-діатіл»). Діатіла за даним винаходом здатні водночас зв'язуватися з PD-1 і з LAG-3, зокрема оскільки такі молекули розташовані на поверхнях клітин людини. Даний винахід відноситься до фармацевтичних композицій, що містять такі діатіла, та до способів, які передбачають застосування таких діатіл для лікування злоякісної пухлини та інших захворювань і станів.

Біспецифічні діатіла за даним винаходом здатні водночас зв'язуватися з PD-1 і з LAG-3, зокрема оскільки такі молекули розташовані на поверхнях клітин людини. Даний винахід відноситься до фармацевтичних композицій, що містять такі діатіла, та до способів, які передбачають застосування таких діатіл для лікування злоякісної пухлини та інших захворювань і станів. Так, зокрема, біспецифічні діатіла PD-1 × LAG-3 за даним винаходом містять поліпептидні ланцюги, які ковалентно з'єднані у комплекс.

Як було розглянуто вище, для Т-клітинної активації необхідні два різних сигнали. Перший сигнал забезпечується Т-клітинним рецептором (TCR), що експресується на поверхні Т-клітини, яка розпізнала пептидний антиген у контексті головного комплексу гістосумісності у людини (HLA), експресованого на антиген-презентуючій клітині (APC). Другий сигнал забезпечується в результаті взаємодії когнатних пар костимулюючих лігандів: B7-1 і B7-2, що експресуються на APC, і їх відповідних рецепторів: CD28 і CTLA-4, що експресуються на Т-клітинах.

У такому напрямку рецептор-ліганд взаємодія B7-костимулюючих молекул з рецептором CD28 може стимулювати Т-клітинну проліферацію і згодом індукувати експресію CTLA-4,

негативного регулятора та протирецептора для CD28, який сильно конкурує за ліганди B7-1 і B7-2, так щоб «поступово зводить нанівець» Т-клітинну активацію і проліферативні відповіді. Було показано, що антитіла-агоністи, які зв'язують CD28, індують Т-клітинну ефекторну функцію і посилюють вироблення імунітету для знищення пухлини та за своєю природою є

5 костимулюючими. У свою чергу, антагоністи, які блокують взаємодію CTLA-4, можуть перешкоджати дезактивації у Т-клітин їх ефекторних функцій, у той же час зберігаючи тривалу проліферацію, що може призвести до аутоімунної реакції.

Поряд з напрямком CTLA-4: B7-1/B7-2, функція якого полягає в активації імунної системи при нормальному гомеостазі і в фазі примування імунної відповіді проти антигену, функція

10 другого напрямку рецептор-ліганд полягає в інгібуванні імунної системи, таким чином виконуючи роль точки протидії для CTLA-4 у ході ефекторної фази імунної відповіді. Цей другий напрямок включає зв'язування рецептора білка запрограмованої загибелі клітин 1 (PD-1), що експресується на поверхні Т-клітин, з його відповідними лігандами: PD-L1 і PD-L2, які експресуються відповідно на антиген-презентуючих клітинах (APC) і епітеліальних клітинах

15 (Chen L. et al. (2013) "Molecular Mechanisms Of T-Cell Co-Stimulation And Co-Inhibition", *Nature Reviews Immunology* 13(4):227-242). На відміну від антитіл-агоністів, які зв'язуються з CD28, стимулюючи Т-клітинні відповіді, антитіла, які зв'язуються або з PD-1, або з PD-L1, антагонізують або блокують взаємодію PD-1/PD-L1, здатні підтримувати Т-клітинні відповіді, запобігаючи доставці негативного сигналу до Т-клітин. Це посилює або підтримує Т-клітинну

20 проліферацію, цитотоксичність і секрецію цитокінів. Всі разом антитіла-агоністи, такі як антитіла до CD28, цілеспрямовано впливають на позитивні сигнальні шляхи і, таким чином, є костимуляторами, у той час як антагоністичні антитіла, такі як антитіла до PD-1, цілеспрямовано впливають на негативні сигнальні шляхи і називаються контрольними інгібіторами.

Незважаючи на те, що CTLA-4 і PD-1 є канонічними контрольними інгібіторами, існує

25 зростаюче сімейство модулюючих імунітет пар рецептор-ліганд. Розглянутий вище продукт гена активації лімфоцитів 3 (LAG-3) є додатковою ціллю контрольного інгібітора, що експресується на Т-клітинах, яка зв'язується з молекулами HLA II класу, які експресуються на APC. LAG-3 спільно експресується з PD-1 на виснажених і толерантних протипухлинних ефекторних лімфоцитах («TIL») (Matsuzaki, J. et al. (2010) "Tumor-Infiltrating NY-ESO-1-Specific CD8+ T-Cells Are Negatively Regulated by LAG-3 and PD-1 in Human Ovarian Cancer", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 107(17):7875-7880; Okazaki, T. et al. (2011) "PD-1 and LAG-3 inhibitor Coreceptors Act Synergistically To Prevent Autoimmunity In Mice", *J. Exp. Med.* 208 (2): 395-407) і повідомлялось про експресію LAG-3 на Т-регуляторних клітинах, яка грає певну роль як в імунології пухлини,

30 так і в аутоімунній реакції. На тваринних моделях було продемонстровано, що антитіло до LAG-3 індукує сильний протипухлинний імунітет, якого достатньо для уповільнення пухлинного росту та який, в поєднанні з mAb до PD-1, навіть може запускати повну регресію пухлини (Woo, S.R. et al. (2012) "Immune Inhibitory Molecules LAG-3 And PD-1 Synergistically Regulate T-Cell Function To Promote Tumoral Immune Escape", *Cancer Res.* 72(4):917-927). Комбіновані терапії, що передбачають використання mAb до LAG-3, BMS-986016, в даний час знаходяться на ранній

40 фазі клінічного дослідження або окремо, або в поєднанні з mAb до PD-1 (ніволумаб/BMS-936558) (див. Creelan, B.C. (2014) "Update on Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer", *Cancer Control* 21(1):80-89).

Такі біспецифічні діатіла за даним винаходом здатні зв'язуватися з молекулами PD-1 і LAG-3 на поверхні клітин, які присутні на поверхнях виснажених і толерантних протипухлинних

45 ефекторних лімфоцитів, і таким чином зменшувати здатність таких молекул на поверхні клітин зв'язуватися з їх рецепторними лігандами. Фактично, біспецифічні діатіла PD-1 × LAG-3 за даним винаходом здатні послаблювати опосередковане PD-1 і LAG-3 інгібування імунної системи та сприяють тривалій активації імунної системи.

I. Загальні методики та загальні визначення

Практичне здійснення даного винаходу буде стосуватися, якщо не зазначено інше, традиційних методик молекулярної біології (включаючи рекомбінантні методики), мікробіології, цитології, біохімії та імунології, які відомі фахівцям у даній галузі. Такі методики повністю

50 описані в літературних джерелах, таких як *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition* (Sambrook et al. Eds., 2001) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications (Methods in Molecular Biology)*, Herdewijn, P., Ed., Humana Press, Totowa, NJ; *Oligonucleotide Synthesis* (Gait, M.J., Ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (Cellis, J.E., Ed., 1998) Academic Press, New York, NY; *Animal Cell Culture* (Freshney, R.I., Ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (Mather, J.P. and Roberts, P.E., Eds., 1998) Plenum Press, New York, NY; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (Doyle, A. et al., Eds., 1993-8) John Wiley and Sons, Hoboken, NJ;

60

Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.) New York, NY; Weir's Handbook of Experimental Immunology (Herzenberg, L.A. et al. Eds. 1997) Wiley-Blackwell Publishers, New York, NY; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller, J.M. et al. Eds., 1987) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. et al., Eds., 1987) Greene Pub. Associates, New York, NY; PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, K. et al., Eds., 1994) Birkhäuser, Boston MA; Current Protocols in Immunology (Coligan, J.E. et al., eds., 1991) John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Short Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, 1999) Hoboken, NJ; Immunobiology 7 (Janeway, C.A. et al. 2007) Garland Science, London, UK; Antibodies (P. Finch, 1997) Stride Publications, Devoran, UK; Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., 1989) Oxford University Press, USA, New York NY; Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (Shepherd, P. et al. Eds., 2000) Oxford University Press, USA, New York NY; Using Antibodies: A Laboratory Manual (Harlow, E. et al. Eds., 1998) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; The Antibodies (Zanetti, M. et al. Eds. 1995) Harwood Academic Publishers, London, UK); и DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology, Eighth Edition, DeVita, V. et al. Eds. 2008, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

У контексті даного документа «антитіла» являють собою імуноглобулінові молекули, здатні специфічно зв'язуватися із ціллю, такою як вуглевод, полінуклеотид, ліпід, поліпептиди і т. і., за допомогою щонайменше одного антиген-розпізнавального сайту, розташованого у варіабельній ділянці імуноглобулінової молекули. Застосовуваний у даному документі термін охоплює не лише інтактні поліклональні або моноклональні антитіла, але також їх мутантні форми, варіанти, що зустрічаються у природі, гібридні білки, що містять частину антитіла з антиген-розпізнавальним сайтом з необхідною специфічністю, гуманізовані антитіла та химерні антитіла та будь-яку модифіковану конфігурацію імуноглобулінової молекули, яка містить антиген-розпізнавальний сайт з необхідною специфічністю. Антитіла, які зустрічаються в природі, зазвичай містять дві копії «важкого» («H») поліпептидного ланцюга та дві копії «легкого» («L») поліпептидного ланцюга. Кожний легкий ланцюг складається з варіабельної ділянки легкого ланцюга («VL») і константної ділянки легкого ланцюга («CL»), кожний важкий ланцюг складається з варіабельної ділянки важкого ланцюга («VH») і константної ділянки важкого ланцюга, яка зазвичай складається з трьох доменів (CH1, CH2 і CH3). Домени CH2 і CH3 поліпептидів важкого ланцюга взаємодіють один з одним із формуванням Fc-ділянки, яка здатна зв'язуватися з Fc-рецепторами, присутніми на поверхнях клітин імунної системи.

Здатність інтактного немодифікованого антитіла (наприклад, IgG) зв'язувати епітоп антигену залежить від наявності варіабельних доменів на імуноглобулінових легкому і важкому ланцюгах (тобто відповідно доменів VL і VH). При взаємодії легкого ланцюга антитіла та важкого ланцюга антитіла та, зокрема, взаємодії його доменів VL і VH формується один з епітоп-зв'язувальних сайтів антитіла. На відміну від цього, «scFv» фрагмент антитіла містить домен VL і VH антитіла, що входить до складу одного поліпептидного ланцюга, причому домени розділені гнучким лінкером з достатньою довжиною, щоб уможливити самозбирання двох доменів у функціональний епітоп-зв'язувальний сайт.

Якщо самозбирання доменів VL і VH є неможливим через лінкер з недостатньою довжиною (менше приблизно 12 амінокислотних залишків), дві scFv-конструкції взаємодіють одна з одною з формуванням «діатіла», яке являє собою бівалентну молекулу, в якій VL одного ланцюга асоціюється з VH іншого (розглянуто в Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies", Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658).

Окрім їх відомих застосувань в діагностиці було показано, що антитіла придатні як терапевтичні засоби. За останні кілька десятиліть спостерігається відновлення інтересу до терапевтичного потенціалу антитіл, а антитіла стають одним з провідних класів отриманих за допомогою біотехнології лікарських засобів (Chan, C.E. et al. (2009) "The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases", Singapore Med. J. 50(7):663-666). Близько 200 лікарських засобів на основі антитіл були схвалені для застосування або знаходяться на стадії розробки.

Термін «моноклональне антитіло» відноситься до однорідної популяції антитіл, причому таке моноклональне антитіло складається з амінокислот (які зустрічаються в природі та які не зустрічаються в природі), що беруть участь у вибіркового зв'язуванні антигену. Моноклональні антитіла є високоспецифічними, при цьому спрямовані проти окремого антигенного сайту. Термін моноклональне антитіло охоплює не лише інтактні моноклональні антитіла та повнорозмірні моноклональні антитіла, але також їх фрагменти (такі як Fab, Fab', F(ab')₂ Fv), їх однокланові (scFv) мутантні форми, гібридні білки, що містять частину антитіла, гуманізовані моноклональні антитіла, химерні моноклональні антитіла та будь-яку модифіковану конфігурацію імуноглобулінової молекули, яка містить антиген-розпізнавальний сайт з необхідною специфічністю і зі здатністю зв'язуватися з антигеном. Не передбачено обмеження

щодо джерела антитіла або способу його отримання (наприклад, за допомогою гібридоми, фагового відбору, рекомбінантної експресії, трансгенних тварин і т. і.). Термін включає цілі імуноглобуліни, а також фрагменти і т. і., описані вище під визначенням «антитіло». Способи отримання моноклональних антитіл добре відомі у даній галузі. Одним способом, який можна

5 використувувати, є спосіб за Kohler, G. et al. (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity", Nature 256:495-497, або його модифікація.

Зазвичай моноклональні антитіла розробляють на мишах, щурах або кролях. Антитіла отримують шляхом імунізації тварини імуногенною кількістю клітин, клітинних екстрактів або білкових препаратів, які містять необхідний епітоп. Імуноген може являти собою без обмеження первинні клітини, культивовані лінії клітин, клітини злоякісної пухлини, білки, пептиди, нуклеїнові кислоти або тканину. Застосовувані для імунізації клітини можна культивувати протягом деякого періоду часу (наприклад, щонайменше 24 години) перед їх застосуванням як імуногена. Клітини можна застосовувати як імуногени окремо або у поєднанні з неденатуруючим ад'ювантом, таким як Ribi. У більшості випадків клітини слід зберігати інтактними та переважно життєздатними при застосуванні як імуногени. Інтактні клітини можуть забезпечити краще виявлення антигенів, ніж зруйновані клітини, у імунізованих тварин. Застосування денатуруючих або агресивних ад'ювантів, наприклад, ад'юванта Фрейнда, може зруйнувати клітини, а отже є небажаним. Імуноген можна вводити багаторазово з періодичними інтервалами, такими як раз на два тижні або щотижня, або можна вводити так, щоб зберігати життєздатність у тварини (наприклад, в тканинному рекомбінанті). Як альтернатива, існуючі моноклональні антитіла та будь-які еквівалентні антитіла, які є імуноспецифічними до необхідного патогенного епітопу, можна секвенувати й отримувати рекомбінантно за допомогою відомих у даній галузі способів. Згідно з одним варіантом здійснення таке антитіло секвенують, а полінуклеотидну послідовність потім клонують у вектор для експресії або розмноження. Послідовність, що кодує антитіло, яке становить інтерес, можна зберігати у векторі в клітині-хазяїні, а клітину-хазяїна можна потім розмножити та заморозити для подальшого застосування. Полінуклеотидну послідовність таких антитіл можна застосовувати для генетичної маніпуляції з метою створення біспецифічних молекул за даним винаходом, а також химерного антитіла, гуманізованого антитіла або канінізованого антитіла для покращення афінності або інших характеристик антитіла. Основний принцип в гуманізації антитіла передбачає збереження основної послідовності епітоп-зв'язувальної частини антитіла, водночас замінюючи нелюдський залишок антитіла на людські послідовності антитіла. Існує чотири основних стадії гуманізації моноклонального антитіла. Вони такі: (1) визначення нуклеотидної і прогнозованої амінокислотної послідовності варіабельних доменів легкого та важкого ланцюга початкового антитіла, (2) конструювання гуманізованого антитіла або канінізованого антитіла, тобто прийняття рішення, яку каркасну ділянку антитіла використовувати в процесі гуманізації або канінізації, (3) власне методику/техніку гуманізації або канінізації і (4) трансфекція і експресія гуманізованого антитіла. Див., наприклад, патенти США № 4816567, 5807715, 5866692 та 6331415.

Природні антитіла здатні зв'язуватися лише з одним видом епітопу (тобто вони є моноспецифічними), тим не менш, вони можуть зв'язувати безліч копій такого виду (тобто характеризуються бівалентністю або мультівалентністю). Був розроблений широкий спектр рекомбінантних форматів біспецифічного антитіла (див., наприклад, публікації PCT № WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968), більшість з яких передбачає застосування лінкерних пептидів або для гібридизації центральної частини антитіла (IgA, IgD, IgE, IgG або IgM) з додатковим зв'язувальним білком (наприклад, scFv), або для гібридизації, наприклад, двох Fab-фрагментів або scFv. Зазвичай такі підходи передбачають компроміси й альтернативи. Наприклад, у PCT публікаціях № WO 2013/174873, WO 2011/133886 і WO 2010/136172 розкрито, що використання лінкерів може викликати проблеми у терапевтичному плані, та повідомляється про триспецифічне антитіло, у якому домени CL і CH1 переключені з їх відповідних природних положень, а домени VL і VH були диверсифіковані (WO 2008/027236, WO 2010/108127), щоб уможливити їх зв'язування з більш ніж одним антигеном. Таким чином, у молекулах, які було розкрито у цих документах, специфічність зв'язування замінена на здатність зв'язувати додаткові види антигену. У PCT публікаціях № WO 2013/163427 і WO 2013/119903 розкрито модифікацію домену CH2 із включенням аддукту гібридного білка, що містить зв'язувальний домен. У документі зазначено, що домен CH2 імовірно відіграє лише мінімальну роль у посередництві ефекторних функцій. У PCT публікаціях № WO 2010/028797, WO2010028796 і WO 2010/028795 розкриті рекомбінантні антитіла, Fc-ділянки яких були замінені на додаткові домени VL і VH, для того щоб сформувати тривалентні зв'язувальні молекули. У PCT публікаціях № WO 2003/025018 і WO2003012069 розкриті рекомбінантні діатіла, окремі ланцюги яких містять scFv-домени. У PCT публікації № WO 2013/006544 розкриті

мультивалентні Fab-молекули, які синтезовані у вигляді окремого поліпептидного ланцюга, а потім піддані протеолізу з отриманням на виході гетеродимерних структур. Таким чином, у розкритих у цих документах молекулах замінена вся або деяка частина здатності опосередковувати ефекторну функцію на здатність зв'язувати додаткові види антигену. У РСТ публікаціях № WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 і WO 1991/003493 розкрито додавання додаткових зв'язувальних доменів або функціональних груп до антитіла або частини антитіла (наприклад, додавання діатіла до легкого ланцюга антитіла, або додавання додаткових VL і VH доменів у легкий і важкий ланцюги антитіла, або додавання гетерологічного гібридного білка або зв'язування у ланцюг між собою декількох Fab-доменів). Таким чином, у розкритих у цих документах молекулах замінена нативна структура антитіла на здатність зв'язувати додаткові види антигену.

Із рівня техніки також відомо про можливість отримання діатіл, які відрізняються від природних антитіл тим, що вони здатні зв'язувати два або більше різних видів епітопу (тобто характеризуються біспецифічністю або мультиспецифічністю на додаток до бівалентності або мультивалентності) (див., наприклад, Holliger et al. (1993) "Diabodies": Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Protein Eng Des Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange", Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy", Cancer Res. 69(12):4941-4944).

В основі будови діатіла лежать одноланцюгові фрагменти варіабельної ділянки (scFv). Такі молекули отримують шляхом з'єднання варіабельних ділянок легкого та/або важкого ланцюга за допомогою короткого з'єднувального пептиду. У роботі Bird et al. (1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242:423-426) описаний приклад з'єднувальних пептидів, які відіграють роль містка довжиною приблизно 3,5 нм між С-кінцем однієї варіабельної ділянки та N-кінцем іншої варіабельної ділянки. Були розроблені та використані лінкери з іншими послідовностями (Bird et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242:423-426). У свою чергу, лінкери можна модифікувати для додаткових функцій, таких як приєднання лікарських засобів або приєднання до твердих основ. Одноланцюгові варіанти можна отримати за допомогою або рекомбінантних, або синтетичних способів. Для синтетичного отримання scFv можна використовувати автоматичний синтезатор. Для рекомбінантного отримання scFv відповідну плазмідну, що містить полінуклеотид, який кодує scFv, можна ввести у відповідну клітину-хазяїна, або еукаріотичну, таку як дріжджова, рослинна клітина, клітина комахи або ссавця, або прокаріотичну, таку як E. coli. Полінуклеотиди, що кодують scFv, який становить інтерес, можуть бути отримані за допомогою стандартних процедур, таких як лігування полінуклеотидів. Отримані у результаті scFv можна виділити за допомогою стандартних методик очищення білка, які відомі у даній галузі.

У патенті США № 7585952 і патентній публікації США № 2010-0173978 розглянуті молекули scFv, які є імуноспецифічними до ErbB2. Був описаний тип молекули scFv під назвою «біспецифічні мобілізатори Т-клітин» («BiTE»), (WO 05/061547; Baeuerle, P et al. (2008) "BiTE: A New Class Of Antibodies That Recruit T-Cells", Drugs of the Future 33: 137-147; Bargou, et al. 2008) "Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T-Cell-Engaging Antibody", Science 321: 974-977). Такі молекули складаються з одноланцюгової поліпептидної молекули з двома антиген-зв'язувальними доменами, один з яких імуноспецифічно зв'язується з епітопом CD3, а другий імуноспецифічно зв'язується з антигеном, присутнім на поверхні цільової клітини.

Створення немоноспецифічних діатіл забезпечує значну перевагу: можливість спільно лігувати та спільно локалізувати різні епітопи. Бівалентні діатіла, таким чином, мають широкий спектр застосувань, включаючи терапію та імунодіагностику. Бівалентність забезпечує хорошу свободу дій при розробці та конструюванні діатіл у різних застосуваннях, забезпечуючи підвищену авідність щодо мультимерних антигенів, зшивання різних антигенів і спрямовану дію щодо конкретних типів клітин, в основі якої полягає наявність обох цільових антигенів. Завдяки

їх підвищеній валентності, низьких швидкостях дисоціації та швидкому виведенню з кровотоку (для діатіл невеликого розміру, розміром ~50 кДа або менше), для молекул діатіл, як відомо з рівня техніки, було також продемонстровано конкретне застосування в галузі візуалізації пухлин (Fitzgerald et al. (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*", *Protein Eng.* 10:1221).

