



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128451** (13) **C2**
(51) МПК (2024.01)**C07K 16/28** (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)

A61P 35/00

A61P 37/02 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2019 10132	(72) Винахідник(и):	Кодаррі Деак Лаура (CH), Фішер Єнс (DE), Імхоф-Юнг Забіне (DE), Кляйн Крістіан (CH), Зебер Штефан (DE), Вебер Патрік Александер Аарон (CH), Перро Маріо (CH)
(22) Дата подання заявки:	03.04.2018	(73) Володілець (володільці):	Ф. ХОФФМАНН-ЛЯ РОШ АГ, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland (CH)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	18.07.2024	(74) Представник:	Петров Андрій Володимирович, реєстр. №139
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	17165125.0	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2015/107026 A1, 23.07.2015 WO 2017/150447 A1, 16.11.2017 WO 2017/194641 A1, 16.11.2017 WO 2017/055443 A1, 06.04.2017 WO 2017/055404 A1, 06.04.2017 KLOOSTER R. et al. Generation of immuno- modulatory receptor binding bispecific antibodies to modulate tumor immunity (B088). [Інтернет публікація від 26.09.2016], URL: https://merus.nl/wp-content/uploads/2019/02/Poster-ICIC-New-York-26Sep16.pdf BERNETT M. J. et al Multiple bispecific checkpoint combinations promote T cell activation negative control. [Інтернет публікація від 06.11.2016], URL: https://investors.xencor.com/static-files/f388d30a-3d0d-4a69-9a43-876a3b38f79f KRAMAN M. et al. A LAG-3/PD-L1 bispecific antibody inhibits tumor growth in two syngeneic colon carcinoma models. [Інтернет публікація від 13.11.2016], URL: https://www.semanticscholar.org/paper/Abstract-PR06%3A-A-LAG-3-PD-L1-bispecific-antibody-in-Doody-Kraman/8b5fad282296d9a048166e298d7b27b5d53b77de
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	05.04.2017		
(33) Код держави- учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.04.2020, Бюл.№ 7		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	17.07.2024, Бюл.№ 29		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2018/058382, 03.04.2018		

(54) БІСПЕЦИФІЧНЕ АНТИТІЛО, ЯКЕ СПЕЦИФІЧНО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З PD1 І LAG3

UA 128451 C2

(57) Реферат:

Винахід стосується біспецифічного антитіла, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3. Винахід також стосується поліпуклеотиду, що кодує біспецифічне антитіло, прокаріотичної або еукаріотичної клітини-хазяїна, фармацевтичної композиції, способу одержання біспецифічного антитіла.

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Цей винахід відноситься до біспецифічних антитіл, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, та другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, зокрема до біспецифічних антитіл, що додатково містять Fc-домен, який містить одну або більше амінокислотних замін, які зменшують зв'язування з Fc-рецептором, зокрема з Fcγ-рецептором. Винахід також відноситься до способів отримання цих молекул і до способів їхнього застосування.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Важливість імунної системи в захисті від злоякісних новоутворень заснована на її здатності виявляти і знищувати аномальні клітини. Тим не менш, деякі пухлинні клітини можуть уникати імунної системи, викликаючи стан імуносупресії (Zitvogel et al., *Nature Reviews Immunology* 6 (2006), 715-727). Т-клітини відіграють важливу роль у протівірусних та протипухлинних імунних відповідях. Відповідна активація антигенспецифічних Т-клітин призводить до їх клонального розмноження і надбання ними ефекторних функцій, а в разі цитотоксичних Т-лімфоцитів (ЦТЛ) дозволяє їм специфічно лізувати цільові клітини. Основні зусилля були зосереджені на Т-клітинах щодо терапевтичного маніпулювання ендogenous протипухлинним імунітетом завдяки їх здатності вибірково розпізнавати пептиди, отримані з білків у всіх клітинних компартментах; їхній здатності безпосередньо розпізнавати та вбивати антигенекспресуючі клітини (за допомогою CD8⁺ ефекторних Т-клітин; також відомих як цитотоксичні Т-лімфоцити (ЦТЛ)) та їхні здатності організовувати різноманітні імунні відповіді (за допомогою CD4⁺ Т-хелперів), які інтегрують адаптивний і вроджений ефекторні механізми. Дисфункція Т-клітин виникає в результаті тривалого впливу антигена: Т-клітина втрачає здатність проліферувати в присутності антигена та поступово втрачає здатність продукувати цитокіни і лізувати цільові клітини. Дисфункціональні Т-клітини були названі виснаженими Т-клітинами та вони не здатні проліферувати та виконувати ефекторні функції, такі як цитотоксичність і секреція цитокінів, у відповідь на стимуляцію антигеном. Подальші дослідження продемонстрували, що виснажені Т-клітини характеризуються стійкою експресією інгібуючої молекули PD-1 (білок запрограмованої смерті клітини 1) і що блокування взаємодій PD-1 і PD-L1 (ліганд PD-1) може обернути виснаження Т-клітин і відновити антигенспецифічні Т-клітинні відповіді у мишей, які інфіковані ВЛХМ (Barber et al., *Nature* 439 (2006), 682-687). Однак націлювання лише на шлях PD-1 - PD-L1 не завжди призводить до оборотного виснаження Т-клітин (Gehring et al., *Gastroenterology* 137 (2009), 682-690), що вказує на те, що інші молекули, ймовірно, залучені у виснаження Т-клітин (Sakuishi, *J. Experimental Med.* 207 (2010), 2187-2194).