Бівалентність діатіл підштовхнула до їх використання для спільного лігування різних клітин, наприклад, зшивання цитотоксичних Т-клітин з пухлинними клітинами (Staerz et al. (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T-Cells", *Nature* 314:628-631, i Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", *Protein Eng.* 9: 299-305). Так, наприклад, епітоп-зв'язувальні домени діатіла можуть бути націлені на поверхневу детермінанту будь-якої імунної ефекторної клітини, такої як CD3, CD16, CD32 або CD64, які експресуються на Т-лімфоцитах, натуральних кілерах (NK) або інших моноклеарних клітинах. У багатьох дослідженнях також було виявлено, що діатіло, яке зв'язується із детермінантами ефекторних клітин, наприклад, Fc γ -рецепторами (Fc γ R), активує ефекторну клітину (Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", *Protein Eng.* 9:299-305; Holliger et al. (1999) "Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 $\times$ Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 $\times$ Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins", *Cancer Res.* 59:2909-2916; WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068). У нормі активація ефекторних клітин запускається при зв'язуванні антитіла, що зв'язується з антигеном, з ефекторною клітиною у результаті Fc-Fc γ R взаємодії; таким чином, у цьому відношенні молекули діатіла можуть характеризуватися Ig-подібною функціональністю, незалежно від того, чи містять вони Fc-домени (наприклад, за результатами будь-якого аналізу ефекторної функції, який відомий з рівня техніки або проілюстрований у даному документі (наприклад, аналізу ADCC)). При зшиванні пухлинних і ефекторних клітин діатіло не тільки приводить ефекторну клітину у безпосередню близькість до пухлинних клітин, але спричиняє ефективний цитоліз пухлини (див., наприклад, Cao et al. (2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics", *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55:171-197).

Проте, описані вище переваги досягаються за рахунок інших втрат. Для формування таких немоноспецифічних діатіл необхідне успішне збирання двох або більше окремих і різних поліпептидів (тобто для такого формування необхідно, щоб діатіла формувалися шляхом гетеродимеризації різних видів поліпептидних ланцюгів). Цей факт не притаманний моноспецифічним діатілам, які формуються шляхом гомодимеризації ідентичних поліпептидних ланцюгів. Оскільки має бути щонайменше два несхожих поліпептиди (тобто два різновиди поліпептиду) для формування немоноспецифічного діатіла, й оскільки гомодимеризація таких поліпептидів призводить до формування неактивних молекул (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", *Protein Eng.* 13 (8): 583-588), отримання таких поліпептидів необхідно здійснювати таким чином, щоб запобігти ковалентному зв'язуванню між поліпептидами одного різновиду (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", *Protein Eng.* 13(8):583-588).

Так, з рівня техніки відома нековалентна асоціація таких поліпептидів (див., наприклад, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Abstract 3P-683, *J. Biochem.* 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", *Protein Eng.* 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672). Проте, з того ж рівня техніки зрозуміло, що біспецифічні діатіла, що складаються з нековалентно асоційованих поліпептидів, є нестабільними та легко дисоціюють на нефункціональні мономери (див., наприклад, Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672).

Незважаючи на таку проблему, з рівня техніки відомо про успішну розробку стабільних, ковалентно зв'язаних гетеродимерних немоноспецифічних діатіл під назвою DART® (див., наприклад, патентні публікації США № 2013-0295121, 2010-0174053 і 2009-0060910; європейські патентні публікації № EP 2714079, EP 2601216, EP 2376109, EP 2158221 і PCT публікації № WO 2012/162068, WO 2012/018687, WO 2010/080538, і роботи Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of

Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma", Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold", Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion", J. Mol. Biol. 399(3):436-449). Такі діатіла містять два або більше поліпептидів, що утворюють комплекс за допомогою ковалентних зв'язків, і включають додавання одного або декількох цистеїнових залишків у кожний з використовуваних різновидів поліпептидів. Наприклад, було показано, що додавання цистеїнового залишку до С-кінця таких конструкцій забезпечує формування дисульфідного зв'язку між поліпептидними ланцюгами, стабілізуючи одержуваний у результаті гетеродимер, не впливаючи на характеристики зв'язування бівалентної молекули.

Кожен з двох поліпептидів найпростішого DART® містить три домени (фіг. 1). Перший поліпептид містить: (i) домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену легкого ланцюга першого імуноглобуліну (VL1), (ii) другий домен, який містить зв'язувальну ділянку варіабельного домену важкого ланцюга другого імуноглобуліну (VH2), і (iii) третій домен, який призначений для полегшення гетеродимеризації з другим поліпептидом і для ковалентного зв'язування першого поліпептиду з другим поліпептидом діатіла. Другий поліпептид містить комплементарний перший домен (домен VL2), комплементарний другий домен (домен VH1) і третій домен, який утворює комплекс із третім доменом першого поліпептидного ланцюга для полегшення гетеродимеризації та ковалентного зв'язування з першим поліпептидним ланцюгом. Такі молекули є стабільними, високоактивними та мають здатність водночас зв'язувати два або більше антигенів.

Згідно з одним варіантом здійснення кожен з третіх доменів першого та другого поліпептиду містить цистеїновий залишок, який призначений для зв'язування поліпептидів один з одним за допомогою дисульфідного зв'язку. Третій домен одного або обох поліпептидів може додатково мати послідовність домену CH2-CH3, так щоб при утворенні комплексу поліпептидів діатіла формувався Fc-домен, який здатний зв'язуватися з Fc-рецептором клітин (таких як В-лімфоцити, дендритні клітини, натуральні кілери, макрофаги, нейтрофіли, еозинофіли, базофіли та тучні клітини) (фіг. 2). Було описано безліч варіантів таких молекул (див., наприклад, патентні публікації США № 2013-0295121, 2010-0174053 і 2009-0060910; європейські патентні публікації № EP 2714079, EP 2601216, EP 2376109, EP 2158221 і РСТ публікації № WO 2012/162068, WO 2012/018687, WO 2010/080538). Такі Fc-несучі DART® можуть містити три поліпептидні ланцюги. Перший поліпептид такого діатіла містить три домени: (i) домен, що містить VL1, (ii) домен, що містить VL2, і (iii) домен, що містить послідовність CH2-CH3. Другий поліпептид такого DART® містить: (i) домен, що містить VL2, (ii) домен, що містить VL1, і (iii) домен, який полегшує гетеродимеризацію та ковалентне зв'язування з першим поліпептидним ланцюгом діатіла. Третій поліпептид такого DART® містить послідовність CH2-CH3. Таким чином, перший і другий поліпептидні ланцюги такого DART® утворюють комплекс один з одним із формуванням зв'язувального сайту VL1/VH1, який може зв'язуватися з одним епітопом, а також зв'язувального сайту VL2/VH2, який може зв'язуватися з другим епітопом. Перший і другий поліпептиди зв'язуються один з одним за допомогою дисульфідного зв'язку за участю цистеїнових залишків у їх відповідних третіх доменах. Слід зазначити, що перший і третій поліпептидні ланцюги утворюють комплекс один з одним із формуванням Fc-домену, який стабілізується за допомогою дисульфідного зв'язку. Такі діатіла мають підвищену активність. Такі Fc-несучі DART® можуть мати будь-яку з двох орієнтацій (таблиця 1):

Таблиця 1

Перша орієнтація	3-й ланцюг	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	1-й ланцюг	NH ₂ -VL1-VH2-домен, який полегшує утворення гетеродимеру-CH ₂ -CH ₃ -COOH
	2-й ланцюг	NH ₂ -VL2-VH1-домен, який полегшує утворення гетеродимеру-COOH
Друга орієнтація	3-й ланцюг	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	1-й ланцюг	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -VL1-VH2-домен, який полегшує утворення гетеродимеру-COOH
	2-й ланцюг	NH ₂ -VL2-VH1-домен, який полегшує утворення гетеродимеру-COOH

Також було описано ще більш складне DART® під назвою Fc-DART® (фіг. 3) (WO 2012/018687). Fc-DART® містять чотири поліпептидні ланцюги. Перший і третій поліпептидні

ланцюги такого діатіла містять три домени: (i) домен, що містить VL1, (ii) домен, що містить VL2, і (iii) домен, що містить послідовність CH2-CH3. Другий і четвертий поліпептид у Fc-DART® містять: (i) домен, що містить VL2, (ii) домен, що містить VL1, і (iii) домен, який полегшує гетеродимеризацію та ковалентне зв'язування з першим поліпептидним ланцюгом Fc-DART™.

Домени VL та/або VH третього та четвертого поліпептидних ланцюгів і домени VL і/або VH першого та другого поліпептидних ланцюгів можуть бути однаковими або відрізнятися так, щоб уможливити тетравалентне зв'язування, яке є або моноспецифічним, або біспецифічним, або тетраспецифічним (таблиця 2).

Таблиця 2

Біспецифічне	2-й ланцюг	NH ₂ -VL2-VH1-COOH
	1-й ланцюг	NH ₂ -VL1-VH2-[CH2-CH3]-COOH
	3-й ланцюг	NH ₂ -VL1-VH2-[CH2-CH3]-COOH
	4-й ланцюг	NH ₂ -VL2-VH1-COOH
Тетраспецифічне	2-й ланцюг	NH ₂ -VL2-VH1-COOH
	1-й ланцюг	NH ₂ -VL1-VH2-[CH2-CH3]-COOH
	3-й ланцюг	NH ₂ -VL3-VH4-[CH2-CH3]-COOH
	4-й ланцюг	NH ₂ -VL4-VH3-COOH

У всій даній заявці нумерація амінокислотних залишків легких і важких ланцюгів антитіла наведена згідно EU-індексу за Kabat et al. (1992) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health Publication No. 91-3242.

Терміни «поліпептид» і «пептид» використовуються у даному документі як взаємозамінні для позначення полімерів амінокислот із будь-якою довжиною, але переважно зі значеннями довжини, які перевищують 3, 5, 10, 15, 20 або 25 амінокислотних залишків. Полімер може бути лінійним або розгалуженим, він може містити модифіковані амінокислоти та може перериватися відмінними від амінокислот сегментами. Терміни також охоплюють амінокислотний полімер, який був модифікований природним чином або в результаті втручання, наприклад, формування дисульфідного зв'язку, глікозилювання, ліпідизації, ацетилювання, фосфорилування або будь-якої маніпуляції або модифікації, такої як кон'югація з компонентом, який має функцію мітки. Також у це визначення включені, наприклад, поліпептиди, що містять один або декілька аналогів амінокислоти (у тому числі, наприклад, амінокислоти, що не зустрічаються у природі, і т. і.), а також інші модифікації, відомі з рівня техніки. Поліпептиди за даним винаходом можуть зустрічатися у вигляді окремих ланцюгів або у вигляді утворених з ланцюгів комплексів.

Терміни «діатіло» і «DART™» були розглянуті раніше. DART® є типом діатіла, який містить щонайменше два поліпептидні ланцюги, які переважно утворюють комплекс один з одним шляхом ковалентної взаємодії з формуванням щонайменше двох епітоп-зв'язувальних сайтів, які можуть розпізнавати однакові або різні епітопи. Кожні два поліпептидні ланцюги діатіла або DART™ містять варіабельну ділянку імуноглобулінового легкого ланцюга та варіабельну ділянку імуноглобулінового важкого ланцюга, але ці ділянки не взаємодіють з формуванням епітоп-зв'язувального сайту (тобто вони не є «комплементарними» одна до одної). Скоріше, варіабельна ділянка імуноглобулінового важкого ланцюга одного (наприклад, першого) з поліпептидних ланцюгів діатіла або DART™ взаємодіє з варіабельною ділянкою імуноглобулінового легкого ланцюга іншого (наприклад, другого) поліпептидного ланцюга діатіла або DART™ з формуванням епітоп-зв'язувального сайту. Аналогічно, варіабельна ділянка імуноглобулінового легкого ланцюга одного (наприклад, першого) з поліпептидних ланцюгів діатіла або DART™ взаємодіє з варіабельною ділянкою імуноглобулінового важкого ланцюга іншого (наприклад, другого) поліпептидного ланцюга діатіла або DART™ з формуванням епітоп-зв'язувального сайту. Молекули DART™ розкриті у патентних публікаціях США № 2013-0295121, 2010-0174053 і 2009-0060910; європейських патентних публікаціях № EP 2714079, EP 2601216, EP 2376109, EP 2158221 і PCT публікаціях № WO 2012/162068, WO 2012/018687, WO 2010/080538, WO 2006/113665, WO 2008/157379 і в роботі Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma", Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold", Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; і Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion", J. Mol. Biol. 399(3):436-449.

Застосовувані у даному документі терміни «асоціація» або «асоціювання» щодо

поліпептидів (наприклад, одного поліпептиду діатіла з іншим, імуноглобулінового легкого ланцюга з імуноглобуліновим важким ланцюгом, одного домену CH2-CH3 з іншим доменом CH2-CH3 і т. д.) призначені для позначення нековалентного з'єднання поліпептидів. Терміни «утворює комплекси» або «комплексоутворення» призначені для позначення ковалентного з'єднання поліпептидів.

У контексті даного документа говорять, що діатіла за даним винаходом опосередковують «координоване зв'язування», якщо їх епітоп-зв'язувальні домени здатні паралельно зв'язуватися з їх відповідними розпізнаваними епітопами. Таке зв'язування може бути одночасним.

Епітоп-зв'язувальні домени діатіл за даним винаходом зв'язуються з їх розпізнаваними епітопами «імуноспецифічним» чином. У контексті даного документа кажуть, що антитіло, діатіло або інша епітоп-зв'язувальна молекула «імуноспецифічно» зв'язує ділянку іншої молекули (тобто епітоп), якщо вона вступає в реакцію або асоціюється частіше, швидше, на більш тривалий термін та/або з більшою афінністю з таким епітопом відносно альтернативних епітопів. Наприклад, антитіло, яке імуноспецифічно зв'язується з вірусним епітопом, є антитілом, яке зв'язує такий вірусний епітоп з більшою афінністю, авідністю, легше та/або на більш тривалий термін, ніж воно імуноспецифічно зв'язується з іншими вірусними епітопами або невірусними епітопами. Також при прочитанні цього визначення зрозуміло, що, наприклад, антитіло (або фрагмент, або епітоп), яке імуноспецифічно зв'язується з першою ціллю, може або не може специфічно або переважно зв'язуватися з другою ціллю. У зв'язку з цим, для «специфічного зв'язування» не завжди є потреба (хоча воно може і включати) у виключному зв'язуванні. Зазвичай, але не завжди, посилання на зв'язування означає «специфічне» зв'язування.

Різні імуноглобулінові домени таких молекул можуть бути отримані з імуноглобулінів будь-якого ізотипу або алотипу, включаючи без обмеження IgA, IgD, IgG, IgE і IgM. Згідно з переважними варіантами здійснення, які були розглянуті вище, такі імуноглобуліни отримані з імуноглобулінів IgG. Згідно з окремими варіантами здійснення використовуваним ізотипом IgG є IgG1, однак, також можна використовувати IgG інших ізотипів (наприклад, IgG2, IgG3 або IgG4 або їх алотип).

II. Переважні біспецифічні діатіла PD-1 × LAG-3 за даним винаходом

Даний винахід відноситься до біспецифічних діатіл PD-1 × LAG-3. Переважні біспецифічні діатіла PD-1 × LAG-3 за даним винаходом містять епітоп-зв'язувальні фрагменти антитіл, які надають їм можливість координаційно зв'язуватися з двома різними епітопами: епітопом PD-1 і епітопом LAG-3, для послаблення інгібуючих активностей у таких молекул. У контексті даного винаходу таке послаблення відноситься до зменшення щонайменше на 20%, зменшення щонайменше на 50%, зменшення щонайменше на 80% або зменшення щонайменше на 90% інгібуючої активності PD-1 і або LAG-3, яку можна детектувати, або повного усунення інгібуючої активності PD-1 і або LAG-3, яку можна детектувати.

A. Здатності до зв'язування у антитіло до PD-1

Відомі антитіла, які є імуноспецифічними до PD-1 (див., наприклад, патенти США № 8008449, № 8552154, патентні PCT публікації WO 2012/135408, WO 2012/145549 і WO 2013/014668). Додаткові необхідні антитіла можуть бути отримані шляхом виділення секретуючих антитіло гібридом, індукованих за допомогою PD-1 або його пептидного фрагмента. Людський PD-1 (що включає сигнальну послідовність з 20 амінокислотних залишків (показана підкресленою) і зрілий білок з 268 амінокислотних залишків) має амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:1):

<u>MQIPQAPWPV</u>	<u>VWAVLQLGWR</u>	PGWFLDSPDR	PWNPPTFSPA	LLVVTEGDNA
TFTCSFSNTS	ESFVLNWYRM	SPSNQTDKLA	AFPEDRSQPG	QDCFRVVTQL
PNGRDFHMSV	VRARRNDSGT	YLCGAISLAP	KAQIKESLRA	ELRVTERRAE
VPTAHPSPP	RPAGQFQTLV	VGVVGGLLGS	LVLLVWVLAV	ICSRAARGTI
GARRTGQPLK	EDPSAVPVFS	VDYGELDFQW	REKTPEPPVP	CVPEQTEYAT
IVFPSGMGTS	SPARRGSADG	PRSAQPLRPE	DGHCSWPL	

Переважні антитіла до PD-1 включають: PD-1 mAb 1 (5C4; BMS-936558), PD-1 mAb 2 (MK-3475; Merck, ламбролізумаб), PD-1 mAb 3 (EH12.2H7; Dana Farber) та PD-1 mAb 4 (CT-011; CureTech, BAT-1).

Амінокислотна послідовність варіабельного домену важкого ланцюга PD-1 mAb 1 має амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:2) (CDR показані підкресленими):

QVQLVESGGG VVQPGRLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV
 IWYDGSKRY Y ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND
DYWGQGTLVTVSS

Амінокислотна послідовність варіабельного домену легкого ланцюга PD-1 mAb 1 має амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:3) (CDR показані підкресленими):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRIFGQ
 GTKVEIK

5 Амінокислотна послідовність варіабельного домену важкого ланцюга PD-1 mAb 2 має амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:4) (CDR показані підкресленими):

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG
INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD
YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS

Амінокислотна послідовність варіабельного домену легкого ланцюга PD-1 mAb 2 має амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:5) (CDR показані підкресленими):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL
LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSDRLPL
IFGGGTKVEIK

10 Амінокислотна послідовність варіабельного домену важкого ланцюга PD-1 mAb 3 має амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:6) (CDR показані підкресленими):

QVQLQQSGAE LAKPGASVQM SCKASGYSTF SSWIHWVKQR PGQGLEWIGY
IYPSTGFTEY NQKFKDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARWR
DSSGYHAMDY WGQGTSVTVSS
 IYPSTGFTEY NQKFKDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARWR
 DIVLTQSPAS LTVSLGQRAT ISCRASQSVS TSGYSYMHY QQKPGQPPKL
LIKFGSNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQHSWEIPY
IFGGGTKLEI K

15 Амінокислотна послідовність варіабельного домену важкого ланцюга PD-1 mAb 4 має амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:8) (CDR показані підкресленими):

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

Амінокислотна послідовність варіабельного домену легкого ланцюга PD-1 mAb 4 має амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:9) (CDR показані підкресленими):

EIVLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSARSSVS YMHWFQQKPG KAPKLWIYRT
SNLASGVPSR FSGSGSGTSY CLTINSLQPE DFATYYCQQR SSFPLTFGGG
 TKLEIK

20 В. Здатності до зв'язування у антитіл до LAG-3

Також показані антитіла, які є імуноспецифічними до LAG-3 (див., наприклад, WO 2014/008218). Додаткові необхідні антитіла можуть бути отримані шляхом виділення секретуючих антитіл гібридом, індукованих за допомогою LAG-3 або його пептидного фрагмента. Людський LAG-3 (що включає сигнальну послідовність з 28 амінокислотних залишків (показана підкресленою) і зрілий білок з 497 амінокислотних залишків) має

25 амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:10):

MWEAQFLGLL FLQPLWVAPV KPLQPGAEVV VVWAQEGAPA QLPCSPTIPL
 QDLSLLRRAG VTWQHQPDSG PPAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT
 VLSVGPGLR SGRPLQPRV QLDERGRQRG DFLWLRLPAR RADAGEYRAA
 VHLRDRALSC RLRLRLGQAS MTASPPGSLR ASDWVILNCS FSRPDRPASV
 HWFRNRGQGR VPVRESPHHH LAESFLFLPQ VSPMDSGPWG CILTYRDGFN
 VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP
 PGGGPDLLVT GDNGDFTLRL EDVSAQAQAGT YTCHHLQEQ QLNATVTLAI
 ITVTPKSFSG PGS LGKLLCE VTPVSGQERF VWSSLDTPSQ RSFSGPWLEA
 QEAQLLSQPW QCQLYQGERL LGAAYFTTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL
 LLFLILGVLS LLLVLTGAFG FHLWRRQWRP RRFSALEQGI HPPQAQSKIE
 ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL

Переважаючим антитілом до LAG-3 є LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS).

30 Амінокислотна послідовність варіабельного домену важкого ланцюга LAG-3 mAb 1 має амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:11) (CDR показані підкресленими):

QVQLQQWGAG LKLPSETLSL TCAVYGGSF^S DYYWNWIRQP PGKGLEWIGE
INHNGNTNSN PSLKSRVTL LDTSKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCAFG^S
DYEYNWFDPW GQGLTVTVSS

Амінокислотна послідовність варіабельного домену легкого ланцюга LAG-3 mAb 1 має амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:12) (CDR показані підкресленими):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQ^SIS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYC^QQ RSNWPLTFGQ
 5 GTNLEIK

Застосовуваний у даному документі термін «епітоп-зв'язувальний фрагмент антитіла» означає фрагмент антитіла, який є здатним імуноспецифічно зв'язуватися з епітопом. Епітоп-зв'язувальний фрагмент може містити 1, 2, 3, 4, 5 або всі 6 CDR-доменів такого антитіла та, хоча і може імуноспецифічно зв'язуватися з таким епітопом, може характеризуватися
 10 імуноспецифічністю, афінністю або селективністю до такого епітопу, який відрізняється від такого у даного антитіла. Проте, переважно епітоп-зв'язувальний фрагмент буде містити всі 6 CDR-доменів такого антитіла. Епітоп-зв'язувальний фрагмент антитіла може бути окремим поліпептидним ланцюгом (наприклад, scFv) або може містити два або більше поліпептидних ланцюгів, кожний з яких має N-кінець і C-кінець (наприклад, діатіло, Fab-фрагмент, Fab₂-фрагменти і т. і.).

С. Переважні діатіла DART® за даним винаходом

1. Загальний розгляд

Переважні діатіла за даним винаходом є біспецифічними тетравалентними діатілами Fc-DART® (фіг. 3), які складаються разом з чотирьох поліпептидних ланцюгів. Чотири поліпептидні ланцюги містять два поліпептиди, що містять CH₂-CH₃ (тобто «перший» і «третій» поліпептидні ланцюги діатіла), які утворюють один з одним комплекс з формуванням Fc-домену, та два ідентичних поліпептиди, що не містять CH₃ (тобто «другий» і «четвертий» поліпептидні ланцюги діатіла), кожен з яких утворює комплекс з поліпептидом діатіла, що містить CH₂-CH₃, з формуванням епітоп-зв'язувального домену, який є імуноспецифічним до PD-1 або LAG-3. Так,
 25 наприклад, перший поліпептидний ланцюг буде містити варіабельний домен легкого ланцюга (VL) до PD-1 (або до LAG-3) і варіабельний домен важкого ланцюга (VH) до LAG-3 (або до PD-1) і буде утворювати комплекс з другим поліпептидним ланцюгом, який містить комплементарний домен VH до PD-1 (або до LAG-3) і комплементарний VL домен до LAG-3 (або до PD-1), з формуванням першої пари доменів, що зв'язують епітопи PD-1 і LAG-3. Аналогічно, наприклад,
 30 третій поліпептидний ланцюг буде містити варіабельний домен легкого ланцюга (VL) до PD-1 (або до LAG-3) і варіабельний домен важкого ланцюга (VH) до LAG-3 (або до PD-1) і буде утворювати комплекс з четвертим поліпептидним ланцюгом, який містить комплементарний домен VH до PD-1 (або до LAG-3) і комплементарний VL домен до LAG-3 (або до PD-1), з формуванням другої пари доменів, що зв'язують епітопи PD-1 і LAG-3.

Оскільки варіабельні домени легкого ланцюга та варіабельні домени важкого ланцюга одного поліпептиду спрямовані до різних епітопів, вони не можуть утворювати один з одним комплекс з формуванням епітоп-зв'язувального домену, який може зв'язувати або PD-1, або LAG-3. Варіабельні домени легкого ланцюга та варіабельні домени важкого ланцюга першого поліпептиду переважно відокремлені один від одного або за допомогою проміжного лінкерного пептиду, який є досить коротким, для того щоб практично виключити комплексування у цих доменів. Ілюстративний лінкер має послідовність (SEQ ID NO:13: GGGSGGGG. Альтернативно, можна використовувати інші лінкери аналогічної довжини (для того щоб запобігти взаємодії одного з одним доменів VL і VH одного поліпептидного ланцюга).

Як показано на фіг. 4, найбільш переважними біспецифічними тетравалентними діатілами Fc-DART® за даним винаходом є діатіла Fc-DART®, які були модифіковані таким чином, щоб вони містили домени, які полегшують утворення гетеродимеру. Включення таких доменів сприяє формуванню гетеродимеру між поліпептидними ланцюгами діатіла. Включення таких доменів не є обов'язковим, і даний винахід відноситься до біспецифічних діатіл PD-1 × LAG-3, які не містять такі домени. Переважні домени, що полегшують утворення гетеродимеру включають «Е-спіральні» домени (SEQ ID NO:14): EVAALKEKEVAALKEKEVAALKEKEVAALKE и «К-спіральні» домени (SEQ ID NO:15): KVAALKEKEVAALKEKEVAALKEKEVAALKE. Більш конкретно, кожний з пари поліпептидних ланцюгів, для яких необхідно утворити комплекс один з одним, сконструйований так, щоб він містив один (або декілька) таких доменів, що полегшують утворення гетеродимеру, причому використовуваний домен(-и) одного поліпептидного ланцюга є комплементарним(ми) використовуваному домену(-ам) іншого поліпептидного ланцюга
 55 (наприклад, один поліпептидний ланцюг буде містити Е-спіральний домен, а інший буде містити

К-спіральний домен). Якщо два поліпептидні ланцюги сконструйовані такими, щоб вони містили більше одного такого домену, що полегшує утворення гетеродимеру, вони можуть мати однаковий заряд або, що більш переважно, протилежний заряд.

Особливо переважними є домени, що полегшують утворення гетеродимеру, які містять модифікації описаних вище Е-спіральних і К-спіральних послідовностей зі включенням одного або декількох цистеїнових залишків. Наявність таких цистеїнових залишків забезпечує, щоб спіраль, яка присутня на одному поліпептидному ланцюзі, стала ковалентно зв'язаною з комплементарною спіраллю, яка присутня на іншому поліпептидному ланцюзі, таким чином формуючи ковалентний зв'язок між поліпептидними ланцюгами та підвищуючи стабільність діатіла. Приклади таких особливо переважних доменів, що полегшують утворення гетеродимеру, включають модифіковану Е-спіраль з амінокислотною послідовністю (SEQ ID NO:16): EVAACEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK, де лейциновий залишок з SEQ ID NO:14 був замінений на цистеїновий залишок (показаний підкресленим), і модифіковану К-спіраль з амінокислотною послідовністю (SEQ ID NO:17): KVAACEKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE, де лейциновий залишок з SEQ ID NO:15 був замінений на цистеїновий залишок (показаний підкресленим).

Варіабельний домен важкого ланцюга першого поліпептиду та домен, що полегшує утворення гетеродимеру, такого поліпептиду переважно відокремлені один від одного проміжним лінкерним пептидом, який містить 1, 2, 3 або більше цистеїнових залишків. Переважний пептид, що містить цистеїн та який розділяє пептид, має послідовність SEQ ID NO:18: GCGCGG. Можна використовувати інші лінкери з аналогічною довжиною (для включення цистеїнового залишку, який може ковалентно зв'язуватися з цистеїновим залишком іншого поліпептидного ланцюга).

Переважно використовуваний домен, що полегшує утворення гетеродимеру, і домен CH2-CH3 першого поліпептидного ланцюга відокремлені один від одного проміжним лінкерним пептидом, що містить цистеїн, який забезпечує підвищену стабілізацію домену, що полегшує утворення гетеродимеру. Відповідний лінкерний пептид, який містить цистеїн, має амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:19): DKTHTCPPCP, проте, більш переважний лінкер має амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:20): LEPKSADKTHTCPPC. Альтернативно, можна використовувати інші лінкери з аналогічною довжиною (для включення цистеїнового залишку, який може ковалентно зв'язуватися з цистеїновим залишком іншого поліпептидного ланцюга).

Амінокислотна послідовність домену CH2-CH3 дикого типу має такий вигляд (позиції наведені згідно EU-індексу за Kabat et al. (1992) Sequences Of Proteins Of Immunological Interest, National Institutes of Health Publication No. 91-3242) (SEQ ID NO:21):

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

Для триспецифічних або тетраспецифічних діатіл (тобто для діатіл, у яких перший і третій поліпептидні ланцюги не є ідентичними) бажано зменшити або усунути гомодимеризацію між доменами CH2-CH3 двох перших поліпептидних ланцюгів або між доменами CH2-CH3 двох третин поліпептидних ланцюгів. Для стимуляції гетеродимеризації між першим і третім поліпептидними ланцюгами домен CH2-CH3 з цих ланцюгів переважно модифікований так, щоб він полегшував таку гетеродимеризацію. Наприклад, амінокислотну заміну (переважно заміну з амінокислотою, що містить об'ємну бічну групу, яка формує «виступ», наприклад, триптофан) можна ввести в домен CH2 або CH3 першого поліпептидного ланцюга так, щоб стеричний вплив запобігав взаємодії з доменом, що має аналогічну мутацію, та примушував мутантний домен утворювати пару з доменом, в якому була сконструйована комплементарна або поєднувана мутація, тобто «западина» (наприклад, заміна на гліцин). Такі набори мутацій можна сконструювати способом інженерії у будь-якій парі поліпептидів, що входять до складу молекули діатіла, та додатково сконструювати способом інженерії у будь-якій частині поліпептидних ланцюгів зазначеної пари. Способи білкової інженерії для стимуляції гетеродимеризації замість гомодимеризації добре відомі з рівня техніки, зокрема, щодо інженерії імуноглобулін-подібних молекул, та охоплюються в даному документі (див., наприклад, патент

США № 7695936 і патентну публікацію 2007/0196363, Ridgway et al. (1996) "Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization", Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library", J. Mol. Biol. 270: 26-35, і Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis", J. Immunol. Methods 296: 95-101; кожен з яких, таким чином, включений в даний документ за допомогою посилання у повному його обсязі. Переважний виступ створюють шляхом модифікації інтактного Fc-домену IgG так, щоб він містив модифікацію T366W. Переважну западину створюють шляхом модифікації інтактного Fc-домену IgG так, щоб він містив модифікацію T366S, L368A і Y407V. Для полегшення очищення діатіл за даним винаходом поліпептидний ланцюг, що містить мутації, які приводять до утворення западини, додатково містить заміну в положенні 435 (H435R) для видалення сайту зв'язування з білком А. Таким чином, гомодимери поліпептидів, що містять мутації за типом «западина», не будуть зв'язуватися з білком А, у той же час діатіла, які в результаті формують гетеродимери, що містять виступ і западину, будуть зберігати свою здатність зв'язувати білок А за допомогою сайту зв'язування з білком А на поліпептидному ланцюзі, що містить мутацію за типом «виступ».

Даний винахід також відноситься до молекул, що містять варіантні Fc-домени, які містять одну або декілька амінокислотних замін, вставок або делецій відносно порівнюваного Fc-домену дикого типу. Молекули, що містять варіантні Fc-домени, в нормі мають змінені фенотипи відносно молекул, що містять Fc-домени дикого типу. Варіантний фенотип може експресуватися у формі зміненого періоду напіввиведення в сироватці, зміненої стабільності, зміненої сприйнятливості до дії ферментів клітини або зміненої ефекторної функції, за результатами визначення у NK-залежному або макрофаг-залежному аналізі. Модифікації Fc-доменив, які виявляються як зміна ефекторних функцій, відомі з рівня техніки, включаючи модифікації, які підвищують зв'язування з активуючими рецепторами (наприклад, FcγRIIA (CD16A) та зменшують зв'язування з інгібуючими рецепторами (наприклад, FcγRIIB (CD32B) (див., наприклад, Stavenhagen, J.B. et al. (2007) "Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγ Receptors", Cancer Res. 57(18):8882-8890). Ілюстративні варіанти Fc-доменив IgG1 людини зі зменшеним зв'язуванням з CD32B та/або підвищеним зв'язуванням з CD16A містять заміни F243L, R929P, Y300L, V305I або P296L. Такі амінокислотні заміни можуть бути присутніми в Fc-домени IgG1 людини у будь-якому поєднанні. Згідно з одним варіантом здійснення варіант Fc-домену IgG1 людини містить заміну F243L, R929P і Y300L. Згідно з іншим варіантом здійснення варіант Fc-домену IgG1 людини містить заміну F243L, R929P, Y300L, V305I і P296L. Згідно з іншим варіантом здійснення варіант Fc-домену IgG1 людини містить заміну N297Q, заміни L234A і L235A або заміну D265A, оскільки ці мутації усувають зв'язування з FcR. Домен CH2-CH3 першого поліпептидного ланцюга таких молекул буде мати послідовність, що «несе виступ» (SEQ ID NO:22):

PAPEAAGGPS	VFLFPPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV
DGVEVHNAKT	KPREEQYNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP
APIEKTISKA	KGQPREPQVY	TLPPSREEMT	KNQVSLWCLV	KGFYPDSIAV
EWESNGQPEN	NYKTTTPVLD	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCSVMH
EALHNHYTQK	SLSLSPGK			

або послідовність, що «несе западину», із заміною H435R для усунення зв'язування з білком А (SEQ ID NO:23):

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

Як буде зрозуміло, домен CH2-CH3, що «несе западину» (наприклад, SEQ ID NO:22), може бути використаний у першому поліпептидному ланцюзі, в цьому випадку домен CH2-CH3, що «несе виступ» (наприклад, SEQ ID NO:22), буде використаний у третьому поліпептидному ланцюзі.

Для біспецифічних тетравалентних діатіл за даним винаходом, у яких перший і третій поліпептидні ланцюги не відрізняються, переважним доменом CH2-CH3 є модифікований домен CH2-CH3 з амінокислотною послідовністю (SEQ ID NO:24):

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

- 5 Таким чином, загалом, переважні перший і третій поліпептидні ланцюги переважного біспецифічного тетравалентного діатіла PD-1 × LAG-3 Fc-DART® за даним винаходом мають ідентичні послідовності, та другий і четвертий поліпептидні ланцюги таких переважних біспецифічних тетравалентних діатілів PD-1 × LAG-3 Fc-DART® мають ідентичні послідовності, які наведені в таблиці 3:

Таблиця 3

Варіативність	Домени першого та третього поліпептидних ланцюгів	Домени другого та четвертого поліпептидних ланцюгів
I	(VL епітоп-зв'язувального домену до PD-1) - (лінкер) - (VH епітоп-зв'язувального домену до LAG-3) - (лінкер) - (домен, що містить модифіковану Е-спіраль і полегшує утворення гетеродимеру) - (лінкер) - (модифікований домен CH2-CH3)	(VL епітоп-зв'язувального домену до LAG-3) - (лінкер) - (VH епітоп-зв'язувального домену до PD-1) - (лінкер) - (домен, що містить модифіковану К-спіраль і полегшує утворення гетеродимеру)
II	(VL епітоп-зв'язувального домену до PD-1) - (лінкер) - (VH епітоп-зв'язувального домену до LAG-3) - (лінкер) - (домен, що містить модифіковану К-спіраль і полегшує утворення гетеродимеру) - (лінкер) - (модифікований домен CH2-CH3)	(VL епітоп-зв'язувального домену до LAG-3) - (лінкер) - (VH епітоп-зв'язувального домену до PD-1) - (лінкер) - (домен, що містить модифіковану Е-спіраль і полегшує утворення гетеродимеру)
III	(VL епітоп-зв'язувального домену до LAG-3) - (лінкер) - (VH епітоп-зв'язувального домену до PD-1) - (лінкер) - (домен, що містить модифіковану Е-спіраль і полегшує утворення гетеродимеру) - (лінкер) - (модифікований домен CH2-CH3)	(VL епітоп-зв'язувального домену до PD-1) - (лінкер) - (VH епітоп-зв'язувального домену до LAG-3) - (лінкер) - (домен, що містить модифіковану К-спіраль і полегшує утворення гетеродимеру)
IV	(VL епітоп-зв'язувального домену до LAG-3) - (лінкер) - (VH епітоп-зв'язувального домену до PD-1) - (лінкер) - (домен, що містить модифіковану К-спіраль і полегшує утворення гетеродимеру) - (лінкер) - (модифікований домен CH2-CH3)	(VL епітоп-зв'язувального домену до PD-1) - (лінкер) - (VH епітоп-зв'язувального домену до LAG-3) - (лінкер) - (домен, що містить модифіковану Е-спіраль і полегшує утворення гетеродимеру)

- 10 2. Перше ілюстративне біспецифічне діатіло PD-1 × LAG-3 Fc-DART® (PD-1 × LAG-3 Fc-DART®-1)

Перше особливо переважне біспецифічне тетравалентне діатіло PD-1 × LAG-3 Fc-DART® за даним винаходом («PD-1 × LAG-3 Fc-DART®-1») має перший і третій поліпептидні ланцюги з ідентичною послідовністю. Такий перший/третій поліпептидний ланцюг має амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:25):

- 15 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSI SYLAWYQQKP GQAPRLIYD
 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ
 GTNLEIKGGG SGGGGQVQLV ESGGGVVGPG RSLRLDCKAS GITFSNSGMH
 WVRQAPGKGL EWVAVIWDG SKRYADSVK GRFTISRDN KNTLFLQMNS
 LRAEDTAVYY CATNDDYWQQ GTLTVVSSGG CGGGEVAACE KEVAALEKEV
 AALEKEVAAL EKLEPKSADK THTCPPCPAP EAAGGPSVFL FPPKPKDTLY
 ITREPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF
 PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG
 SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPG

де амінокислотні залишки 1-107 є амінокислотними залишками варіабельного домену легкого ланцюга LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:12), амінокислотні залишки 108-115 є амінокислотними залишками лінкера GGGSGGGG (SEQ ID NO:13), амінокислотні залишки 116-228 є амінокислотними залишками варіабельного домену важкого ланцюга PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:2), амінокислотні залишки 229-234 є амінокислотними залишками розділяючого пептиду, що містить цистеїн GGCGGG (SEQ ID NO:18), амінокислотні залишки 235-262 є амінокислотними залишками модифікованої E-спіралі (SEQ ID NO:16), амінокислотні залишки 263-277 є амінокислотними залишками лінкерного пептиду, що містить цистеїн LEPKSADKTHTCPPC (SEQ ID NO:20), а амінокислотні залишки 278-494 є амінокислотними залишками модифікованого домену CH2-CH3 (SEQ ID NO:24).

Молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує такий перший/третій поліпептидні ланцюги, являє собою (SEQ ID NO:26):

gaaattgtcc	tgacacagtc	tcccgaacc	ctgagttga	gtcctgggga
gcgagcaact	ctctctgcc	gagcctcca	gagtatctcc	tcctacctcg
cctggtagcca	acagaagcca	ggcaggctc	caaggctgct	tatctatgac
gcctctaacc	gcgcaactgg	gattcccgca	cgcttctccg	gctctgggtc
cggcacagac	tttacctta	ctatctctag	cctggagcca	gaagactttg
ccgtgtacta	ttgtcagcaa	cgtccaatt	ggccccctac	ctttgggcag
ggcactaact	tggaatcaa	aggtggcgga	tccggcggcg	gaggccagggt
tcagctggtc	gagagtgggtg	gcggcggtgt	gcaacctggg	cgttccctcc
gattggactg	taaagcttcc	ggcattactt	tctcaaattc	cggcattgcat
tgggtgagggc	aagcccctgg	aaaagggtctc	gaatgggtgg	ctgtgatttg
gtacgatggc	agcaaacgggt	actacgcga	ttctgttaag	ggccgcttta
ccatctcccg	cgataactca	aagaacacac	tgtttctgca	aatgaatagt
cttagagccg	aggacaccgc	cgtgtactac	tgtgccacaa	atgacgatta
ttgggggcag	ggcacattgg	tcacagtgtc	tccggagga	tgtggcgggtg
gagaagtggc	cgcatgtgag	aaagagggtg	ctgctttgga	gaaggagggtc
gctgcacttg	aaaaggaggt	cgagccctg	gagaaactgg	agcccaaatc
tgctgacaaa	actcacacat	gcccaccgtg	cccagcacct	gaagccgcggg
ggggaccgtc	agtctctctc	ttcccccaa	aaccaagga	cacctctat
atcaccgggg	agcctgaggt	catatgcgtg	giggtggacg	tgagccacga
agacccctgag	gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcggtg	gagggtgcata
atgccaagac	aaagccgcgg	gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg
gtcagcgctc	tcaccgtcct	gcaccaggac	tggctgaatg	gcaaggagta
caagtgcgaag	gtctccaaca	aagccctccc	agccccatc	gagaaaacca
tctccaaagc	caaagggcag	ccccgagaac	cacagggtga	cacctgtccc
ccatcccggg	aggagatgac	caagaaccag	gtcagcctga	cctgcctggt
caaaggcttc	tatccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	agcaatgggc
agccggagaa	caactacaag	accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc
tccttctcc	tctacagcaa	gtcacccgtg	gacaagagca	ggtggcagca
ggggaacgtc	ttctcatgct	ccgtgatgca	tgaggctctg	cacaaccact
acacgcagaa	gagcctctcc	ctgtctccgg	gt	

Другий і четвертий поліпептидні ланцюги такого PD-1 × LAG-3 Fc-DART®-1 мають ідентичні послідовності. Такий другий/четвертий поліпептидний ланцюг має амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:27):

EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP	GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA	RFSGSGSGTD	FTLTISLEP	EDFAVYYCQQ	SSNWPRTFGQ
GTKVEIKGGG	SGGGGQVQLQ	QWGAGLLKPS	ETLSLTCAVY	GGSFSDYYWN
WIRQPPGKGL	EWIGEINHNG	NTNSNP SLKS	RVTLSLDTSK	NQFSLKLRSV
TAADTAVYYC	AFGYSDYEYN	WFDPWGQGT	VTVSSGGCGG	GKVAACKEKV
AALKEKVAAL	KEKVAALKE			

де амінокислотні залишки 1-107 є амінокислотними залишками варіабельного домену легкого ланцюга PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:3), амінокислотні залишки 108-115 є амінокислотними залишками лінкера GGGSGGGG (SEQ ID NO:13), амінокислотні залишки 116-235 є амінокислотними залишками варіабельного домену важкого ланцюга LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:11), амінокислотні залишки 236-241 є амінокислотними залишками розділяючого пептиду, що містить цистеїн GGCGGG (SEQ ID NO:18), амінокислотні залишки 242-269 є амінокислотними залишками модифікованої K-спіралі (SEQ ID NO:17).

Молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує такий другий/четвертий поліпептидний ланцюг, являє собою (SEQ ID NO:28):

```

gagatcgtag  ttaccagtc  tccgcacc  cttccctga  gtctggtag
gcgggccact  cttcctgtc  gcgcaagcca  atcagttct  agctacctg
catggatca  gcagaagcca  gggcaggcac  ccaggctct  catctatgac
gccagtaacc  gcgcaaccgg  gatacctgt  agattttccg  gcagtggatc
tgggaccgat  ttcacactga  caatttcac  cttggaacca  gaagatttcg
cagtctacta  ctgccagcaa  tctccaact  ggccaagaac  ttccggacag
gggaccaaag  tggaaattaa  aggtggcgga  tccggcgcg  gaggccagg
ccagctccag  caatggggag  ccgggctgt  gaaacctct  gaaacactga
gtctcacatg  tgccgttat  ggaggttct  tctccgatta  ttactggaac
tggtatctgc  agcctcccg  caagggcctg  gagtggatcg  gtgagattaa
ccacaatggc  aataccaata  gcaatcctag  ttgaaatct  cgcgtcactc
ttccctcga  tacaagcaaa  aaccagttt  cttgaaatt  gcgactctga
actgctgtg  atactgccgt  gtattactgc  gcattcggct  actccgacta
tgaatataat  tggttcgatc  ctgggggaca  gggaacattg  gtaaccgtgt
catccggagg  atgtggcggt  ggaaaagtgg  ccgcatgtaa  ggagaaagt
gtgctttga  aagagaagg  cgcgcactt  aaggaaaagg  tgcagccct
gaaagag

```

3. Друге ілюстративне біспецифічне діатіло PD-1 × LAG-3 Fc-DART® (PD-1 × LAG-3 Fc-DART®-2)

- Друге особливо переважне біспецифічне тетравалентне діатіло PD-1 × LAG-3 Fc-DART® за даним винаходом («PD-1 × LAG-3 Fc-DART®-2») має перший і третій поліпептидні ланцюги з ідентичною послідовністю. Такий перший/третій поліпептидний ланцюг має амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:29):

```

EIVLTQSPAT  LSLSPGERAT  LSCRASQSVS  SYLAWYQQKP  GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA  RFSGSGSGTD  FTLTISSELP  EDFAVYYCQQ  SSNWPRFTGQ
GTKVEIKGGG  SGGGGQVQLQ  QWGAGLLKPS  ETLSLTCAVY  GGSFSDYYWN
WIRQPPGKGL  EWIGEINHNG  NTNSNPSLKS  RVTLSLDTSK  NQFSLKLRVS
TAADTAVYYC  AFGYSDYEYN  WFDPWGGQTL  VTVSSGGCGG  GEVAACEKEV
AALEKEVAAL  EKEVAALEKL  EPKSADKTHT  CPPCPAPEAA  GGPSVFLFPP
KPKDITLYTR  EPEVTCVVVD  VSHEDPEVKF  NWYVDGVEVH  NAKTKPREEQ
YNSTYRVVSV  LTVLHQDWLN  GKEYKCKVSN  KALPAPIEKT  ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSR  EEMTKNQVSL  TCLVKGFYPS  DIAVEWESNG  QPENNYKTTP
PVLDSGDSFF  LYSKLTVDKS  RWQQGNVFSC  SVMHEALHNH  YTQKSLSLSP
G

```

- де амінокислотні залишки 1-107 є амінокислотними залишками варіабельного домену легкого ланцюга PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:3), амінокислотні залишки 108-115 є амінокислотними залишками лінкера GGGSGGGG (SEQ ID NO:13), амінокислотні залишки 116-235 є амінокислотними залишками варіабельного домену важкого ланцюга LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO:11), амінокислотні залишки 236-241 є амінокислотними залишками розділяючого пептиду, що містить цистеїн GGCGGG (SEQ ID NO:18), амінокислотні залишки 242-269 є амінокислотними залишками модифікованої E-спіралі (SEQ ID NO:16), амінокислотні залишки 270-284 є амінокислотними залишками лінкерного пептиду, що містить цистеїн LEPKSADKTHTCPPC (SEQ ID NO:20), а амінокислотні залишки 285-501 є амінокислотними залишками модифікованого домену CH2-CH3 (SEQ ID NO:24).

- Молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує такий перший/третій поліпептидні ланцюги, являє собою (SEQ ID NO:30):

```

gagatcgtag  ttaccagtc  tccgcacc  cttccctga  gtctggtag
gcgggccact  cttcctgtc  gcgcaagcca  atcagttct  agctacctg
catggatca  gcagaagcca  gggcaggcac  ccaggctct  catctatgac
gccagtaacc  gcgcaaccgg  gatacctgt  agattttccg  gcagtggatc
tgggaccgat  ttcacactga  caatttcac  cttggaacca  gaagatttcg
cagtctacta  ctgccagcaa  tctccaact  ggccaagaac  ttccggacag
gggaccaaag  tggaaattaa  aggtggcgga  tccggcgcg  gaggccagg
ccagctccag  caatggggag  ccgggctgt  gaaacctct  gaaacactga
gtctcacatg  tgccgttat  ggaggttct  tctccgatta  ttactggaac
tggtatctgc  agcctcccg  caagggcctg  gagtggatcg  gtgagattaa
ccacaatggc  aataccaata  gcaatcctag  ttgaaatct  cgcgtcactc
ttccctcga  tacaagcaaa  aaccagttt  cttgaaatt  gcgactctga
actgctgtg  atactgccgt  gtattactgc  gcattcggct  actccgacta
tgaatataat  tggttcgatc  ctgggggaca  gggaacattg  gtaaccgtgt

```

catccggagg	atgtggcggt	ggagaagtgg	ccgcatgtga	gaaagagggt
gctgctttgg	agaaggagggt	cgctgcactt	gaaaaggagg	tcgcagccct
ggagaaactg	gagcccaaat	ctgctgacaa	aactcacaca	tgcccaccgt
gcccagcacc	tgaagccgcg	gggggaccgt	cagtcttctt	cttcccccca
aaaccaaggt	acaccctcta	tatcaccggg	gagcctgagg	tcacatgcgt
ggtggtggac	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc	aactggtacg
tggacggcgt	ggaggtgcat	aatgccaaaga	caaagccgcg	ggaggagcag
tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc	tgcaccagga
ctggctgaat	ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtctccaac	aaagccctcc
cagcccccat	cgagaaaacc	atctccaaag	ccaaaggcca	gccccgagaa
ccacagggtgt	acaccctgcc	cccatccggg	gaggagatga	ccaagaacca
ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	clatccagc	gacatgcgct
tggagtggga	ggcaaatggg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct
ccgtgctgg	actccgacgg	ctcctcttc	ctctacagca	agctcaccgt
ggacaagagc	aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc
atgaggctct	gcacaaccac	tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg
ggt				

Другий і четвертий поліпептидні ланцюги PD-1 × LAG-3 Fc-DART®-2 мають ідентичні послідовності. Такий другий/четвертий поліпептидний ланцюг має амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:31):

EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSI	SYLAWYQQKP	GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA	RFSGSGSGTD	FTLTISSELP	EDFAVYYCQQ	RSNWPLTFGQ
GTNLEIKGGG	SGGGGQVQLV	ESGGGVVQPG	RSLRLDCKAS	GITFSNSGMH
WVRQAPGKGL	EWVAVIWDYD	SKRYADSVK	GRFTISRDNS	KNTLFLQMNS
LRAEDTAVYY	CATNDYWGQ	GTLTVSSGG	CGGGKVAACK	EKVAALKEKV
AALKEKVAAL	KE			

де амінокислотні залишки 1-107 є амінокислотними залишками варіабельного домену легкого ланцюга LAG-1 mAb 1 (SEQ ID NO:12), амінокислотні залишки 108-115 є амінокислотними залишками лінкера GGGSGGGG (SEQ ID NO:13), амінокислотні залишки 116-228 є амінокислотними залишками варіабельного домену важкого ланцюга PD-1 mAb 1 (SEQ ID NO:2), амінокислотні залишки 229-234 є амінокислотними залишками розділяючого пептиду, що містить цистеїн GGCGGG (SEQ ID NO:18), амінокислотні залишки 235-262 є амінокислотними залишками модифікованої K-спіралі (SEQ ID NO:17).

Молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує такий другий/четвертий поліпептидний ланцюг, являє собою (SEQ ID NO:32):

gaaattgtcc	tgacacagtc	tcccgaacc	ctgagtttga	gtcctgggga
gcgagcaact	ctctctgcc	gagcctccca	gagtatctcc	tcctacctcg
cctgttacca	acagaagcca	gggcaggctc	caaggctgct	tatctatgac
gcctctaacc	gcgcaactgg	gattcccgca	cgcttctcgg	gctctggttc
cgccacagac	tttacactta	ctatctctag	cctggagcca	gaagactttg
ccgtgtacta	ttgtcagcaa	cgttccaalt	ggccccttac	ctttgggcag
ggcactaact	tggaaatcaa	aggtggcgga	tccggcgggc	gaggccagggt
tcagctggtc	gagagtgggt	gcggcggtgt	gcaacctggg	cgttccctcc
gattggactg	taaagcttcc	ggcattactt	tctcaaatc	cgcatgcat
tgggtgaggc	aagcccctgg	aaaagggctc	gaatgggtgg	ctgtgatttg
gtacgatggc	agcaaacggg	actacgccga	ttctgttaag	ggccgcttta
ccatctcccg	cgataactca	aagaacacac	tgtttctgca	aatgaatagt
cttagagccg	aggacaccgc	cgtgtactac	tgtgccacaa	atgacgatta
ttgggggcag	ggcacattgg	tcacagtgtc	ttcgggagga	tgtggcggtg
gaaaagtggc	cgcatgtaag	gagaaagttg	ctgcttgaa	agagaagggtc
gccgcactta	aggaaaagggt	cgcagccctg	aaagag	

III. Фармацевтичні композиції

Даний винахід відноситься до фармацевтичних композицій для лікування злоякісної пухлини або захворювання, асоційованого з наявністю патогену. Такі композиції включають безтарні лікарські композиції, придатні для виготовлення фармацевтичних композицій (наприклад, неочищених або нестерильних композицій) і фармацевтичних композицій (тобто композицій, які придатні для введення суб'єкту або пацієнту), які можна застосовувати при отриманні стандартних лікарських форм. Такі композиції містять профілактично або терапевтично ефективну кількість модифікованого біспецифічного діатіла PD-1 × LAG-3 за даним винаходом (і особливо біспецифічного тетравалентного діатіла PD-1 × LAG-3 Fc-DART® за даним винаходом) та фармацевтично прийнятний носій. Переважно композиції за даним винаходом

містять профілактично або терапевтично ефективну кількість однієї або декількох молекул за даним винаходом і фармацевтично прийнятний носій. Даний винахід також відноситься до фармацевтичних композицій, що містять такі модифіковані діатіла та друге терапевтичне антитіло, яке є специфічним до конкретного патоген-асоційованого антигену, і фармацевтично прийнятний носій.

Застосовуваний у даному документі термін «злаякісна пухлина» відноситься до захворювання, що характеризується наявністю злаякісної пухлини. Така злаякісна пухлина включає злаякісну пухлину надниркової залози, асоційовану зі СНІДом злаякісну пухлину, альвеолярну саркому м'яких тканин, астроцитарну пухлину, злаякісну пухлину сечового міхура, злаякісну пухлину кісток, злаякісну пухлину головного та спинного мозку, метастатичну пухлину головного мозку, злаякісну пухлину молочної залози, пухлину каротидного тільця, злаякісну пухлину шийки матки, хондросаркому, хордому, хромобластну нирково-клітинну карциному, світлоклітинну карциному, злаякісну пухлину товстої кишки, колоректальну злаякісну пухлину, наскірну доброякісну фіброзну гістіоцитому, десмопластичну дрібнокруглоклітинну пухлину, епендіому, пухлину Юінга, позаскелетну слизоподібну хондросаркому, недосконалий кістковий фіброгенез, фіброзну дисплазію кістки, злаякісну пухлину жовчного міхура або жовчної протоки, гастральну злаякісну пухлину, гестаційну трофобластичну хворобу, ембріонально-клітинну пухлину, злаякісну пухлину голови та шиї, гепатоклітинну карциному, пухлину острівців підшлункової залози, саркому Капоші, злаякісну пухлину нирки, лейкоз, ліпому/доброякісну ліпоматозну пухлину, ліпосаркому/злаякісну ліпоматозну пухлину, злаякісну пухлину печінки, лімфому, злаякісну пухлину легені, гранулобластому, меланому, менінгіому, множинні ендокринні неоплазії, множинну мієлому, мієлодиспластичний синдром, нейробластому, нейроендокринні пухлини, злаякісну пухлину яєчника, злаякісну пухлину підшлункової залози, соскоподібну карциному щитоподібної залози, пухлину парашитоподібних залоз, злаякісну пухлину у дітей, пухлину піхви периферичного нерва, феохромоцитому, пухлину гіпофіза, злаякісну пухлину простати, пізню увеальну меланому, порушення, пов'язане з розрідженням крові, ниркову метастатичну злаякісну пухлину, паличкоподібну пухлину, рабдіоміосаркому, саркому, злаякісну пухлину шкіри, саркому м'якої тканини, плоскоклітинну злаякісну пухлину, злаякісну пухлину шлунка, синовіальну саркому, злаякісну пухлину яєчка, тимусну карциному, тімому, метастатичну злаякісну пухлину щитоподібної залози або злаякісну пухлину матки.

Застосовуваний у даному документі термін «захворювання, асоційоване з наявністю патогену», відноситься до захворювання, асоційованого з інфікуванням бактерією (наприклад, *E. coli*, *C. difficile*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Hemophilus influenzae*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* та *Streptococcus pneumoniae* і т. д.), грибом (наприклад, *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Pneumocystis*, *Stachybotrys* і т. д.), найпростішим (*Amoebosoma*, *Excavata*, *Chromalveolata*, *Entamoeba*, *Plasmodium*, *Giardia*, *Trypanosoma*, *Coccidia*, *Besnoitia*, *Dicrocoelium*, *Leishmania* і т. д.) або вірусом (і особливо аденовірусом, аденоасоційованим вірусом, вірусом В (macacine herpesvirus 1), вірусом ВК, бун'явірусом, вірусом чікунгун'я, вірусом Коксакі, коронавірусом, цитомегаловірусом, вірусом, що викликає східний енцефаліт коней, вірусом Ебола, ентеровірусом, вірусом Епштейна-Барр, хантавірусом, вірусом гепатиту А, вірусом гепатиту В, вірусом гепатиту С, вірусом гепатиту D, вірусом гепатиту Е, вірусом простого гепатиту 1, вірусом простого гепатиту 2, спумавірусом людини, герпес-вірусом людини 3, герпес-вірусом людини 5, герпес-вірусом людини 6, герпес-вірусом людини 7, вірусом імунodefіциту людини, вірусом папіломи людини, β-лімфотропним вірусом людини, вірусом Т-клітинного лейкозу людини I, вірусом Т-клітинного лейкозу людини II, вірусом грипу, вірусом Джона Каннінгема, вірусом японського енцефаліту, герпесвірусом, асоційованим з саркомою Капоші, вірусом Ласса, вірусом лімфоцитарного хориоменінгіту, вірусом, що викликає «Марбурзьку хворобу», вірусом кору, вірусом епідемічного паротиту, вірусом Ніпах, норовірусом, вірусом Норуолк, ортореовірусом, вірусом парагрипу, парвовірусом, вірусом поліомієліту, вірусом сказу, реовірусом, респіраторно-синцитіальним вірусом, риновірусом, вірусом лихоманки долини Ріфт, ротавірусом, вірусом корової краснухи, вірусом віспи людини, вірусом енцефаліту Сент-Луїс, вірусом натуральної віспи, вірусом білої віспи, вірусом оперізуючого лишая, вірусом Західного Нілу, вірусом західного енцефаліту коней або вірусом жовтої лихоманки).

Застосовувані у даному документі терміни «лікування» або «проведення лікування» означають певний підхід, метою якого є досягнення лікувального або необхідного результату, в тому числі і переважно лікувального або необхідного клінічного результату. Такі лікувальні або необхідні результати включають без обмеження одне або декілька з наступних: зменшення проліферації (або знищення) інфікованих клітин або інших уражених захворюванням клітин,

зниження інтенсивності симптомів захворювання, підвищення якості життя у хворих на захворювання, зниження дози інших лікарських препаратів, необхідних для лікування захворювання, уповільнення прогресування захворювання та/або подовження терміну життя у приймаючих лікування домашніх тварин.

Згідно з конкретним варіантом здійснення термін «фармацевтично прийнятний» означає схвалений регуляторним органом федерального уряду або уряду штату або наведений в переліку в Фармакопеї США або в іншій загальноновизнаній фармакопеї для застосування на тваринах та, більш конкретно, на людях. Термін «носій» відноситься до розріджувача, ад'юванту (наприклад, ад'юванту Фрейнда (повному або неповному)), допоміжного засобу або основи, з якою вводять терапевтичний засіб. Такі фармацевтичні носії можуть являти собою стерильні рідини, такі як вода або олії, включаючи носії нафтового, тваринного, рослинного або синтетичного походження, такі як арахісова олія, соєва олія, мінеральна олія, сезамова олія та ін. Вода є переважним носієм при внутрішньовенному введенні фармацевтичної композиції. Як рідкі носії, зокрема для ін'єкційних розчинів, також можна використовувати сольові розчини та водні розчини глюкози та гліцерину. Відповідні фармацевтичні допоміжні засоби включають крохмаль, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, борошно, крейду, силікагель, стеарат натрію, гліцеролмоностеарат, тальк, хлорид натрію, сухе знежирене молоко, гліцерин, пропіленгліколь, воду, етанол та ін. Композиція, при необхідності, також може містити незначні кількості змочувальних або емульгуювальних засобів або буферних засобів для регуляції pH. Такі композиції можуть мати форму розчинів, суспензій, емульсій, таблеток, пігулок, капсул, порошків, складів з уповільненим вивільненням та ін.

Зазвичай інгредієнти композицій за даним винаходом постачаються або окремо, або змішаними у стандартній лікарській формі, наприклад, у вигляді сухого порошку або безводного концентрату в герметично закритій ємкості, такій як ампула або саше, на якій зазначено кількість активної речовини. При введенні композиції шляхом інфузії її диспергують з водою або сольовим розчином фармацевтичного ступеня чистоти, які містяться в інфузійному флаконі. При введенні композиції шляхом ін'єкції може бути надана ампула зі стерильною водою для ін'єкції або сольовим розчином для того, щоб інгредієнти можна було змішати перед введенням.

Композиції за даним винаходом можуть бути зіставлені в нейтральних або сольових формах. Фармацевтично прийнятні солі включають без обмеження солі, утворені з такими аніонами, як отримані з соляної, фосфорної, оцтової, щавелевої, винної кислоти і т. д., та аніони, утворені з такими катіонами, як отримані з гідроксиду натрію, калію, амонію, кальцію, тривалентного заліза, ізопропіламіну, триетиламіну, 2-етиламіноетанолу, гістидину, прокаїну і т. д.

Даний винахід також відноситься до фармацевтичної упаковки або набору, що включає одну або декілька ємкостей, які містять біспецифічне діатіло PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом, окремо або з таким фармацевтично прийнятним носієм. Додатково в фармацевтичну упаковку або набір можна також включити один або декілька інших профілактичних або терапевтичних засобів, придатних для лікування захворювання. Даний винахід також відноситься до фармацевтичної упаковки або набору, які включають одну або декілька ємкостей, заповнених одним або декількома інгредієнтами фармацевтичних композицій за даним винаходом. Необов'язково з такою ємкістю(ємкостями) може бути асоційоване інформаційне повідомлення у формі, визначеній урядовим органом, що контролює виробництво, застосування та розповсюдження ліків або біологічних продуктів, причому в цьому інформаційному повідомленні зазначено схвалення органом виробництва, застосування або поширення для прийому людьми.

Даний винахід відноситься до наборів, які можна застосовувати згідно з описаними вище способами. Згідно з одним варіантом здійснення набір включає одну або декілька молекул за даним винаходом. Згідно з іншим варіантом здійснення набір додатково включає один або декілька інших профілактичних або терапевтичних засобів, придатних для лікування злоякісної пухлини або захворювання, які характеризуються наявністю патоген-асоційованого антигену, в одній або декількох ємкостях. Згідно з іншим варіантом здійснення набір додатково включає одне або декілька антитіл або діатіл, які зв'язують один або декілька патоген-асоційованих антигенів. Згідно з деякими варіантами здійснення іншим профілактичним або терапевтичним засобом є хіміотерапевтичний засіб. Згідно з іншими варіантами здійснення профілактичним або терапевтичним засобом є біологічний або гормональний терапевтичний засіб.