Ген активації лімфоцитів-3 (LAG3 або CD223) був спочатку виявлений в експерименті, призначеному для селективного виділення молекул, які експресуються в ІЛ-2-залежній лінії NK-клітин (Triebel F et al., *Cancer Lett.* 235 (2006), 147-153). LAG3 є унікальним трансмембранним білком зі структурною гомологією до CD4 з чотирма позаклітинними доменами, подібними до суперсімейства імуноглобулінів (D1-D4). Мембранно-дистальний домен IgG містить коротку амінокислотну послідовність, так звану додаткову петлю, яка не розпізнається в інших білках суперсімейства IgG. Внутрішньоклітинний домен містить унікальну амінокислотну послідовність (KIEELE, SEQ ID NO: 75), яка необхідна для того, щоб LAG3 впливав негативно на функцію Т-клітин. LAG3 може розщеплюватися за з'єднувальним пептидом (CP) за допомогою металопроtease з утворенням розчинної форми, яка виявляється в сироватці. Як і CD4, білок LAG3 зв'язується з молекулами ГКГС класу II, проте з більш високою афінністю та у відмінному від CD4 сайті (Huard et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), 5744-5749). LAG3 експресується Т-клітинами, В-клітинами, NK-клітинами і плазмоцитоїдними дендритними клітинами (pDC) і збільшується кількісно після активації Т-клітин. Він модулює функцію Т-клітин, а також гомеостаз Т-клітин. Підмножина типових Т-клітин, які є анергічними або проявляють порушення своїх функцій, експресує LAG3. LAG3⁺ Т-клітини накопичуються в місцях пухлин і під час хронічних вірусних інфекцій (Sierro et al. *Expert Opin. Ther. Targets* 15 (2011), 91-101). Було показано, що LAG3 бере участь у виснаженні CD8 Т-клітин (Blackburn et al. *Nature Immunol.* 10 (2009), 29-37). Таким чином, існує потреба в антитілах, які протидіють активності LAG3 і можуть бути використані для генерації та відновлення імунної відповіді щодо пухлин.

Моноклональні антитіла до LAG3 були описані, наприклад, у WO 2004/078928, де заявлено композицію, що містить антитіла, які специфічно зв'язуються з CD223, і протиракова вакцина. У WO 2010/019570 розкрито людські антитіла, які зв'язують LAG3, наприклад, антитіла 25F7 і 26H10. US 2011/070238 відноситься до цитотоксичного анти-LAG3 антитіла, придатного для лікування або профілактики відторгнення трансплантата органа та аутоімунного захворювання. У WO 2014/008218 описано антитіла до LAG3 з оптимізованими функціональними властивостями (тобто зі зменшеними сайтами дезамідування) у порівнянні з антитілом 25F7.

Крім того, антитіла до LAG3 розкриті у WO 2015/138920 (наприклад, BAP050), WO 2014/140180, WO 2015/116539, WO 2016/028672, WO 2016/126858, WO 2016/200782 і WO 2017/015560.

Білок запрограмованої смерті клітини 1 (PD-1 або CD279) є інгібуючим членом сімейства рецепторів CD28, яке також включає CD28, CTLA-4, ICOS і BTLA. PD-1 є рецептором клітинної поверхні та експресується на активованих В-клітинах, Т-клітинах і мієлоїдних клітинах (Okazaki et al. (2002) Curr. Opin. Immunol. 14:391779-82; Bennett et al. (2003) J. Immunol. 170:711-8). Структурно PD-1 являє собою мономерний трансмембранний білок типу 1, що складається з одного позаклітинного варіабельного домену імуноглобуліну і цитоплазматичного домену, що містить імунорецепторний тирозиновий інгібуючий мотив (ITIM) і імунорецепторний тирозиновий переключаючий мотив (ITSM). Активовані Т-клітини тимчасово експресують PD1, але стійка гіперекспресія PD1 і його ліганда PDL1 сприяє виснаженню імунітету, що призводить до персистенції вірусних інфекцій, ухилення пухлини від імунологічної відповіді, збільшення числа інфекцій та смертності. Експресія PD1 індукується за допомогою впізнання антигена через рецептор Т-клітин, і його експресія підтримується головним чином за допомогою безперервної передачі сигналів рецептора Т-клітин. Після тривалого впливу антигена локус PD1 не може бути повторно метильований, що сприяє постійній гіперекспресії. Блокування шляху PD1 може відновити функціональність виснажених Т-клітин при злоякісному новоутворенні та хронічних вірусних інфекціях (Sheridan, Nature Biotechnology 30 (2012), 729-730). Моноклональні антитіла до PD-1 були описані, наприклад, в WO 2003/042402, WO 2004/004771, WO 2004/056875, WO 2004/072286, WO 2004/087196, WO 2006/121168, WO 2006/133396, WO 2007/005874, WO 2008/083174, WO 2008/156712, WO 2009/024531, WO 2009/014708, WO 2009/101611, WO 2009/114335, WO 2009/154335, WO 2010/027828, WO 2010/027423, WO 2010/029434, WO 2010/029435, WO 2010/036959, WO 2010/063011, WO 2010/089411, WO 2011/066342, WO 2011/110604, WO 2011/110621, WO 2012/145493, WO 2013/014668, WO 2014/179664, і WO 2015/112900.