IV. Способи отримання біспецифічних діатіл PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом

Біспецифічні діатіла PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом найпереважніше отримують за допомогою рекомбінантної експресії молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує такі поліпептиди, що добре відомо з рівня техніки.

Поліпептиди за даним винаходом безперешкодно можна отримати за допомогою

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

Як альтернативу, антитіла можна отримати рекомбінантно й експресувати за допомогою будь-якого відомого з рівня техніки способу. Антитіла можна отримати рекомбінантно шляхом спочатку виділення антитіл, отриманих від тварин-хазяїнів, отримання послідовності гена та використання послідовності гена для рекомбінантної експресії антитіла в клітинах-хазяїнах (наприклад, клітинах CHO). Інший спосіб, який можна використовувати, передбачає експресію послідовності антитіла в рослинах (наприклад, тютюні) або трансгенному молоці. Були розкриті відповідні способи рекомбінантної експресії антитіла в рослинах або молоці (див., наприклад, Peeters et al. (2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants", Vaccine 19:2756; Lonberg, N. et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice", Int. Rev. Immunol 13:65-93; and Pollock et al. (1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies", J. Immunol Methods 231:147-157). З рівня техніки відомі відповідні способи одержання похідних антитіл, наприклад, химерних, гуманізованих, одноланцюгових і т. д. Як іншу альтернативу, антитіла можна отримати рекомбінантно за допомогою технології фагового дисплея (див., наприклад, патенти США № 5565332, 5580717, 5733743, 6265150 і роботи Winter, G. et al. (1994) "Making Antibodies By Phage Display Technology", Annu. Rev. Immunol. 12:433-455).

Антитіла або білок, що становлять інтерес, можна піддати секвенуванню згідно з методом розщеплення за Едманом, який добре відомий фахівцям у даній галузі. Інформацію про пептиди, отриману за допомогою мас-спектрометрії або методом розщеплення за Едманом, можна використовувати для конструювання зондів або праймерів, які застосовуються для клонування білка, що становить інтерес.

Альтернативний спосіб клонування білка, що становить інтерес, передбачає «пенінг» з використанням очищених білків або їх частин щодо клітин, які експресують антитіло або білок, що становлять інтерес. Процедуру «пенінгу» можна здійснити шляхом отримання бібліотеки кДНК з тканин або клітин, які експресують або надекспресують необхідні молекули кДНК, у другому типі клітин і скринінгу трансфікованих клітин другого типу клітин щодо специфічного зв'язування необхідного білка. Детальний опис способів, які використовуються при клонуванні генів ссавців, які кодуєть білки клітинної поверхні, методом «пенінгу», можна знайти в літературі даної галузі техніки (див., наприклад, Aruffo, A. et al. (1987) "Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84:8573-8577, і Stephan, J. et al. (1999) "Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation", Endocrinol. 140:5841-5854).

Молекули кДНК, які кодуєть антитіла та інші пептидні агоністи, антагоністи та модулятори, можна отримати шляхом зворотньої транскрипції молекул мРНК з конкретного типу клітин згідно зі стандартними для даної галузі техніки способами. Зокрема, мРНК можна виділити за допомогою різних літичних ферментів або хімічних розчинів згідно з процедурами, викладеними у згаданій вище роботі Sambrook і співавт., або екстрагувати за допомогою комерційно доступних смол, що зв'язують молекули нуклеїнових кислот, згідно з доданими інструкціями, які постачаються виробниками (наприклад, Qiagen, Invitrogen, Promega). Синтезовані молекули кДНК потім вбудовують у вектор експресії з отриманням антитіла або білка, що становить інтерес, у клітинах другого типу. Мають на увазі, що вектор експресії повинен бути здатним до реплікації у клітинах-хазяїнах або у вигляді епісом, або як невід'ємна частина хромосомної ДНК. Відповідні вектори експресії включають без обмежень плазміди, вірусні вектори, в тому числі аденовіруси, аденоасоційовані віруси, ретровіруси та косміди.

Вектори, що містять полінуклеотиди, які становлять інтерес, можна ввести у клітину-хазяїна за допомогою будь-якого з ряду відповідних способів, у тому числі за допомогою електропорації, трансфекції з використанням хлориду кальцію, хлориду рубідію, фосфату кальцію, діетиламіноетилдекстрану або інших речовин; бомбардуванням мікрочастинками; ліпофекцією та інфікуванням (наприклад, якщо вектор являє собою інфекційний агент, такий як вірус коров'ячої віспи). Вибір векторів або полінуклеотидів, що вводяться, часто буде залежати від характеристик клітини-хазяїна.

Для виділення генів, що кодуєть антитіло, поліпептид або білок, що становлять інтерес, можна використовувати будь-яких клітин-хазяїнів, які здатні до надекспресії гетерологічних молекул ДНК. Необмежуючі приклади відповідних клітин-хазяїнів ссавців включають без обмеження клітини COS, HeLa і CHO. Переважно клітини-хазяїни експресують молекули кДНК

на рівні, який приблизно в 5 разів вищий, більш переважно в 10 разів вищий, більш переважно в 20 разів вищий, більш переважно в 50 разів вищий, більш переважно в 100 разів вищий, ніж у відповідного ендogenous антитіла або білка, що становить інтерес, у клітинах-хазяїнах при її наявності. Скринінг клітин-хазяїнів щодо специфічного зв'язування з необхідним білком переважно здійснюють за допомогою імуноаналізу або FACS. Клітину, яка надекспресує антитіло або білок, що становлять інтерес, можна виявити за допомогою описаного далі способу.

Також доступні різні методики, які тепер можна використовувати для отримання мутантних пептидних агоністів, антагоністів і модуляторів, які кодують доповнення, делеції або зміни в амінокислотній послідовності одержуваного в результаті білка відносно початкової молекули пептидного агоніста, антагоніста або модулятора.

Даний винахід відноситься до модифікацій у біспецифічному діатілі PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом, які значно не впливають на його властивості, та до варіантів, які мають підвищену або знижену активність. Модифікування поліпептидів є відпрацьованою технологією у даній галузі. Приклади модифікованих поліпептидів включають поліпептиди з консервативними замінами амінокислотних залишків, однією або декількома делеціями або додаваннями амінокислот, які не роблять значного негативного впливу на функціональну активність, або застосування хімічних аналогів. Амінокислотні залишки, які можуть бути піддані взаємній амінокислотній заміні, включають без обмеження гліцин/аланін; валін/ізолейцин/лейцин; аспарагін/глутамін; аспарагінову кислоту/глутамінову кислоту; серин/треонін; лізин/аргінін і фенілаланін/тирозин. Ці поліпептиди також включають глікозильовані та неглікозильовані поліпептиди, а також поліпептиди з іншими посттрансляційними модифікаціями, такими як, наприклад, глікозилювання іншими цукрами, ацетилювання та фосфорилювання. Переважно амінокислотні заміни будуть консервативними, тобто амінокислота, яку заміняють, буде мати такі ж самі хімічні властивості, що і вихідна амінокислота. Такі консервативні заміни відомі з рівня техніки, а їх приклади наведені раніше. Амінокислотні модифікації можуть варіювати від зміни або модифікації однієї або декількох амінокислот до повної перебудови ділянки, такої як варіабельна ділянка. Зміни у варіабельній ділянці можуть змінювати афінність та/або специфічність зв'язування. Інші способи модифікації включають застосування технології зв'язування, яка відома з рівня техніки, у тому числі без обмеження ферментативних засобів, окислювальне заміщення та хелатоутворення. Модифікації можна використовувати, наприклад, для приєднання міток для імуноаналізу, такого як приєднання радіоактивних груп для радіоімуноаналізу. Модифіковані поліпептиди отримують за допомогою загальноприйнятих у даній галузі процедур, та їх можна піддати скринінгу за допомогою стандартних аналізів, які відомі з рівня техніки.

Даний винахід також відноситься до гібридних білків, що містять один або декілька фрагментів або ділянок з поліпептидів і антитіл за даним винаходом. Згідно з одним варіантом здійснення запропонований гібридний поліпептид, який містить щонайменше 10 суміжних амінокислот варіабельної ділянки легкого ланцюга та щонайменше 10 амінокислот варіабельної ділянки важкого ланцюга. Згідно з іншим варіантом здійснення гібридний поліпептид містить гетерологічну імуноглобулінову константну ділянку. Згідно з іншим варіантом здійснення гібридний поліпептид містить варіабельну ділянку легкого ланцюга та варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла, отриманого від публічно доступної депонованої гібридомі. У контексті даного винаходу гібридний білок антитіла містить один або декілька поліпептидних доменів, які специфічно зв'язуються з необхідним вірусним епітопом або необхідним активуючим рецептором імунної ефекторної клітини або білком, який присутній на поверхні імунної ефекторної клітини, яка експресує такий активуючий рецептор, та іншу амінокислотну послідовність, до якої він не прикріплюється у нативній молекулі, наприклад, гетерологічну послідовність або гомологічну послідовність з іншої ділянки.

Даний винахід відноситься до поліпептидів, що містять амінокислотну послідовність антитіла за даним винаходом. Поліпептиди за даним винаходом можна отримати за допомогою процедур, які відомі з рівня техніки. Поліпептиди можна отримати за допомогою протеолітичного або іншого розщеплення антитіла, за допомогою рекомбінантних способів (тобто окремі або гібридні поліпептиди), як описано вище, або за допомогою хімічного синтезу. Поліпептиди антитіла, особливо коротші поліпептиди до приблизно 50 амінокислот, зручно отримувати за допомогою хімічного синтезу. Способи хімічного синтезу відомі з рівня техніки та є комерційно доступними. Наприклад, такий поліпептид можна отримати за допомогою автоматичного синтезатора поліпептидів з використанням твердофазного способу.

V. Застосування композицій за даним винаходом

Даний винахід відноситься до композицій, у тому числі фармацевтичних композицій, що

містять біспецифічні діатіла PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом, поліпептиди, одержувані з таких молекул, полінуклеотиди, що містять послідовності, які кодують такі молекули або поліпептиди, й інші засоби, описані у даному документі.

У зв'язку з тим, що біспецифічні діатіла PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом мають здатність зменшувати інгібування імунної системи, опосередковане PD-1 і LAG-3, біспецифічні діатіла PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом можна застосовувати для лікування будь-якого захворювання або стану, асоційованого з небажаною супресією імунної системи, у тому числі злоякісної пухлини та захворювань, які асоційовані з наявністю патогену (наприклад, бактеріальної, грибової, вірусної інфекції або інфекції, викликані найпростішими).

VI. Способи введення

Композиції за даним винаходом можуть бути запропоновані для лікування, профілактики та полегшення одного або декількох симптомів, асоційованих із захворюванням, порушенням або інфекцією, шляхом введення суб'єкту ефективної кількості фармацевтичної композиції за даним винаходом. Згідно з переважним аспектом такі композиції є практично очищеними (тобто практично не містять речовин, які обмежують її вплив або призводять до небажаних побічних ефектів). Згідно з конкретним варіантом здійснення суб'єктом є ссавець, переважно такий ссавець, який не є приматом (наприклад, корова, кінь, кішка, собака, гризун і т. д.) або є приматом (наприклад, мавпа, така як яванський макак, людина та т. і.). Згідно з переважним варіантом здійснення суб'єктом є людина.

Відомі різні системи доставки, та їх можна застосовувати для введення композицій за даним винаходом, наприклад, інкапсулювання в ліпосомах, мікрочастинках, мікрокапсулах, рекомбінантні клітини, здатні до експресії антитіла або гібридного білка, рецептор-опосередкованого ендоцитозу (див., наприклад, Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System", J. Biol. Chem. 262: 4429-4432), конструкція нуклеїнової кислоти як частина ретровірусного або іншого вектора і т. д.

Способи введення біспецифічних діатіл PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом включають без обмеження парентеральне введення (наприклад, внутрішньошкірне, внутрішньом'язове, внутрішньочеревне, внутрішньовенне та підшкірне), епідуральне та чресслизове (наприклад, інтраназальний і пероральний шляхи). Згідно з конкретним варіантом здійснення молекули за даним винаходом вводять внутрішньом'язово, внутрішньовенно або підшкірно. Композиції можна вводити будь-яким традиційним шляхом, наприклад, шляхом інфузії або струменевої ін'єкції, шляхом всмоктування через епітеліальні або шкірно-слизові вистилання (наприклад, слизову оболонку порожнини рота, слизову оболонку прямої кишки і кишківника і т. д.), і можна вводити разом з іншими біологічно активними засобами. Введення може бути системним і локальним. Крім того, також можна використовувати інгаляційне введення, наприклад, за допомогою інгалятора або небулайзера та складу з аеролізуючим засобом. Див., наприклад, патенти США № 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 та 4880078, і РСТ публікації № WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 та WO 99/66903, кожен з яких включений у даний документ за допомогою посилання в його повному обсязі.

Даний винахід також відноситься до того, що біспецифічні діатіла PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом можуть бути упаковані в ємкість, що герметично закривається, таку як ампула або саше, на якій зазначено кількість таких молекул. Згідно з одним варіантом здійснення біспецифічні діатіла PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом постачають у вигляді сухого стерилізованого порошку або безводного концентрату в герметично закритій ємкості, та їх можна ресуспендувати, наприклад, за допомогою води або сольового розчину до відповідної концентрації для введення суб'єктові. Переважно біспецифічні діатіла PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом постачають у вигляді сухого стерильного порошку в герметично закритій ємкості в одноразовому дозуванні, що становить щонайменше 5 мкг, більш переважно щонайменше 10 мкг, щонайменше 15 мкг, щонайменше 25 мкг, щонайменше 50 мкг, щонайменше 100 мкг або щонайменше 200 мкг.

Ліофілізовані біспецифічні діатіла PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом слід зберігати при температурі 2-8 °C у їх оригінальній ємкості, а молекули слід вводити в межах 12 годин, переважно в межах 6 годин, в межах 5 годин, в межах 3 годин або в межах 1 години після ресуспендування. Згідно з альтернативним варіантом здійснення біспецифічні діатіла PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом постачають у рідкій формі у герметично закритій ємкості, на якій зазначено кількість і концентрація молекули, гібридного білка або кон'югованої молекули. Переважно рідку форму біспецифічних діатіл PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом постачають в герметично закритій ємкості, в якій присутні молекули в концентрації щонайменше 1 мкг/мл, більш переважно щонайменше 2,5 мкг/мл, щонайменше 5 мкг/мл, щонайменше 10 мкг/мл, щонайменше 50 мкг/мл або щонайменше 100 мкг/мл.

У контексті даного документа «ефективна кількість» фармацевтичної композиції, згідно з одним варіантом здійснення, є кількістю, достатньою для одержання лікувальних або необхідних результатів, у тому числі без обмежень клінічних результатів, таких як зниження інтенсивності симптомів, що виникли у результаті захворювання, послаблення симптому інфекції (наприклад, вірусного навантаження, жару, болю, сепсису та т. і.) або симптому злоякісної пухлини (наприклад, проліферації клітин злоякісної пухлини, наявності пухлини, метастаз пухлини та т. і.), таким чином підвищуючи якість життя у хворих на захворювання, знижуючи дозу інших лікарських препаратів, необхідних для лікування такого захворювання, посилюючи вплив іншого лікарського препарату, наприклад, шляхом цілеспрямованої дії та/або інтерналізації, уповільнення прогресування захворювання, та/або збільшуючи термін життя індивідуумів.

Ефективну кількість можна вводити за одне або декілька введень. У контексті даного винаходу ефективна кількість лікарського засобу, сполуки або фармацевтичної композиції є кількістю, достатньою або для прямого, або для опосередкованого зменшення проліферації (або впливу) в результаті вірусної наявності або для зменшення та/або уповільнення розвитку вірусного захворювання. Згідно з деякими варіантами здійснення ефективна кількість лікарського засобу, сполуки або фармацевтичної композиції може бути або не бути досягнута в поєднанні з іншим лікарським засобом, сполукою або фармацевтичною композицією. Таким чином, «ефективну кількість» можна розглядати у контексті введення одного або декількох хіміотерапевтичних засобів, а окремий засіб можна вважати таким, що вводиться в ефективній кількості, якщо в поєднанні з одним або декількома іншими засобами може бути досягнутий або досягається необхідний результат. Незважаючи на варіювання потреб у кожного індивідуума, фахівець у даній галузі зможе здійснити визначення оптимальних діапазонів ефективних кількостей кожного компонента. Типові дозування введення антитіла включають одну або декілька одноразових доз у діапазоні від 0,1 до 100 мг/кг маси тіла.

Кількість біспецифічних діатіл PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом, яка буде ефективною при лікуванні, попередженні або полегшенні одного або декількох асоційованих із захворюванням симптомів, можна визначити за допомогою стандартних клінічних методик. Точна доза, яку необхідно використовувати в складі, також буде залежати від шляху введення і серйозності стану, та її необхідно призначати згідно з рішенням лікаря й обставинами для кожного пацієнта. Ефективні дози можна екстраполювати, виходячи з кривих залежності «доза/ефект», отриманих від тест-систем *in vitro* або тваринних моделей. Для біспецифічних діатіл PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом дозування, що вводиться пацієнтові, як правило, становить щонайменше приблизно 0,01 мкг/кг, щонайменше приблизно 0,05 мкг/кг, щонайменше приблизно 0,1 мкг/кг, щонайменше приблизно 0,2 мкг/кг, щонайменше приблизно 0,5 мкг/кг, щонайменше приблизно 1 мкг/кг, щонайменше приблизно 2 мкг/кг, щонайменше приблизно 5 мкг/кг, щонайменше приблизно 10 мкг/кг, щонайменше приблизно 20 мкг/кг, щонайменше приблизно 50 мкг/кг, щонайменше приблизно 0,1 мг/кг, щонайменше приблизно 1 мг/кг, щонайменше приблизно 5 мг/кг, щонайменше приблизно 10 мг/кг, щонайменше приблизно 30 мг/кг, щонайменше приблизно 50 мг/кг, щонайменше приблизно 75 мг/кг, щонайменше приблизно 100 мг/кг, щонайменше приблизно 125 мг/кг, щонайменше приблизно 150 мг/кг або більше маси тіла суб'єкта.

Згідно з іншим варіантом здійснення пацієнтові призначають схему лікування, що включає одну або декілька доз такої профілактично або терапевтично ефективної кількості біспецифічних діатіл PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом, причому схему лікування призначають на період 2 дні, 3 дні, 4 дні, 5 днів, 6 днів або 7 днів. Згідно з деякими варіантами здійснення схема лікування передбачає періодичне введення доз профілактично або терапевтично ефективної кількості біспецифічних діатіл PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом (наприклад, введення дози в 1-й день, 2-й день, 3-й день і 4-й день зазначеного тижня та відсутність введення доз профілактично або терапевтично ефективної кількості біспецифічних діатіл PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом у 5-й день, 6-й день і 7-й день того ж тижня). Як правило, проводять 1, 2, 3, 4, 5 або більше курсів лікування. Кожен курс може мати таку ж схему або іншу схему.

Згідно з іншим варіантом здійснення дозу, яку вводять, збільшують на протязі першої чверті, першої половини або перших двох третіх або трьох чвертей схеми(схем) (наприклад, у ході першої, другої або третьої схеми 4-курсного лікування) до досягнення щоденної профілактично або терапевтично ефективної кількості біспецифічних діатіл PD-1 $\times$ LAG-3, охоплюваних даним винаходом.

Згідно з одним варіантом здійснення дозування біспецифічних діатіл PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом, що вводять пацієнтові, можна розрахувати для застосування як монотерапії. Згідно з іншим варіантом здійснення біспецифічні діатіла PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом застосовують у поєднанні з іншими терапевтичними композиціями, а дозування, що вводять

пацієнтові, є нижчим, ніж при застосуванні таких діатіл як монотерапії.

Згідно з конкретним варіантом здійснення може бути бажаним введення фармацевтичних композицій за даним винаходом місцево в зону, яка потребує лікування; це можна здійснити шляхом, наприклад, та без обмеження місцевої інфузії, ін'єкції або за допомогою імплантату, причому зазначений імплантат виконаний з пористого, непористого або гелеподібного матеріалу, включаючи мембрани, такі як мембрани Sialastic, або волокна. Переважно при введенні молекули за даним винаходом необхідно дотримуватися обережності при застосуванні матеріалів, в які така молекула не абсорбується.

Згідно з іншим варіантом здійснення композиції можна доставляти у везикулі, зокрема у ліпосомі (див. Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 3 17-327; в цілому див. там же).