Біспецифічні Fc-діатіла, що мають імунореактивність до PD1 і LAG3 для застосування в лікуванні злоякісного новоутворення або захворювання, пов'язаного з патогеном, таким як бактерія, грибок або вірус, описані в WO 2015/200119. Однак існує потреба в створенні нових біспецифічних антитіл, які не тільки одночасно зв'язуються з PD1 і LAG3 і, таким чином, вибірково націлюються на клітини, які експресують як PD1, так і LAG3, але також виключають блокування LAG3 на інших клітинах, враховуючи широкий патерн експресії LAG3. Біспецифічні антитіла за цим винаходом не тільки ефективно блокують PD1 і LAG3 на Т-клітинах з надекспресією як PD1, так і LAG3, вони дуже селективні щодо цих клітин і, таким чином, можна уникнути побічних ефектів при введенні високоактивних антитіл до LAG3.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Цей винахід відноситься до біспецифічних антитіл, що містять щонайменше один антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з білком запрограмованої смерті клітини 1 (PD1), і щонайменше один другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з геном активації лімфоцитів-3 (LAG3). Ці біспецифічні антитіла мають перевагу, оскільки вони забезпечують кращу селективність і, можливо, ефективність, ніж стратегії комбінування анти-PD1 і анти-LAG3. Крім того, вони характеризуються тим, що демонструють зменшений ефект поглинання (як показано за допомогою зменшеної інтерналізації Т-клітин), вони переважно зв'язуються як з типовими Т-клітинами, так і з Трег, і здатні відновлювати ефекторні функції Т-клітин за рахунок Трег пригнічення, вони демонструють підвищену специфічну по відношенню до пухлинну активність ефекторних Т-клітин і посилення ерадикації пухлини *in vivo*.

В одному аспекті винахід забезпечує біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з білком запрограмованої смерті клітини 1 (PD1), і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з геном активації лімфоцитів-3 (LAG3), при цьому зазначений перший антигензв'язуючий домен, специфічно зв'язується з PD1, містить:

домен VH, що містить:

- (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1,
- (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і
- (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; і

домен VL, що містить:

- (i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4;
- (ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, і
- (iii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6.

Зокрема, запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з білком запрограмованої смерті клітини 1 (PD1), і другий

антигензв'язуючих домен, який специфічно зв'язується з геном активації лімфоцитів-3 (LAG3), при цьому біспецифічне антитіло містить Fc-домен, який являє собою Fc-домен IgG, зокрема Fc-домен IgG1 або IgG4, і при цьому Fc-домен містить одну або більше амінокислотних замін, які зменшують зв'язування з Fc-рецептором, зокрема, з Fcγ-рецептором.

5 В одному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, містить:

(a) домен VH, що містить:

- 10 (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14,
 (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15, і
 (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16; і
 домен VL, що містить:

- 15 (i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17,
 (ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18, і
 (iii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19; або

(b) домен VH, що містить:

- 20 (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22,
 (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 23, і
 (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24; і
 домен VL, що містить:

- (i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25,
 (ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26, і
 (iii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27; або

25 (c) домен VH, що містить:

- (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30,
 (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31, і
 (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 32; і
 домен VL, що містить:

- 30 (i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33,
 (ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34, і
 (iii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35; або

(d) домен VH, що містить:

- 35 (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38,
 (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 39, і
 (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40; і
 домен VL, що містить:

- (i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41,
 (ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42, і
 40 (iii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 43; або

(e) домен VH, що містить:

- (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 46,
 (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 47, і
 (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48; і
 45 домен VL, що містить:

- (i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49,
 (ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50, і
 (iii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51.

50 В іншому аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, містить:

(a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8, або

55 (b) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, або

(c) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11, або

60 (d) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 12, або

послідовність SEQ ID NO: 57.

У додатковому аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі раніше, при цьому біспецифічне антитіло являє собою гуманізоване або химерне антитіло. Зокрема, біспецифічне антитіло являє собою гуманізоване антитіло.

У конкретному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, при цьому біспецифічне антитіло містить Fc-домен підкласу людського IgG1 з амінокислотними мутаціями L234A, L235A і P329G (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

Крім того, запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі раніше, при цьому біспецифічне антитіло містить Fc-домен, що містить модифікацію, яка сприяє асоціації першої та другої субодиниць Fc-домону. В одному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, в якому перша субодиниця Fc-домону містить виступи, а друга субодиниця Fc-домону містить отвори відповідно до способу "виступи-в-отвори". Зокрема, перша субодиниця Fc-домону містить амінокислотні заміни S354C і T366W (нумерація EU), а друга субодиниця Fc-домону містить амінокислотні заміни Y349C, T366S і Y407V (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

У додатковому аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому біспецифічне антитіло містить Fc-домен, перший Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3.