Згідно з іншим варіантом здійснення композиції можна доставляти в системі з контрольованим вивільненням або з уповільненим вивільненням. Будь-яку методику, відому фахівцеві у даній галузі, можна застосовувати для отримання складів з уповільненим вивільненням, що містять одну або декілька молекул за даним винаходом. Див., наприклад, патент США № 4526938; PCT публікацію WO 91/05548; PCT публікацію WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; i Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24: 759-760, кожен з яких включений у даний документ за допомогою посилання в повному його обсязі. Згідно з одним варіантом здійснення у системі з контрольованим вивільненням може бути використана помпа (див. Langer, раніше; Sefton, (1987) "Implantable Pumps", CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald et al. (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis", Surgery 88:507-516; i Saudek et al. (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery", N. Engl. J. Med. 321:574-579). Згідно з іншим варіантом здійснення для здійснення контрольованого вивільнення антитіл можна застосовувати полімерні матеріали (див., наприклад, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate", Science 228:190-192; During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization", Ann. Neurol. 25:351-356; Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits", J. Neurosurg. 7 (1): 105-112); патент США № 5679377, патент США № 5916597, патент США № 5912015, патент США № 5989463, патент США № 5128326, PCT публікація № WO 99/15154 i PCT публікація № WO 99/20253). Приклади полімерів, що застосовуються в складах з уповільненим вивільненням, включають без обмеження полі(2-гідроксietилметакрилат), полі(метилметакрилат), полі(акрилову кислоту), сополімер етилену та вінілацетату, полі(метакрилову кислоту), полігліколіди (PLG), поліангідриди, полі(N-вінілпіролідон), полі(вініловий спирт), поліакриламід, полі(етиленгліколь), полілактиди (PLA), сополімери лактиду та гліколіду (PLGA) та поліортоестери. Згідно ще з одного варіанту здійснення системи з контрольованим вивільненням можна розмістити поблизу мішені для терапевтичного впливу (наприклад, легенів), тому буде необхідна лише частина системної дози (див., наприклад, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, раніше, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Згідно з іншим варіантом здійснення полімерні композиції, придатні як імплантати з контрольованим вивільненням, застосовують згідно з Dunn et al. (див. патент США № 5945155). В основі цього конкретного способу лежить терапевтичний ефект in situ контрольованого вивільнення біоактивного матеріалу з полімерної системи. Імплантацію зазвичай роблять будь-де в організмі пацієнта, де необхідно терапевтичне лікування. Згідно з іншим варіантом здійснення застосовують неолімерні системи з уповільненим вивільненням, причому як систему доставки лікарського засобу застосовують неолімерний імплантат в організмі суб'єкта. При імплантації в організм органічний розчинник імплантату буде розподілятися, диспергувати або вимиватися з композиції в рідину навколишньої тканини, а неолімерний матеріал буде поступово коагулювати або осідати з утворенням твердої мікропористої матриці (див. патент США № 5888533).

Системи з контрольованим вивільненням розглянуті в огляді Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533). Будь-яку методику, відому фахівцеві в даній галузі, можна застосовувати для отримання складів з уповільненим вивільненням, що містять один або декілька терапевтичних засобів за даним винаходом. Див., наприклад, патент США № 4526938, міжнародні публікації № WO 91/05548 і № WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; і Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24: 759-760, кожен з яких включений у даний документ за допомогою посилання в повному його обсязі.

Згідно з конкретним варіантом здійснення, якщо композиція за даним винаходом є нуклеїнової кислотою, що кодує один або декілька поліпептидних ланцюгів біспецифічного діатіла PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом, то нуклеїнову кислоту можна вводити *in vivo* для поліпшення експресії кодованого нею діатіла шляхом створення її як частини відповідного вектора експресії нуклеїнової кислоти і введення його так, щоб він став внутрішньоклітинним, наприклад, за допомогою ретровірусного вектора (див. патент США № 4980286), або шляхом прямої ін'єкції, або за допомогою бомбардування мікрочастинками (наприклад, генною гарматою; Biolistic, Dupont), або шляхом покриття ліпідами, або рецепторами клітинної поверхні, або засобами, що полегшують трансформацію, або шляхом введення її з прив'язкою до гомеобокс-подібного пептиду, який, як відомо, включається в ядро (див., наприклад, Joliot et al. (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868) і т. д. Як альтернативу, нуклеїнову кислоту можна ввести внутрішньоклітинно і вбудувати в ДНК клітини-хазяїна для експресії за допомогою гомологічної рекомбінації.

Лікування суб'єкта терапевтично або профілактично ефективною кількістю біспецифічних діатіл PD-1 $\times$ LAG-3 за даним винаходом може передбачати одноразове лікування або, переважно, може передбачати серію лікувань. Згідно з переважним прикладом суб'єкта лікують молекулами за даним винаходом один раз на тиждень протягом приблизно 1-10 тижнів, переважно 2-8 тижнів, більш переважно приблизно 3-7 тижнів і ще більш переважно протягом приблизно 4, 5 або 6 тижнів. Згідно з іншими варіантами здійснення фармацевтичні композиції за даним винаходом вводять один раз на день, два рази на день або три рази на день. Згідно з іншими варіантами здійснення фармацевтичні композиції вводять один раз на тиждень, два рази на тиждень, раз на два тижні, раз на місяць, раз на шість тижнів, раз на два місяці, два рази на рік або раз на рік. Також буде зрозуміло, що ефективне дозування застосовуваних для лікування молекул може зростати або зменшуватися протягом курсу конкретного лікування.

Вище був наведений загальний опис винаходу, який тепер можна буде простіше зрозуміти в контексті наведених далі прикладів. Такі приклади наведені для ілюстрації і не призначені для обмеження даного винаходу, якщо не зазначено інше.

Приклад 1

Отримання та властивості біспецифічних діатіл до PD-1 $\times$ LAG-3

У контексті аналізу ало-MLR (алогенні реакції в змішаних культурах лімфоцитів) Т-клітини індукували до проліферації у відповідь на розбіжність за HLA (Latchman, Y.E. et al. (2004) "PD-L1-Deficient Mice Show That PD-L1 On T-Cells, Antigen-Presenting Cells, And Host Tissues Negatively Regulates T-Cells." Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 101(29):10691-10696; Wang, W. et al. (2008) "PD-L1/PD-1 Signal Deficiency Promotes Allogeneic Immune Responses And Accelerates Heart Allograft Rejection", Transplantation 86(6):836-44) або мітогенну/фармакологічну стимуляцію. Відомо, що антитіла-агоністи, які націлені на коstimулючі молекули, індукують проліферативні відповіді шляхом посилення Т-клітинної передачі сигналу та стабілізації транскрипційних факторів, які активують Т-клітинну ефекторну функцію або управляють нею (Melero, I. et al. (2013) "Agonist Antibodies to TNFR Molecules That Costimulate T and NK Cells", Clin. Cancer Res. 19(5):1044-1053). Аналогічно, антитіла-антагоністи, які націлені на ключові контрольні молекули, що роблять негативний вплив при регуляції Т-клітинних відповідей, можуть індукувати проліферативні реакції, підтримуючи Т-клітинну передачу сигналу й ефекторну функцію та, таким чином, підвищуючи протипухлинний імунітет (Carrese, D. et al. (2012) "Targeting Costimulatory Molecules to Improve Antitumor Immunity", J. Biomed. Biotech. 2012:926321). Вплив моноклональних антитіл до коstimулючих або контрольних цілей на проліферацію у відповідь на алоантиген можна легко виміряти у короткострокових реакціях

змішаних культур лімфоцитів (ало-MLR) за включенням ^3H -тимідину. Для розгляду здатності антитіл до контрольних інгібіторів посилювати проліферацію були створені, очищені й екзогенно додані еталонні mAb до PD-1 або до LAG-3 на початку аналізу ало-MLR у кількості 20, 10, 5, 2,5 і 1,25 мкг/мл (фіг. 5). Наприкінці 5-6-го дня 96-лунковий планшет обробляли ^3H -тимідином і культивували протягом 18 годин для вимірювання проліферації. Кілька еталонних антитіл до людських PD-1, LAG-3 і CTLA-4 оцінювали щодо їх здатності посилювати Т-клітинну проліферацію у відповідь на стимуляцію алогенним антигеном. Як показано на фіг. 6, додавання PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558), PD-1 mAb 2 (MK-3475; Merck, ламбrolізумабу) або PD-1 mAb 3 (EH12.2H7; Dana Farber) на початку аналізу ало-MLR індукувало сильну Т-клітинну проліферацію у порівнянні з контрольним антитілом ізо типу IgG1 або контрольними лунками, які містили імунокомпетентні клітини та стимулятори. У лунках, що містили лише оброблені стимулюючі клітини, проліферацію не спостерігали. Незважаючи на те, що спостерігали дозозалежну проліферативну відповідь, для PD-1 mAb 4 (CT-011; CureTech, BAT-1) спостерігали мінімальну проліферацію у порівнянні з PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558), PD-1 mAb 2 (MK-3475; Merck, ламбrolізумабом) або PD-1 mAb 3 (EH12.2H7; Dana Farber). Також спостерігали незначну дозозалежну проліферативну відповідь з LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS), який був порівняний з ініліумабом Yervoy®, mAb до CTLA-4 (Bristol Myers-Squibb).

Значна ефективність PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558) при паралельному застосуванні з LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS) при індукції сильного протипухлинного імунітету у тваринних моделей, у порівнянні з кожним окремо затосовуваним антитілом (Woo, SR et al. (2012) "Immune Inhibitory Molecules LAG-3 And PD-1 Synergistically Regulate T-Cell Function To Promote Tumoral Immune Escape", Cancer Res. 72 (4): 917-927), дозволяла зробити висновок, що контрольні mAb, що застосовуються у поєднанні, можуть потенціювати індуковану алогеном Т-клітинну проліферацію сильніше, ніж кожне антитіло окремо. Як показано на фіг. 7, mAb до LAG-3 (25F7) оцінювали щодо його проліферативного потенціалу або окремо, або у поєднанні з mAb до PD-1 (PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558) або PD-1 mAb 2 (MK-3475; Merck, ламбrolізумаб)). Як спостерігали і раніше, обидва mAb до PD-1 індукували сильну проліферацію дозозалежним чином. На відміну від цього, введення mAb до LAG-3 з будь-яким mAb до PD-1 не індукувало посилену проліферацію, яка перевищувала б спостережувану з окремими mAb до PD-1. Окремо mAb до LAG-3 викликало лише незначну Т-клітинну проліферацію в порівнянні з контрольними лунками з ізо типом IgG1 або з контрольними лунками, які містили імунокомпетентні клітини плюс стимулятор.

Нездатність mAb до LAG-3 окремо або в поєднанні індукувати проліферацію, що перевищує проліферацію, яку спостерігали з mAb до PD-1, свідчила, що будь-яка експресія LAG-3 була відсутня на Т-клітинах у ході аналізу ало-MLR або що mAb до LAG-3 не зв'язувалось з LAG-3 для блокування негативного сигнального каскаду. Для аналізу потенціалу індукувати передачу LAG-3 сигналу вносили білок LAG-3 людини («shLAG-3») у середовище для ало-MLR і порівнювали відносно mAb до LAG-3 та/або mAb до PD-1. Як показано на фіг. 8, розчинний LAG-3 людини, що зв'язується з молекулами HLA II класу людини, які експресуються як на APC, так і на CD4 Т-клітинах, індукував сильну проліферативну відповідь у порівнянні з контрольними лунками з ізо типом IgG або з імунокомпетентними клітинами плюс стимулятор. Додавання LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS), судячи з усього, не блокувало проліферативний ефект розчинного білка LAG-3 людини і могло злегка підвищувати Т-клітинну проліферацію, оскільки спостерігали незначну дозозалежну проліферативну відповідь. Згідно з попередніх спостережень mAb до PD-1 індукувало сильну Т-клітинну проліферацію, яка додатково посилювалася при додаванні як розчинного білка LAG-3 людини, так і/або LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS). Додавання контрольного IgG1 ізо типу до антитіл до PD-1 не посилювало Т-клітинну проліферацію понад тієї, що спостерігали лише з PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558)). Здатність розчинної LAG-3 індукувати сильну Т-клітинну проліферацію навіть за наявності mAb до LAG-3 залишається невідомою. Одна можливість полягає у тому, що mAb до LAG-3 просто не може блокувати сильний проліферативний сигнал, індукований mAb до розчинного LAG-3. Альтернативна, але не обов'язково взаємовиключна можливість полягає в тому, що розчинний білок LAG-3 людини разом з антитілом до LAG-3 формує імунні зшивальні комплекси, які можуть додатково потенціювати проліферативні відповіді.

Здатність розчинного LAG-3 потенціювати Т-клітинну проліферацію свідчила про те, що практично одночасне внесення як mAb до PD-1, так і mAb до LAG-3 могло посилювати Т-клітинні проліферативні відповіді в аналізі ало-MLR. Для розгляду такої можливості були створені контрольні mAb до PD-1 та mAb до LAG-3 у біспецифічному форматі антитіла, здатного до переорієнтування, з подвійною афінністю (DART®) у двох орієнтаціях: біспецифічне

тетравалентне діатіло Fc-DART® LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS) - PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558) (PD-1 × LAG-3 Fc-DART®-1) і біспецифічне тетравалентне діатіло Fc-DART® PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558) - LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS) (PD-1 × LAG-3 Fc-DART®-1). Обидва формати Fc-DART® екзогенно додавали (описаним вище дозозалежним чином) на початку ало-MLR і оцінювали щодо їх проліферативного потенціалу на Т-клітинах.

Як показано на фіг. 9А-9В, обидва діатіла DART® несподівано індукували більш сильні Т-клітинні проліферативні відповіді, ніж одержувані з PD-1 mAb 1 (5C4 (BMS-936558) та/або LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016, Medarex/BMS). Для розчинного LAG-3 людини («shLAG-3») і в цей раз спостерігали сильну Т-клітинну проліферацію в аналізі ало-MLR. Сильний проліферативний сигнал, індукований як форматами DART®, так і розчинним білком LAG-3 людини, мінімізував внесок окремо mAb до PD-1 або окремо mAb до LAG-3. Незважаючи на те, що як mAb до PD-1, так і mAb до LAG-3 індукували Т-клітинну проліферацію дозозалежним чином понад тієї, що спостерігається у контрольних лунках з IgG1 ізотипом або імунокомпетентними клітинами плюс стимулятор, в яких антитіла були додані окремо, для поєднання антитіла до PD-1 з антитілом до LAG-3 спостерігали посилену проліферацію у порівнянні з антитілом окремо, що свідчило про функціональну синергію, як вже було продемонстровано в більш ранніх повідомленнях у літературі (Wang, W. et al. (2008) "PD-L1/PD-1 Signal Deficiency Promotes Allogeneic Immune Responses And Accelerates Heart Allograft Rejection", *Transplantation* 86(6):836-44; Melero, I. et al. (2013) "Agonist Antibodies to TNFR Molecules That Costimulate T and NK Cells", *Clin. Cancer Res.* 19(5):1044-1053; Capece, D. et al. (2012) "Targeting Costimulatory Molecules to Improve Antitumor Immunity", *J. Biomed. Biotech.* 2012:926321).

Усі публікації та патенти, згадані в даному описі, включені у даний документ за допомогою посилання в такому ж обсязі, як якщо б кожна окрема публікація або патентна заявка була спеціально й окремо зазначена як включена за посиланням у повному її обсязі. Незважаючи на те, що даний винахід був описаний з використанням конкретних варіантів його здійснення, буде зрозуміло, що можливі додаткові модифікації, а дана заявка мається на увазі як така, що охоплює будь-які варіанти, застосування або адаптації даного винаходу, які в цілому узгоджуються з ідеями даного винаходу і включають такі відступи від даного розкриття, які очевидні в світлі відомої або загальноприйнятої практики в даній галузі, до якої належить даний винахід, і які можуть бути застосовані щодо викладених у даному документі основних ознак.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

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

<120> КОВАЛЕНТНО ЗВ'ЯЗАНІ ДІАТИЛА, ЩО МАЮТЬ ІМУНОРЕАКТИВНІСТЬ З PD-1 І
 LAG-3, ТА СПОСОБИ ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> 1301.0115PCT

<150> 62/017,467

<151> 2014-06-26

<160> 32

<170> PatentIn, версія 3.5

<210> 1

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc

<222> (1)..(288)

<223> PD-1 людини, у тому числі сигнальна послідовність

<400> 1

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

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

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 2
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(113)
<223> Варіабельна ділянка важкого ланцюга антитіла mAb 1 до PD-1

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

```
<210> 3
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(107)

<223> Варіабельна ділянка легкого ланцюга антитіла mAb 1 до PD-1

<400> 3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна ділянка важкого ланцюга гуманізованого антитіла mAb 2 до PD-1

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20

25

30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

50

55

60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 111

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна ділянка легкого ланцюга гуманізованого антитіла mAb 2 до PD-1

<400> 5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 6

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

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

Ser Val Gln Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Ser
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Thr Gly Phe Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(111)
 <223> Варіабельна ділянка легкого ланцюга антитіла mAb 3 до PD-1

<400> 7

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Phe Gly Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95

Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 8

<211> 117

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Варіабельна ділянка важкого ланцюга гуманізованого антитіла mAb 4 до PD-1

<400> 8

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met

35

40

45

Gly Trp Ile Asn Thr Asp Ser Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Glu Glu Phe

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Asn Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Ile Thr Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys

85

90

95

Val Arg Val Gly Tyr Asp Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100

105

110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 106

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> варіабельна ділянка легкого ланцюга гуманізованого антитіла mAb 4 до PD-1

<400> 9

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 10

<211> 525
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(525)
 <223> білок LAG3 (CD223) людини, у тому числі сигнальна послідовність

<400> 10

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
 1 5 10 15

Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
 20 25 30

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
 35 40 45

Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
 50 55 60

His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
 65 70 75 80

Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
85 90 95

Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
100 105 110

Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
115 120 125

Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
130 135 140

Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
145 150 155 160

Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
165 170 175

Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
180 185 190

Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
195 200 205

Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
210 215 220

Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly
225 230 235 240

Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn
245 250 255

Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala
260 265 270

Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val
275 280 285

Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu
305 310 315 320

Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His

	325	330	335
Leu	Gln	Glu	Gln
Gln	Leu	Asn	Ala
Thr	Val	Thr	Leu
Ala	Ile	Ile	Thr
	340	345	350
Val	Thr	Pro	Lys
Ser	Phe	Gly	Ser
Pro	Gly	Ser	Leu
Gly	Lys	Leu	Leu
	355	360	365
Cys	Glu	Val	Thr
Pro	Val	Ser	Gly
Gln	Glu	Arg	Phe
Val	Trp	Ser	Ser
	370	375	380
Leu	Asp	Thr	Pro
Ser	Gln	Arg	Ser
Phe	Ser	Gly	Pro
Trp	Leu	Glu	Ala
	385	390	395
Gln	Glu	Ala	Gln
Leu	Leu	Ser	Gln
Pro	Trp	Gln	Cys
Gln	Leu	Tyr	Gln
	405	410	415
Gly	Glu	Arg	Leu
Leu	Gly	Ala	Ala
Val	Tyr	Phe	Thr
Glu	Leu	Ser	Ser
	420	425	430
Pro	Gly	Ala	Gln
Arg	Ser	Gly	Arg
Ala	Pro	Gly	Ala
Leu	Pro	Ala	Gly
	435	440	445

His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu
 450 455 460

Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro
 465 470 475 480

Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln
 485 490 495

Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro
 500 505 510

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu
 515 520 525

<210> 11

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(120)

<223> Варіабельна ділянка важкого ланцюга антитіла mAb 1 до LAG-3

<400> 11

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

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(107)

<223> Варіабельна ділянка легкого ланцюга антитіла mAb 1 до LAG-3

<400> 12

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> лінкер 1

<400> 13

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 14

<211> 28

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Е-спіральний домен, який полегшує утворення гетеродимеру

<400> 14

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

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

<210> 15

<211> 28

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> К-спіральний домен, який полегшує утворення гетеродимеру

<400> 15

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

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

<210> 16

<211> 28

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Е-спіральний домен, який полегшує утворення гетеродимеру та містить цистеїн

<400> 16

Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val

1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys

20 25

<210> 17

<211> 28

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> К-спіральний домен, який полегшує утворення гетеродимеру та містить цистеїн

<400> 17

Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val

1 5 10 15

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

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Спейсерний пептид, що містить цистеїн

<400> 18

Gly Gly Cys Gly Gly Gly
1 5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> лінкерний пептид, що містить цистеїн

<400> 19

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Альтернативний лінкерний пептид, що містить цистеїн

<400> 20

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

1 5 10 15

<210> 21

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(218)

<223> Fc-ділянка IgG1

<400> 21

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

1	5	10	15
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
	20	25	30
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
	35	40	45
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	50	55	60
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
65	70	75	80
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	85	90	95
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	100	105	110
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu			
	115	120	125

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 22

<211> 218

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> CH2-CH3 домен IgG1, "який містить виступ"

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 23

<211> 218

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CH2-CH3 домен IgG1, "який містить западину"

<400> 23

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

35 40 45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

50 55 60

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

65 70 75 80

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 24

<211> 217

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> L234A/L235A варіант Fc-ділянки IgG1

<400> 24

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys

20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

35 40 45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

50 55 60

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

210

215

<210> 25

<211> 494

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> перший і третій поліпептидні ланцюги ілюстративного діатіла PD-1 x LAG-3
Fc-DART-1

<400> 25

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
115 120 125

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe
130 135 140

Ser Asn Ser Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala
165 170 175

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
180 185 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 210 215 220

Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu
 225 230 235 240

Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu
 245 250 255

Val Ala Ala Leu Glu Lys Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His
 260 265 270

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 275 280 285

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu
 290 295 300

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

305	310	315	320
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
	325	330	335
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
	340	345	350
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
	355	360	365
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile			
	370	375	380
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro			
385	390	395	400
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu			
	405	410	415
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			
	420	425	430

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
435 440 445

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
450 455 460

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
465 470 475 480

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
485 490

<210> 26

<211> 1482

<212> DNA

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Полінуклеотид, який кодує перший і третій поліпептидні ланцюги
ілюстративного діатіла PD-1 x LAG-3 FC-DART-1

<400> 26

gaaattgtcc tgacacagtc tcccgcgaacc ctgagtttga gtcctgggga gcgagcaact 60

ctctcctgcc gagcctccca gagtatctcc tcctacctcg cctgggtacca acagaagcca 120

gggcaggctc caaggctgct tatctatgac gcctctaacc gcgcaactgg gattccccga 180

cgcttctccg gctctggttc cggcacagac ttacactta ctatctctag cctggagcca	240
gaagactttg ccgtgtacta ttgtcagcaa cgttccaatt ggccccctac ctttgggcag	300
ggcactaact tggaaatcaa aggtggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtc	360
gagagtggtg gcggcgttgt gcaacctggg cgttccctcc gattggactg taaagcttcc	420
ggcattactt tctcaaattc cggcatgcat tgggtgaggc aagccccctg aaaagggctc	480
gaatgggttg ctgtgatttg gtacgatggc agcaaacggt actacgccga ttctgttaag	540
ggccgcttta ccatctcccg cgataactca aagaacacac tgtttctgca aatgaatagt	600
cttagagccg aggacaccgc cgtgtactac tgtgccacaa atgacgatta ttgggggcag	660
ggcacatttg tcacagtgtc ttccggagga tgtggcggtg gagaagtggc cgcattgtgag	720
aaagaggttg ctgctttgga gaaggaggtc gctgcacttg aaaaggaggt cgcagccctg	780
gagaaactgg agcccaaadc tgctgacaaa actcacacat gccaccctg cccagcacct	840
gaagccgcgg ggggaccgtc agtcttcttc ttccccccaa aaccaagga caccctctat	900
atcaccgcgg agcctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag	960
gtcaagttca actggtacgt ggacggcggt gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg	1020
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgctc tcaccgtcct gcaccaggac	1080

tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatt 1140

gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1200

ccatccccggg aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc 1260

tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1320

accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tcctttcttc tctacagcaa gctcaccgtg 1380

gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1440

cacaaccact acacgcagaa gagcctcttc ctgtctccgg gt 1482

<210> 27

<211> 269

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Другий і четвертий поліпептидні ланцюги ілюстративного діатіла PD-1 x
LAG-3 FC-DART-1

<400> 27

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