В одному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому в одному з Fab-фрагментів варіабельні домени VL і VH замінені один на одного, так що домен VH є частиною легкого ланцюга, а домен VL є частиною важкого ланцюга. Зокрема, запропоновано біспецифічне антитіло, в якому в першому Fab-фрагменті, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, варіабельні домени VL і VH замінені один на одного.

В іншому аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому біспецифічне антитіло містить Fab-фрагмент, де в константному домені CL амінокислоту в положенні 124 незалежно заміщують лізином (K), аргініном (R) або гістидином (H) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом), а в константному домені CH1 амінокислоти в положеннях 147 і 213 незалежно заміщують глутаміновою кислотою (E) або аспарагіновою кислотою (D) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом). Зокрема, запропоновано біспецифічне антитіло, в якому в другому Fab-фрагменті, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, в константному домені CL, амінокислоту в положенні 124 незалежно заміщують лізином (K), аргініном (R) або гістидином (H) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом), а в константному домені CH1 амінокислоти в положеннях 147 і 213 незалежно заміщують глутаміновою кислотою (E) або аспарагіновою кислотою (D) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

У конкретному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, що містить

(а) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 96, перший легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 98,

другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 97, і другий легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 99, або

(б) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 96, перший легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 98,

другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 100, і другий легкий ланцюг, що містить

ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 117, два перші легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 115, і два других легкі ланцюги, що містять амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 105.

У ще одному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому біспецифічне антитіло містить Fc-домен, два Fab-фрагменти, кожен з яких містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, і одноланцюговий Fab (scFab), що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1. Зокрема, scFab, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, злитий через пептидний лінкер з С-кінцем одного з важких ланцюгів.

У конкретному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, що містить:

(а) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 123, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 119, і два легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 101, або

(b) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 124, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 121, і два легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 99, або

(c) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 125, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 103, і другий легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 105.

У ще одному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому біспецифічне антитіло містить Fc-домен, два фрагмента Fab, кожен з яких містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, і домен VH і VL, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1. В одному аспекті домен VH антигензв'язуючого домену, який специфічно зв'язується з PD1, злитий через пептидний лінкер з С-кінцем одного з важких ланцюгів, а домен VL антигензв'язуючого домену, який специфічно зв'язується з PD1, злитий через пептидний лінкер з С-кінцем іншого важкого ланцюга. У конкретному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 126, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 127, і два легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 109.

Згідно з іншим аспектом винаходу запропоновано полінуклеотид, що кодує біспецифічне антитіло, як описано в цьому документі раніше. У винаході додатково запропоновано вектор, зокрема вектор експресії, що містить полінуклеотид за винаходом і прокаріотичну або еукаріотичну клітину-хазяїна, яка містить полінуклеотид або вектор за винаходом. У деяких варіантах здійснення клітина-хазяїн являє собою еукаріотичну клітину, зокрема клітину ссавця.

В іншому аспекті запропоновано спосіб отримання біспецифічного антитіла, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, який включає етапи а) трансформації клітини-хазяїна векторами, що містять полінуклеотиди, які кодують зазначене біспецифічне антитіло, b) культивування клітини-хазяїна в умовах, що підходять для експресії біспецифічного антитіла, і c) виділення біспецифічного антитіла з культури. Винахід також охоплює біспецифічне антитіло, що отримали способом за винаходом.

Винахід, крім того, забезпечує фармацевтичну композицію, яка містить біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, і щонайменше один фармацевтично прийнятний наповнювач.

Винахід також охоплює біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен,

який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, або фармацевтичну композицію, яка містить біспецифічне антитіло, для застосування в якості лікарського засобу.

В іншому аспекті винахід забезпечує біспецифічне антитіло, що містить біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, або фармацевтичну композицію, яка містить біспецифічне антитіло, для застосування

- i) при модуляції імунних відповідей, таких як відновлення активності Т-клітин,
- ii) при стимуляції Т-клітинної відповіді,
- iii) при лікуванні інфекцій,
- iv) при лікуванні онкологічного захворювання,
- v) для затримки прогресування онкологічного захворювання,
- vi) в продовженні життя пацієнта, що страждає на онкологічне захворювання.

В одному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, або фармацевтичну композицію, яка містить біспецифічне антитіло, для застосування в лікуванні захворювання у людини, який цього потребує. У конкретному аспекті винахід забезпечує біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, або фармацевтичну композицію, що містить біспецифічне антитіло, для застосування при лікуванні онкологічного захворювання. У додатковому конкретному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, або фармацевтична композиція, що містить біспецифічне антитіло, для застосування в модуляції імунних відповідей. В іншому аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, або фармацевтичну композицію, що містить біспецифічне антитіло, для застосування при лікуванні хронічної вірусної інфекції.

Винахід також забезпечує специфічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, або фармацевтичну композицію, що містить біспецифічне антитіло, для застосування в профілактиці або лікуванні онкологічного захворювання, при цьому біспецифічне антитіло вводять у комбінації з хіміотерапевтичним агентом, опроміненням та/або іншими агентами для застосування в імунотерапії онкологічного захворювання. У конкретному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, або фармацевтична композиція, що містить біспецифічне антитіло, для застосування в профілактиці або лікуванні онкологічного захворювання, при цьому біспецифічне антитіло вводять у комбінації з анти-CEA/анти-CD3 біспецифічним антитілом.

Також запропоновано застосування біспецифічного антитіла, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, для виготовлення лікарського засобу для лікування захворювань у індивідуума, який цього потребує, зокрема, для виробництва лікарського засобу при лікуванні онкологічного захворювання, а також способу лікування захворювання у індивідуума, що включає введення зазначеному індивідууму терапевтично ефективної кількості композиції, що містить біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, у фармацевтично прийнятній формі. У певному аспекті захворювання являє собою онкологічне захворювання. В іншому конкретному аспекті захворювання являє собою хронічну вірусну інфекцію. В іншому аспекті запропоновано спосіб модуляції імунних відповідей у індивідуума, що включає введення зазначеному індивідууму терапевтично ефективної кількості композиції, що містить біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, у фармацевтично прийнятній формі. У будь-якому з вищевказаних аспектів індивідуумом переважно є ссавець, зокрема людина.

Винахід також забезпечує специфічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий

домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, або фармацевтичну композицію, що містить біспецифічне антитіло, для застосування в профілактиці або лікуванні онкологічного захворювання, при цьому біспецифічне антитіло вводять у комбінації з хіміотерапевтичним агентом, опроміненням та/або іншими агентами для застосування в імунотерапії онкологічного захворювання.

Крім того, запропоновано спосіб інгібування росту пухлинних клітин у індивідуума, що включає введення індивідууму ефективної кількості біспецифічного антитіла, яке містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, щоб пригнічувати ріст пухлинних клітин. Індивідуум переважно являє собою ссавця, зокрема людину.

СТИСЛИЙ ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

Фіг. 1: Схематичне зображення різних форматів біспецифічних антитіл анти-PD1/анти-LAG3, описаних у цьому документі. На Фіг. 1A зображений біспецифічний формат 1+1, в якому PD1-зв'язуючий домен містить кросоверний Fab (crossFab) (із обміном доменів VH/VL), а LAG3-зв'язуючий домен містить домени CH1 і CK з амінокислотними мутаціями для підтримки відповідного спарювання ("заряджені варіанти"). Fc-частина містить мутації "виступ-в-отвір" (показана чорною стрілкою) і амінокислотні мутації L234A, L235A і P329G, які майже повністю перешкоджають зв'язуванню з Fc γ -рецептором людського Fc-домену IgG1 (показано білою областю). На Фіг. 1B продемонстровано формат 2+1 з двома анти-LAG3-зв'язуючими Fab-доменами, що містять мутації в CH1/CK, і PD1-зв'язуючим Fab-доменом, злитим на C-кінці одного важкого ланцюга. На Фіг. 1C продемонстровано аналогічний формат 2+1 з двома анти-LAG3-зв'язуючими Fab-доменами, що містять мутації в CH1/CK, але PD1-зв'язуючий одноклановий scFab-домен злитий на C-кінці одного важкого ланцюга. На Фіг. 1D продемонстровано формат 2+1 з двома Fab-доменами, що зв'язують анти-LAG3, і VH і VL, що зв'язують PD1, кожен з яких злитий з одним із C-кінців важких ланцюгів. На Фіг. 1E продемонстровано конструкт, подібний до наведеного на Фіг. 1D, однак зі сконструйованим дисульфідним зв'язком між VH і VL, а на Фіг. 1F продемонстровано варіант з сайтом фурину. На Фіг. 1G продемонстровано біспецифічний формат 2+2 з двома анти-LAG3-зв'язуючими Fab-доменами, що містять мутації в CH1/CK, і двома PD1-зв'язуючими кросоверними Fab-доменами, злитим на C-кінці кожного важкого ланцюга. На Фіг. 1H продемонстровано біспецифічний формат 1+1 (що називається "транс"), в якому PD1-зв'язуючий домен містить кросоверний Fab (із обміном доменів VH/VL), а LAG3-зв'язуючий домен злитий з його доменом VH на C-кінці ланцюга з Fc-отвором. Домен Lag3 містить домени CH1 і CK з амінокислотними мутаціями для підтримки відповідного спарювання ("заряджені варіанти"). На Фіг. 1I продемонстровано формат транс 2+1, в якому PD1-зв'язуючий домен містить кросоверний Fab (із обміном доменів VH/VL) і один LAG3-зв'язуючий домен, що містить домени CH1 і CK з мутаціями амінокислот для підтримки відповідного спарювання ("заряджені варіанти"), і другий LAG3-зв'язуючий домен злитий з його VH-доменом на C-кінці ланцюга з Fc-отвором.

Фіг. 2: Вплив антитіл aLAG-3 на цитотоксичне вивільнення гранзиму B і секрецію ІЛ-2 CD4 T-клітинами людини, спільно культивованими з алогенними зрілими дендритними клітинами. На Фіг. 2A продемонстровано вплив антитіл aLAG3, як описано в цьому документі, на секрецію гранзиму B, а на Фіг. 2B продемонстровано вплив антитіл aLAG3 на секрецію ІЛ-2.