```

      20              25              30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
    35              40              45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50              55              60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
    65              70              75              80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
          85              90              95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
        100              105              110
Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
        115              120              125
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
        130              135              140

```

Ser Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro
165 170 175

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

Phe Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
195 200 205

Tyr Cys Ala Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro
210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly
225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys
245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265

<210> 28

<211> 807

<212> DNA

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Полінуклеотид, який кодує другий і четвертий поліпептидні ланцюги ілюстративного діатіла PD-1 x LAG-3 Fc-DART-1

<400> 28

gagatcgtag ttaccagtc tcccgccacc ctttcctga gtcctggtga gcgggccact	60
ctttcctgtc gcgcaagcca atcagtttct agctacctcg catggtatca gcagaagcca	120
gggcaggcac ccaggcttct catctatgac gccagtaacc gcgcaaccgg gatacctgct	180
agattttccg gcagtggtac tgggaccgat ttcacactga caatttcac cttggaacca	240
gaagatttcg cagtctacta ctgccagcaa tcttccaact ggccaagaac tttcggacag	300
gggaccaaag tggaaattaa aggtggcgga tccggcgcg gaggccaggt ccagctccag	360
caatggggag ccgggctgct gaaaccctct gaaacactga gtctcacatg tgccgtttat	420
ggaggttcct tctccgatta ttactggaac tggattcgtc agcctcccgg caagggcctg	480
gagtggatcg gtgagattaa ccacaatggc aataccaata gcaatcctag tttgaaatct	540
cgcgtcactc tttccctcga tacaagcaaa aaccagtttt ctttgaaatt gcgatctgta	600

actgctgctg atactgccgt gtattactgc gcattcggct actccgacta tgaatataat 660
 tggttcgatc cttggggaca gggaacattg gtaaccgtgt catccggagg atgtggcggt 720
 ggaaaagtgg ccgcatgtaa ggagaaagtt gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt 780
 aaggaaaagg tcgcagccct gaaagag 807

<210> 29

<211> 501

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Перший і третій поліпептидні ланцюги ілюстративного діатіла PD-1 x LAG-3
 FC-DART-2

<400> 29

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
115 120 125

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
130 135 140

Ser Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro
165 170 175

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

Phe Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 195 200 205

Tyr Cys Ala Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro
 210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu
 245 250 255

Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Leu Glu Pro
 260 265 270

Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 275 280 285

Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

290	295	300	
Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
305	310	315	320
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			
	325	330	335
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn			
	340	345	350
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp			
355	360	365	
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro			
370	375	380	
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
385	390	395	400
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn			
	405	410	415

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 420 425 430

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 435 440 445

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 450 455 460

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 465 470 475 480

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 485 490 495

Ser Leu Ser Pro Gly
 500

<210> 30

<211> 1503

<212> DNA

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Полінуклеотид, що кодує перший і третій поліпептидні ланцюги

ілюстративного діатіла PD-1 x LAG-3 Fc-DART-2

<400> 30

gagatcgtac ttaccagtc tcccgccacc ctttccctga gtcctggtga gcgggccact	60
ctttcctgtc gcgcaagcca atcagtttct agctacctcg catggtatca gcagaagcca	120
gggcaggcac ccaggcttct catctatgac gccagtaacc gcgcaaccgg gatacctgct	180
agattttccg gcagtggatc tgggaccgat ttcacactga caatttcac cttggaacca	240
gaagatttcg cagtcacta ctgccagcaa tcttccaact ggccaagaac tttcggacag	300
gggaccaaag tggaaattaa aggtggcgga tccggcgcg gaggccaggt ccagctccag	360
caatggggag ccgggctgct gaaaccctct gaaacactga gtctcacatg tgccgtttat	420
ggaggttcct tctccgatta ttactggaac tggattcgtc agcctcccgg caagggcctg	480
gagtggatcg gtgagattaa ccacaatggc aataccaata gcaatcctag ttgaaatct	540
cgcgtcactc tttccctcga tacaagcaaa aaccagtttt ctttgaaatt gcgatctgta	600
actgctgctg atactgccgt gtattactgc gcattcggct actccgacta tgaatataat	660
tggttcgatc cttggggaca gggaacattg gtaaccgtgt catccggagg atgtggcggg	720
ggagaagtgg ccgcatgtga gaaagaggtt gctgctttgg agaaggaggt cgctgcactt	780
gaaaaggagg tcgcagccct ggagaaactg gagcccaaat ctgctgacaa aactcacaca	840

tgcccaccgt gccagcacc tgaagccgcg gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca	900
aaaccaaggt acaccctcta tatcaccgcg ggcctgagg tcacatgcgt ggtggtggac	960
gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat	1020
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc	1080
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac	1140
aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaaggga gccccgagaa	1200
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg	1260
acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg	1320
cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc	1380
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc	1440
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg	1500
ggt	1503

<210> 31

<211> 262

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> Другий і четвертий поліпептидні ланцюги ілюстративного діатіла PD-1 x
LAG-3 Fc-DART-2

<400> 31

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 115 120 125

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe
 130 135 140

Ser Asn Ser Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 145 150 155 160

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala
 165 170 175

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 180 185 190

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

Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 210 215 220

Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys

225 230 235 240

Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys

245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu

260

<210> 32

<211> 786

<212> DNA

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Полінуклеотид, що кодує другий і четвертий поліпептидні ланцюги ілюстративного діатіла PD-1 x LAG-3 Fc-DART-2

<400> 32

gaaattgtcc tgacacagtc tcccgaacc ctgagtttga gtcctgggga gcgagcaact 60

ctctcttgcc gagcctccca gagtatctcc tctacctcg cctgggtacca acagaagcca 120

gggcaggctc caaggctgct tatctatgac gcctctaacc gcgcaactgg gattcccgca 180

cgcttctccg gctctggttc cggcacagac ttacactta ctatctctag cctggagcca 240

gaagactttg ccgtgtacta ttgtcagcaa cgttccaatt ggcccccttac ctttgggcag 300

ggcactaact tggaaatcaa aggtggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtc	360
gagagtgggtg gcggcggtgt gcaacctggg cgttccctcc gattggactg taaagcttcc	420
ggcattactt tctcaaattc cggcatgcat tgggtgaggc aagccccctg aaaagggctc	480
gaatgggtgg ctgtgatttg gtacgatggc agcaaacggg actacgccga ttctgttaag	540
ggccgcttta ccatctcccg cgataactca aagaacacac tgtttctgca aatgaatagt	600
cttagagccg aggaacccgc cgtgtactac tgtgccacaa atgacgatta ttgggggcag	660
ggcacattgg tcacagtgtc ttccggagga tgtggcggtg gaaaagtggc cgcagtgaag	720
gagaaaagttg ctgctttgaa agagaaggtc gccgcactta aggaaaaggt cgcagccctg	780
aaagag	786

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Біспецифічне Fc-діатіло, яке здатне імуноспецифічно зв'язуватися з епітопом PD-1 і з епітопом LAG-3, причому зазначене діатіло містить чотири поліпептидні ланцюги, кожний з яких має N-кінець і C-кінець, в якому:
 - (A) зазначені перший і другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один з одним, зазначені перший і третій поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один з одним, і зазначені третій і
 10 четвертий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один з одним;
 - (B) кожний із зазначених першого та третього поліпептидних ланцюгів зазначеного діатіла містить у напрямку від N-кінця до C-кінця варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до PD-1 або LAG-3, варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до LAG-3 або PD-1, та домен CH2-CH3, причому зазначені варіабельні
 15 домени легкого ланцюга та зазначені варіабельні домени важкого ланцюга не здатні асоціюватися з формуванням епітоп-зв'язувального сайту, здатного зв'язувати епітоп PD-1 або епітоп LAG-3; і
 - (C) кожний із зазначених другого та четвертого поліпептидних ланцюгів зазначеного діатіла містить у напрямку від N-кінця до C-кінця варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до PD-1 або LAG-3, варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до LAG-3 або PD-1, причому зазначені варіабельні домени легкого ланцюга та зазначені варіабельні домени важкого ланцюга не здатні асоціюватися з формуванням епітоп-зв'язувального сайту, здатного зв'язувати епітоп PD-1 або епітоп LAG-3;
 20 в якому:
- 25 I. (1) зазначений варіабельний домен легкого ланцюга зазначеного першого поліпептидного ланцюга та зазначений варіабельний домен важкого ланцюга зазначеного другого поліпептидного ланцюга асоціюються з формуванням першого епітоп-зв'язувального сайту, а зазначений варіабельний домен важкого ланцюга зазначеного першого поліпептидного ланцюга та зазначений варіабельний домен легкого ланцюга зазначеного другого поліпептидного
 30 ланцюга асоціюються з формуванням другого епітоп-зв'язувального сайту; та