Фіг. 3: Вплив антитіл aLAG3 у комбінації з антитілом aPD1 (0376) на вивільнення цитотоксичного гранзиму B CD4 T-клітинами людини, спільно культивованими з лімфобластною B-клітинною лінією (ARH77). Показано порівняння різних антитіл aLAG3 у комбінації з антитілом aPD1 (0376) і одним тільки антитілом aPD1 (0376).

Фіг. 4: Вплив антитіл aLAG3 у комбінації з антитілом aPD1 (0376) на Трег пригнічення вивільнення гранзиму B і ІФН- γ CD4 T-клітинами людини, спільно культивованими з опроміненими алогенними МКПК. На Фіг. 4A продемонстровано вивільнення гранзиму B у порівнянні з одним лише aPD1 (0376), а на Фіг. 4B продемонстровано вивільнення ІФН- γ у порівнянні з одним тільки aPD1 (0376).

Фіг. 5: Одночасне зв'язування і димеризація рецептора, викликані зв'язуванням біспецифічних анти-PD1/анти-LAG3 антитіл з рекомбінантними PD1⁺Lag3⁺ клітинами. На графіку показана хемілюмінесценція (виміряна в ОВ) в залежності від концентрації антитіла. На Фіг. 5A і Фіг. 5B продемонстровано порівняння біспецифічних анти-PD1/анти-LAG3 антитіл і моноспецифічних анти-LAG3 антитіл. Тільки біспецифічні формати були здатні індукувати хемілюмінесценцію. Конкурентний експеримент продемонстровано на Фіг. 5C. Якщо одне і теж біспецифічне антитіло вносили в присутності або антитіла aLAG3 (0156, MDX25F7), або анти-

PD1 антитіла (0376), сигнал був або майже інгібований (для конкуренції PD1), або щонайменше значно знижений (LAG3). Додатковий конкурентний експеримент продемонстровано на Фіг. 5D. Конкуренція біспецифічного анти-PD1/анти-LAG3 антитіла з тим самим анти-PD1 антитілом (0376), а також рекомбінантним білком LAG3: Fc (0160) практично усувала сигнал, в той час як

5 присутність тієї ж зв'язуючої речовини aLAG3 (0156) призводила тільки до часткового пригнічення, і при цьому два додаткових анти-LAG3 антитіла 0414 і 0416 істотно не модулювали сигнал.

Фіг. 6: Порівняння одночасного зв'язування біспецифічних анти-PD1/анти-LAG3 антитіл в різних форматах (1+1 у порівнянні з 2+1) і з різними зв'язуючими речовинами aLAG3. На Фіг. 6A продемонстрована крива зв'язування для конструкту 0799 (анти-PD1 (0376)/анти-LAG3 (0416) у форматі 1+1). Крива зв'язування для конструкту 8311 (анти-PD1 (0376)/анти-LAG3 (0416) у форматі 1+2) продемонстрована на Фіг. 6B. На Фіг. 6C продемонстрована крива зв'язування для конструкту 0927 (анти-PD1 (0376)/анти-LAG3 (0414) у форматі 1+1). Крива зв'язування для конструкту 8310 (анти-PD1 (0376)/анти-LAG3 (0414) у форматі 1+2) продемонстрована на Фіг.

10 6D.

Фіг. 7: Порівняння одночасного зв'язування біспецифічних анти-PD1/анти-LAG3 антитіл в різних форматах (2+1 у порівнянні з 2+2) і з різними зв'язуючими речовинами aLAG3. На Фіг. 7A продемонстрована крива зв'язування для конструкту 8310 (анти-PD1 (0376)/анти-LAG3 (0414) у форматі 1+2). Крива зв'язування для конструкту 8970 (анти-PD1 (0376)/анти-LAG3 (0414) у форматі 2+2) продемонстрована на Фіг. 7B. На Фіг. 7C продемонстрована крива зв'язування для конструкту 8311 (анти-PD1 (0376)/анти-LAG3 (0416) у форматі 1+2). Крива зв'язування для конструкту 8984 (анти-PD1 (0376)/анти-LAG3 (0416) у форматі 2+2) продемонстрована на Фіг. 7D. Криві зв'язування для конструктів 0725 (анти-PD1 (0376)/анти-LAG3 (0414) у форматі транс 1+1) і 0750 (анти-PD1 (0376) / анти-LAG3 (0414) у форматі транс 1+2) продемонстровані на Фіг.

20 7E порівняно з кривою зв'язування конструкту 0927 (анти-PD1(0376)/анти-LAG3(0414) у форматі 1+1). Ці 3 конструкти також порівнювали в комерційному комбінованому аналізі за геном-репортером PD1/LAG3, і відповідні криві зв'язування продемонстровані на Фіг. 7F.

Фіг. 8: Інтерналізація біспецифічних анти-PD1/анти-LAG3 антитіл у різних форматах і вихідного анти-LAG3 антитіла через 3 години після додавання до введення активованих Т-клітин, які вводяться, як виміряно за допомогою проточної цитометрії. На Фіг. 8A продемонстрована репрезентативна гістограма експерименту, відсоток інтерналізації для різних форматів наведених на Фіг. 8B.

30

Фіг. 9: Аналіз в часі демонструє більш високу локалізацію на мембрані формату 1+1 біспецифічного анти-PD1/анти-LAG3 антитіла (0927) у порівнянні з іншими форматами, які проявляють більш високу ступінь інтерналізації. На Фіг. 9A продемонстровані флуоресцентні зображення, виконані за допомогою конфокальної мікроскопії через 15 хвилин, 1 годину і 3 години. Активовані CD4 клітини зображені у вигляді чорних кіл. Флуоресцентні зображення для антитіла до TIM3 показані в якості прикладу сильної інтерналізації. Кількісний аналіз зображень продемонстровано на Фіг. 9B.

35

Фіг. 10: Зв'язування з типовими Т-клітинами в порівнянні з Трег. На Фіг. 10A-10C продемонстровані дані від одного репрезентативного донора, що демонструють зв'язування з типовими Т-клітинами (чорна крива) і Трег (сіра область). Зв'язування анти-LAG3 антитіла 0414 (hu IgG1 PGLALA) продемонстровано на Фіг. 10A, на Фіг. 10B і 10C продемонстровано зв'язування анти-PD1 антитіла 0376 і біспецифічного анти-PD1/анти-LAG3 антитіла (0927), відповідно. На Фіг. 10D продемонстрована дельта геометричної середньої інтенсивності флуоресценції цієї молекули, пов'язаної з типовими Т-клітинами, у порівнянні з Трег у тому ж зразку. Результати (медіана) взяті з 3 незалежних експериментів з 3 різними донорами.

40 45

Фіг. 11: Спільне блокування PD1 і Трег зберігає ефекторні функції ттип (типових Т-клітин) від Трег пригнічення. Продemonстровано відсоток Трег пригнічення гранзиму В, що секретується Ттип після 5 діб спільного культивування. Результати (медіана) взяті з 10 незалежних експериментів з 10 різними донорами. Р-значення розраховували з використанням двофакторного дисперсійного аналізу.

50

Фіг. 12: Вплив блокування PD-1 і LAG-3 на секрецію гранзиму В і ІФН- γ CD4 Т-клітинами з МКПК пацієнтів з меланою після вторинної імунної відповіді за допомогою імуногенних пептидних пулів меланома-антиген. На Фіг. 12 продемонстровано порівняння впливу на вивільнення гранзиму В і ІФН- γ , що викликане одним анти-PD1 (0376), комбінацією анти-PD1 (0376) з aLAG3 (0414) і біспецифічним антитілом 0927 (анти-PD1 (0376)/анти-LAG3 (0414)) у форматі 1+1). Продemonстровано кратне збільшення продукції гранзиму В і ІФН- γ у порівнянні зі стимульованим пептидним пулом CD4 Т-клітин від МКПК 12 пацієнтів з меланою.

55 60

Фіг. 13: Вплив біспецифічних антитіл aPD1/aLAG3 на цитотоксичне вивільнення гранзиму В

людськими CD4 Т-клітинами, спільно культивованими з лімфобластною В-клітинною лінією (ARH77). Різні біспецифічні анти-PD1/анти-LAG3 антитіла, як описано в цьому документі, порівнюють з антитілами, що використовуються в стандартах надання медичної допомоги або клінічних випробуваннях.

Фіг. 14: Дослідження ефективності у гуманізованих мишей, які заражені аденокарциномою підшлункової залози, ВхРС3. У комбінації з SEACAM CD3 TCB тільки біспецифічне антитіло aPD1/aLAG3 забезпечувало статистично значущий захист від пухлин у порівнянні з типовими антитілами до PD1. Зображені криві росту пухлини у гуманізованих мишей, яким підшкірно вводили клітини ВхРС3 і яких лікували зазначеними молекулами у комбінації з SEACAM5-TCB.

Фіг. 15: Вимірювання об'єм пухлин ($\text{мм}^3 \pm \text{СПС}$ (стандартна похибка середнього значення)) протягом 47 діб показані для кожної окремої тварини, що демонструє однорідність групової протипухлинної відповіді. Криві росту пухлини продемонстровані для групи носія на Фіг. 15A, для одного SEACAM5 CD3 TCB (2,5 мг/кг) на Фіг. 15B, для комбінації SEACAM5 CD3 TCB з ніволумабом (1,5 мг/кг) на Фіг. 15C, для комбінації SEACAM5 CD3 TCB з пембролізумабом (1,5 мг/кг) на Фіг. 15D, для комбінації SEACAM5 CD3 TCB з PD1/LAG3 0927 на Фіг. 15E (1,5 мг/кг) і на Фіг. 15F (3 мг/кг біспецифічного антитіла).

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС СУТІ ВИНАХОДУ

Визначення

Якщо не вказано інше, технічні та наукові терміни, що використовуються в цьому документі, мають те ж значення, що і в цілому використовується в галузі техніки, до якої відноситься цей винахід. Для цілей інтерпретації цього опису будуть застосовуватися наступні визначення, і за необхідності терміни, що використовуються в однині, будуть також включати множину і навпаки.

Використовуваний у цьому документі термін "антигензв'язуюча молекула" відноситься в найширшому сенсі до молекули, яка специфічно зв'язує антигенну детермінанту. Прикладами антигензв'язуючих молекул є антитіла, фрагменти антитіл і каркасні антигензв'язуючі білки.