- (2) зазначений варіабельний домен легкого ланцюга зазначеного третього поліпептидного ланцюга та зазначений варіабельний домен важкого ланцюга зазначеного четвертого

поліпептидного ланцюга асоціюються з формуванням третього епітоп-зв'язувального сайту, а зазначений варіабельний домен важкого ланцюга зазначеного третього поліпептидного ланцюга та зазначений варіабельний домен легкого ланцюга зазначеного четвертого поліпептидного ланцюга асоціюються з формуванням четвертого епітоп-зв'язувального сайту;

5 причому два зазначених сформованих епітоп-зв'язувальних сайти здатні імуноспецифічно зв'язуватися з епітопом PD-1, а два зазначених сформованих епітоп-зв'язувальних сайти здатні імуноспецифічно зв'язуватися з епітопом LAG-3; і

II. зазначені домени CH2-CH3 у зазначених першому та третьому поліпептидних ланцюгах асоціюються з формуванням Fc-домени.

10 2. Біспецифічне Fc-діатіло за п. 1, у якому:

(A) кожний із зазначеного першого та третього поліпептидних ланцюгів зазначеного діатіла містить у напрямку від N-кінця до C-кінця варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до PD-1 або LAG-3, варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до LAG-3 або PD-1, домен, який полегшує утворення гетеродимеру, та домен CH2-CH3, причому зазначені варіабельні домени легкого ланцюга та зазначені варіабельні домени важкого ланцюга не здатні асоціюватися з формуванням епітоп-зв'язувального сайту, здатного зв'язувати епітоп PD-1 або епітоп LAG-3; і

(C) кожний із зазначених другого та четвертого поліпептидних ланцюгів зазначеного діатіла містить у напрямку від N-кінця до C-кінця варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до PD-1 або LAG-3, варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до LAG-3 або PD-1, та домен, який полегшує утворення гетеродимеру, причому зазначені варіабельні домени легкого ланцюга та зазначені варіабельні домени важкого ланцюга не здатні асоціюватися з формуванням епітоп-зв'язувального сайту, здатного зв'язувати епітоп PD-1 або епітоп LAG-3;

25 причому зазначений домен, що полегшує утворення гетеродимеру у зазначених першому та третьому поліпептидних ланцюгах, відрізняється від зазначеного домену, що полегшує утворення гетеродимеру у зазначених другому та четвертому поліпептидних ланцюгах.

3. Біспецифічне Fc-діатіло за п. 2, у якому:

(1) зазначений домен, що полегшує утворення гетеродимеру у зазначених першому та третьому поліпептидних ланцюгах, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14, та зазначений домен, що полегшує утворення гетеродимеру у зазначених другому та четвертому поліпептидних ланцюгах, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15; або

(2) зазначений домен, що полегшує утворення гетеродимеру у зазначених першому та третьому поліпептидних ланцюгах, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15, та зазначений домен, що полегшує утворення гетеродимеру у зазначених другому та четвертому поліпептидних ланцюгах, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14; або

(3) зазначений домен, що полегшує утворення гетеродимеру у зазначених першому та третьому поліпептидних ланцюгах, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16 та зазначений домен, що полегшує утворення гетеродимеру у зазначених другому та четвертому поліпептидних ланцюгах, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17; або

(4) зазначений домен, що полегшує утворення гетеродимеру у зазначених першому та третьому поліпептидних ланцюгах, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17, та зазначений домен, що полегшує утворення гетеродимеру у зазначених другому та четвертому поліпептидних ланцюгах, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16.

45 4. Біспецифічне Fc-діатіло за будь-яким одним із пп. 2-3, у якому зазначений домен, що полегшує утворення гетеродимеру у зазначеному першому поліпептидному ланцюгу, містить послідовність SEQ ID NO: 14, та зазначений домен, що полегшує утворення гетеродимеру у зазначеному другому поліпептидному ланцюгу містить послідовність SEQ ID NO: 15.

50 5. Біспецифічне Fc-діатіло за будь-яким одним із пп. 2-3, у якому зазначений домен, що полегшує утворення гетеродимеру у зазначеному першому поліпептидному ланцюгу, містить послідовність SEQ ID NO: 16, та зазначений домен, що полегшує утворення гетеродимеру у зазначеному другому поліпептидному ланцюгу містить послідовність SEQ ID NO: 17.

6. Біспецифічне Fc-діатіло за будь-яким одним із пп. 1-5, у якому кожний із зазначених доменів CH2-CH3 у зазначених першому та третьому поліпептидних ланцюгах містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24.

7. Біспецифічне Fc-діатіло за будь-яким одним із пп. 1 -6, в якому зазначений варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до LAG-3, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, а зазначений варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до LAG-3, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12.

8. Біспецифічне Fc-діатіло за будь-яким одним із пп. 1-7, в якому зазначений варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до PD-1, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, та зазначений варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до PD-1, містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3.

5 9. Біспецифічне Fc-діатіло за будь-яким одним із пп. 1-8, в якому:

(А) кожний із зазначеного першого та третього поліпептидних ланцюгів містить варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до PD-1, та варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до LAG-3; і

10 (В) кожний із зазначеного другого та четвертого поліпептидних ланцюгів містить варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до LAG-3, та варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до PD-1.

10. Біспецифічне Fc-діатіло за будь-яким одним із пп. 1-8, в якому:

15 (А) кожний із зазначеного першого та третього поліпептидних ланцюгів містить варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до LAG-3, та варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до PD-1; і

(В) кожний із зазначеного другого та четвертого поліпептидних ланцюгів містить варіабельний домен легкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до PD-1, та варіабельний домен важкого ланцюга антитіла, яке є імуноспецифічним до LAG-3.

11. Фармацевтична композиція, яка містить ефективну кількість біспецифічного Fc-діатіла за будь-яким одним із пп. 1-10 і фармацевтично прийнятний носій.

12. Фармацевтична композиція за п. 11, причому зазначена ефективна кількість зазначеного біспецифічного Fc-діатіла є кількістю, ефективною для лікування злоякісної пухлини в індивідуума, який її приймає та потребує такого лікування.

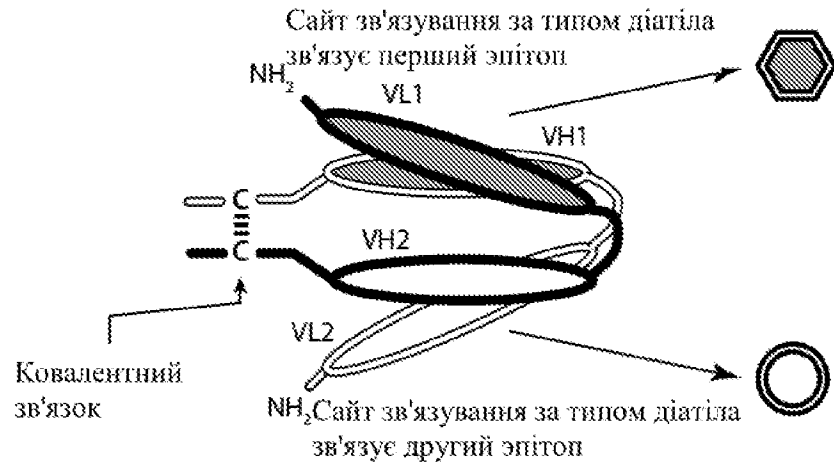
13. Фармацевтична композиція за п. 12, причому зазначена злоякісна пухлина являє собою злоякісну пухлину надниркової залози, асоційовану зі СНІДом злоякісну пухлину, альвеолярну саркому м'яких тканин, астроцитарну пухлину, злоякісну пухлину сечового міхура, злоякісну пухлину кісток, злоякісну пухлину головного та спинного мозку, метастатичну пухлину головного мозку, злоякісну пухлину молочної залози, пухлину каротидного тільця, злоякісну пухлину шийки матки, хондросаркому, хордому, хромофобну нирково-клітинну карциному, світлоклітинну карциному, злоякісну пухлину товстої кишки, колоректальну злоякісну пухлину, нашірну доброякісну фіброзну гістіоцитому, десмопластичну дрібноокруглоклітинну пухлину, епендіому, пухлину Юінга, позаскелетну слизоподібну хондросаркому, недосконалий кістковий фіброгенез, фіброзну дисплазію кістки, злоякісну пухлину жовчного міхура або жовчної протоки, гастральну злоякісну пухлину, гестаційну трофобластичну хворобу, ембріонально-клітинну пухлину, злоякісну пухлину голови та шиї, гепатоклітинну карциному, пухлину острівців підшлункової залози, саркому Калощі, злоякісну пухлину нирки, лейкоз, ліпому/доброякісну ліпоматозну пухлину, ліпосаркому/злоякісну ліпоматозну пухлину, злоякісну пухлину печінки, лімфому, злоякісну пухлину легені, гранулобластому, меланому, менінгіому, множинні ендокринні неоплазії, множинну мієлому, мієлодиспластичний синдром, нейробластому, нейроендокринні пухлини, злоякісну пухлину яєчника, злоякісну пухлину підшлункової залози, соскоподібну карциному щитоподібної залози, пухлину парашитоподібних залоз, злоякісну пухлину у дітей, пухлину піхви периферичного нерва, феохромоцитому, пухлину гіпофіза, злоякісну пухлину простати, пізню увеальну меланому, порушення, пов'язане з розрідженням крові, ниркову метастатичну злоякісну пухлину, паличкоподібну пухлину, рабдоміосаркому, саркому, злоякісну пухлину шкіри, саркому м'якої тканини, плоскоклітинну злоякісну пухлину, злоякісну пухлину шлунка, синовіальну саркому, злоякісну пухлину яєчка, тимусну карциному, тімому, метастатичну злоякісну пухлину щитоподібної залози або злоякісну пухлину матки.

14. Фармацевтична композиція за п. 11, причому ефективна кількість зазначеного біспецифічного Fc-діатіла є кількістю, ефективною для лікування захворювання, асоційованого з наявністю патогену, у індивідуума, який її приймає та потребує такого лікування.

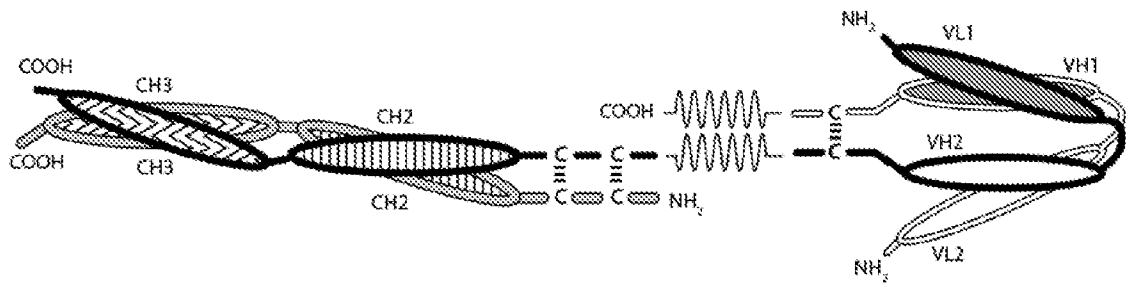
15. Фармацевтична композиція за п. 14, причому зазначеним патогеном є бактерія, гриб або вірус.

16. Застосування біспецифічного Fc-діатіла за будь-яким одним із пп. 1-10, або фармацевтичної композиції за будь-яким одним із пп. 12-13 у виробництві лікарського засобу для лікування злоякісної пухлини.

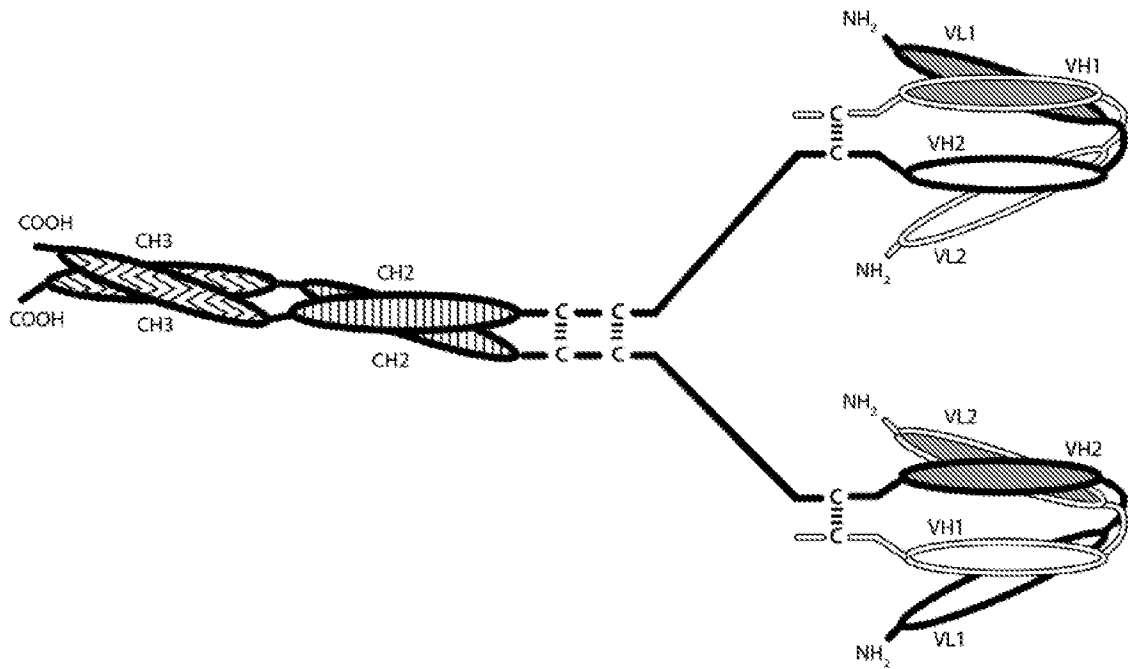
17. Застосування біспецифічного Fc-діатіла за будь-яким одним із пп. 1-10, або фармацевтичної композиції за будь-яким одним із пп. 14-15 у виробництві лікарського засобу для лікування захворювання, асоційованого з наявністю патогену.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

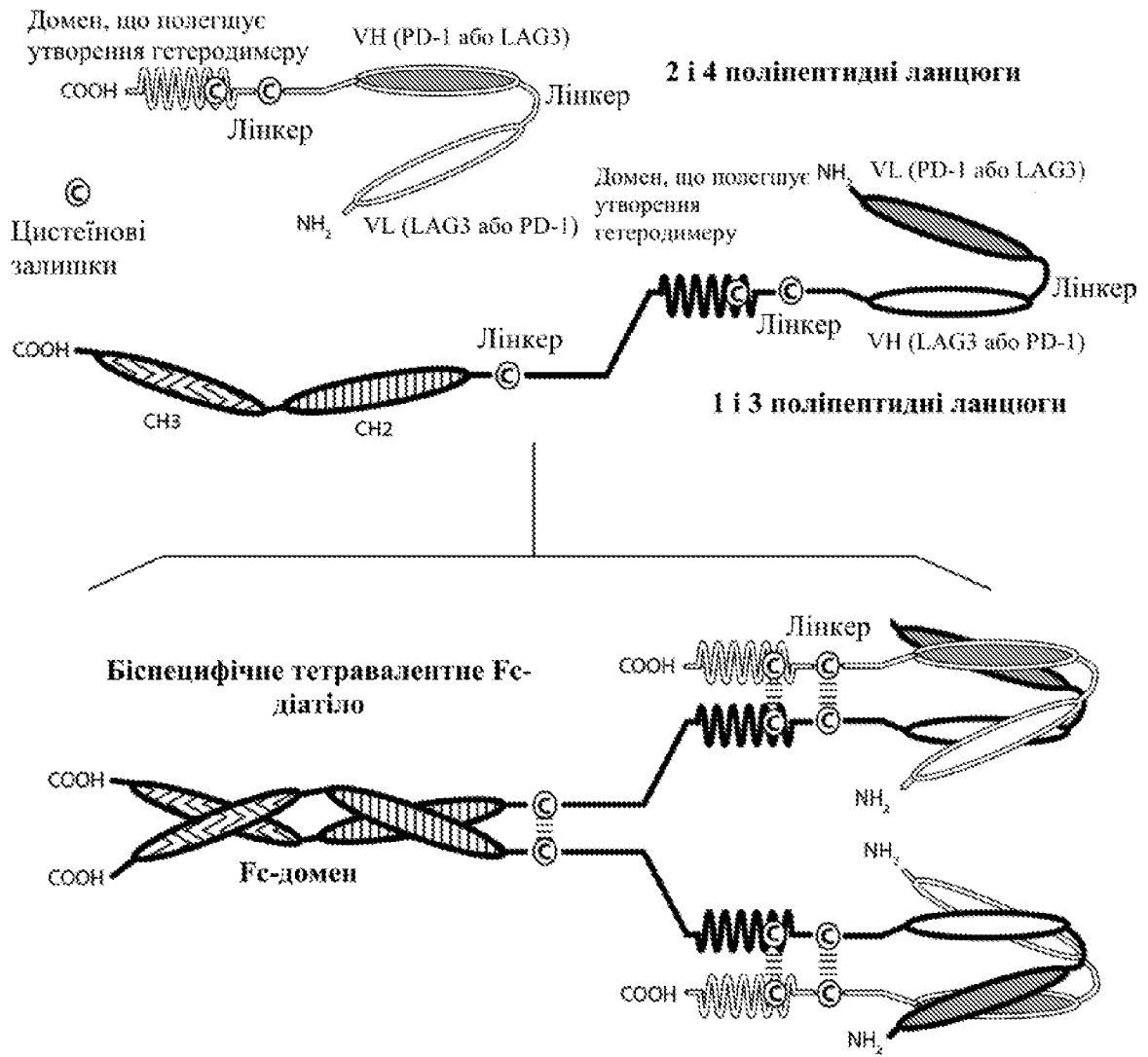
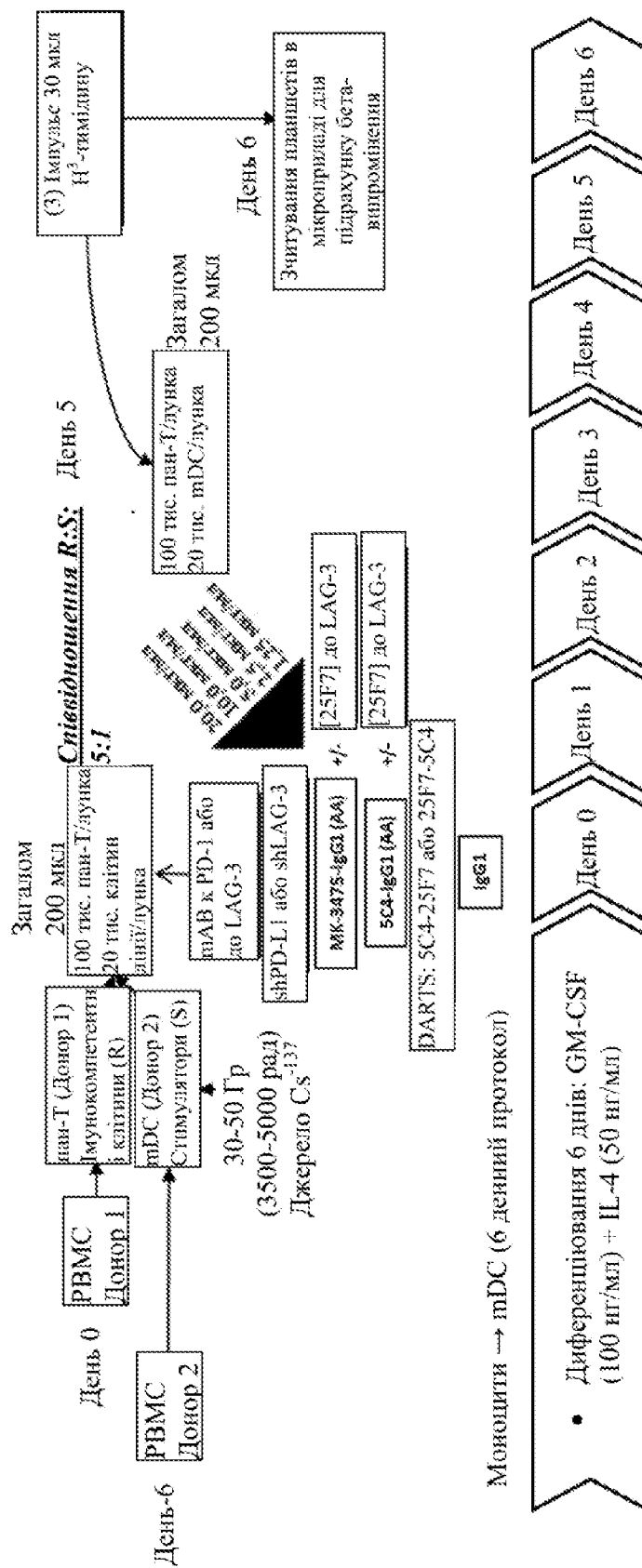
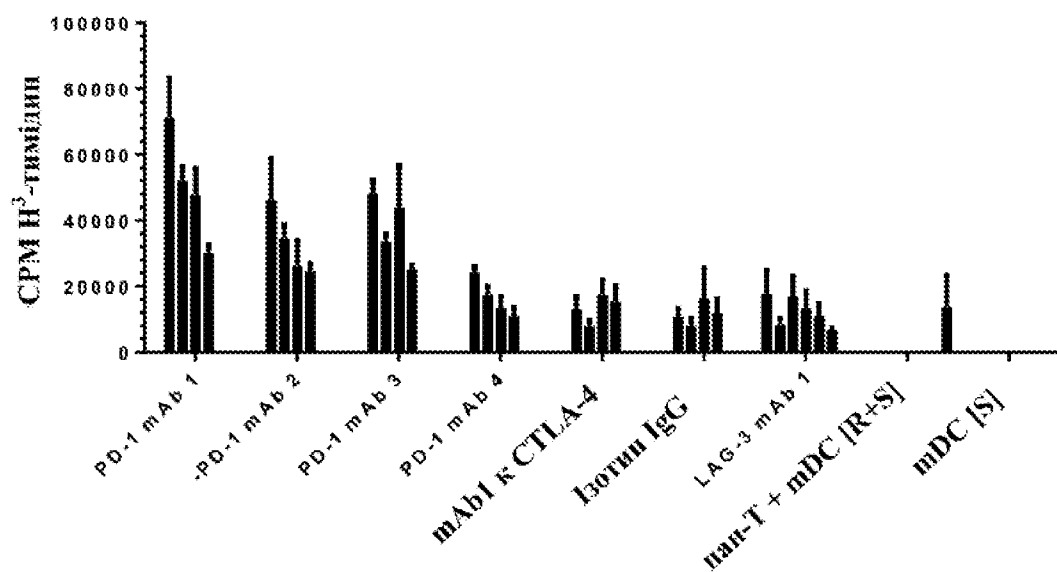


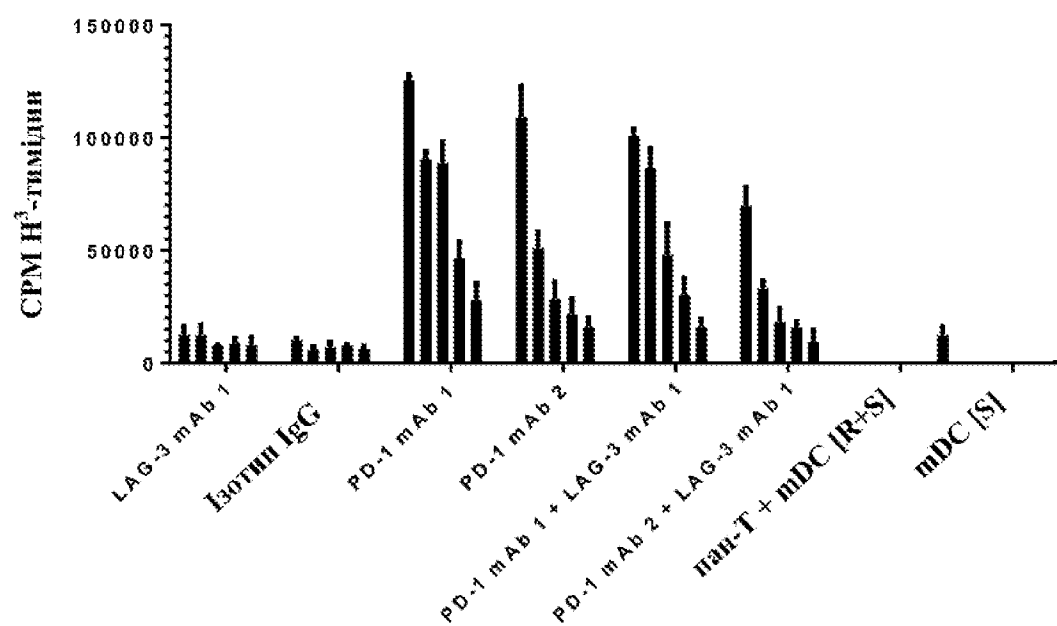
Fig. 4



Φir. 5



Фіг. 6



Фіг. 7

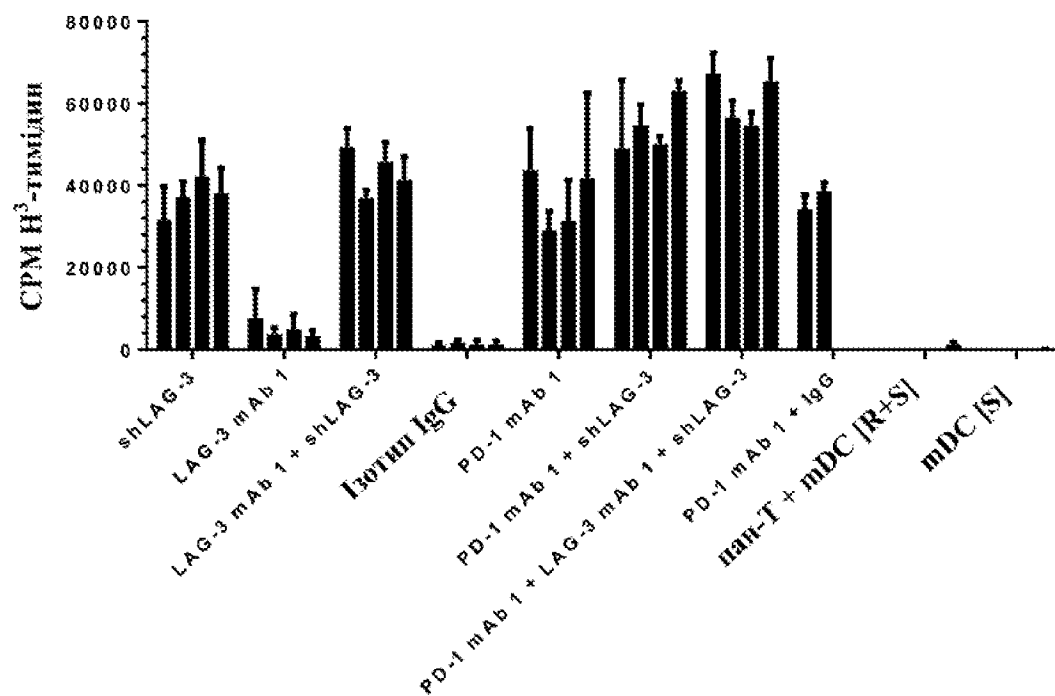


Fig. 8

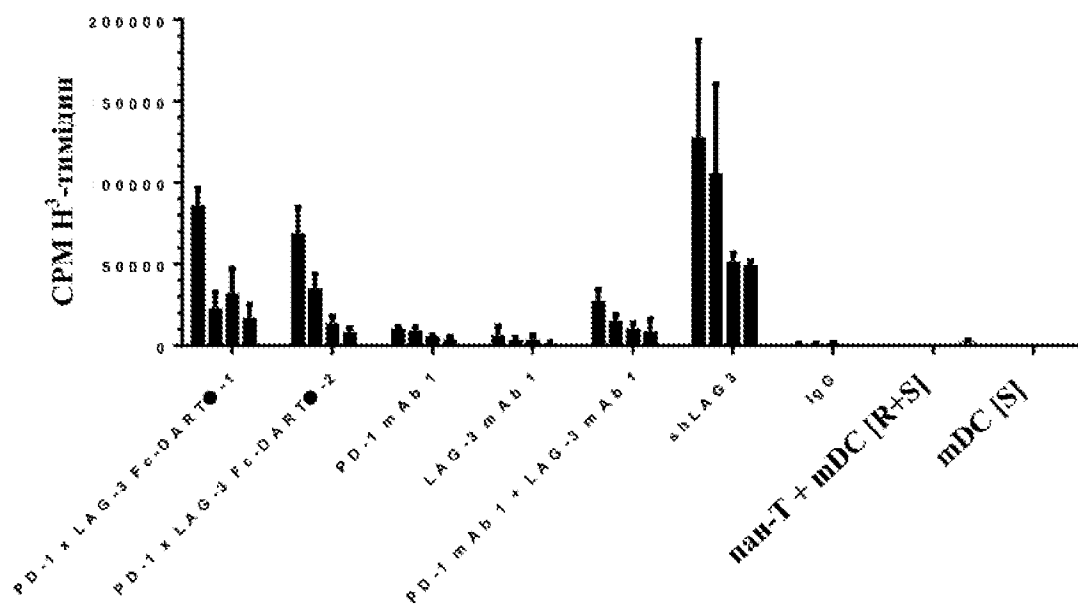
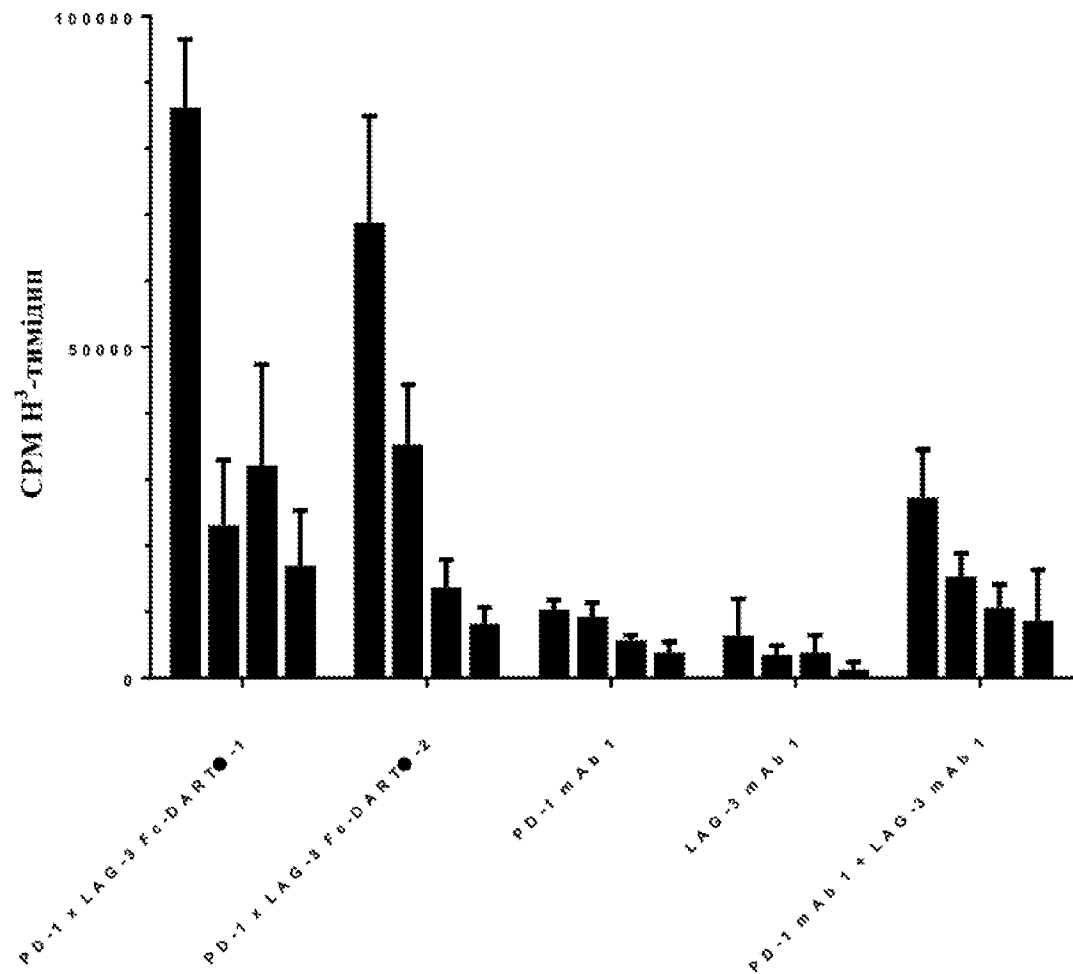


Fig. 9A



Фіг. 9В

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601