Термін "антитіло" в цьому документі використовується в самому широкому сенсі і охоплює різні структури антитіл, включаючи, але не обмежуючись ними, моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, моноспецифічні і мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) і фрагменти антитіл, за умови, що вони демонструють бажану антигензв'язуючих активність.

Використовуваний в цьому документі термін "моноклональне антитіло" відноситься до антитіла, отриманого з популяції по суті однорідних антитіл, тобто окремі антитіла, що входять до складу популяції, є ідентичними та/або зв'язують один і той самий епітоп, за винятком можливих варіантів антитіл, наприклад, що містять мутації, що зустрічаються в природі або виникають під час отримання препарату моноклонального антитіла, такі варіанти зазвичай присутні в невеликих кількостях. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, що зазвичай включають різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло препарату моноклональних антитіл направлено проти однієї детермінанти на антигені.

Термін "моноспецифічне" антитіло в контексті цього опису означає антитіло, яке має один або більше сайтів зв'язування, кожен з яких зв'язується з одним і тим самим епітопом одного і того ж антигена. Термін "біспецифічне" означає, що антитіло здатне специфічно зв'язуватися щонайменше з двома різними антигенними детермінантами, наприклад, з двома сайтами зв'язування, кожен з яких утворений парою варіабельного домену важкого ланцюга антитіла (VH) і варіабельного домену легкого ланцюга антитіла (VL), зв'язуються з різними антигенами або з різними епітопами на одному і тому ж антигені. Таке біспецифічне антитіло має формат 1+1. Інші формати біспецифічних антитіл мають формати 2+1 (включаючи два сайти зв'язування для першого антигена або епітопа і один сайт зв'язування для другого антигена або епітопа) або формати 2+2 (містять два сайти зв'язування для першого антигена або епітопа і два сайти зв'язування для другого антигена або епітопа). Як правило, біспецифічне антитіло містить два антигензв'язуючих сайти, кожен з яких специфічний для певної антигенної детермінанти.

Термін "валентний", що використовується в цій заявці, означає наявність певного числа зв'язуючих доменів в антигензв'язуючій молекулі. Як такі, терміни "двовалентний", "чотиривалентний" і "шестивалентний" означають наявність у антигензв'язуючій молекулі, двох зв'язуючих доменів, чотирьох зв'язуючих доменів і шести зв'язуючих доменів, відповідно. Біспецифічні антитіла відповідно до винаходу є щонайменше "двовалентними" і можуть бути "тривалентними" або "мультивалентними" (наприклад, "чотиривалентними" або "шестивалентними"). У конкретному аспекті антитіла згідно з винаходом мають два або більше сайтів зв'язування і є біспецифічними. Тобто антитіла можуть бути біспецифічними навіть в тих варіантах, коли є більше двох сайтів зв'язування (тобто антитіло є тривалентним або

мультивалентним).

Терміни "повнорозмірне антитіло", "інтактне антитіло" і "повне антитіло" використовуються в цьому документі як взаємозамінні для позначення антитіла, що має структуру, по суті подібну зі структурою нативного антитіла. "Нативні антитіла" відносяться до молекул, що зустрічаються імуноглобуліну, які мають різні структури. Наприклад, нативні антитіла IgG являють собою гетеротетрамерні глікопротеїни з молекулярною масою близько 150000 дальтон, що складаються з двох ідентичних легких ланцюгів і двох ідентичних важких ланцюгів, з'єднаних дисульфідними зв'язками. У напрямку від N- до C-кінця кожний важкий ланцюг має варіабельну область (VH), також звану варіабельним важким доменом або варіабельним доменом важкого ланцюга, за яким ідуть три константних домени (CH1, CH2 і CH3), також звані константною областю важкого ланцюга. Аналогічно, від N- до C-кінця кожний легкий ланцюг має варіабельну область (VL), також звану варіабельним легким доменом або варіабельним доменом легкого ланцюга, за яким іде константний домен легкого ланцюга (CL), також званий константною областю легкого ланцюга. Важкий ланцюг антитіла може бути віднесений до одного з п'яти типів, званих α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) або μ (IgM), деякі з яких можуть бути додатково розділені на підтипи, наприклад $\gamma 1$ (IgG1), $\gamma 2$ (IgG2), $\gamma 3$ (IgG3), $\gamma 4$ (IgG4), $\alpha 1$ (IgA1) і $\alpha 2$ (IgA2). Легкий ланцюг антитіла може бути віднесений до одного з двох типів, званих каппа (κ) і лямбда (λ), на основі амінокислотної послідовності його константного домену.

"Фрагмент антитіла" відноситься до молекули, відмінної від інтактного антитіла, яка містить частину інтактного антитіла, яка зв'язує антиген, з яким зв'язується інтактне антитіло. Приклади фрагментів антитіл включають, але не обмежуються ними, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; діатіла, тріатіла, тетратіла, фрагменти crossFab; лінійні антитіла; молекули одноланцюгових антитіл (наприклад, scFv); мультиспецифічні антитіла, утворені з фрагментів антитіл і односторонніх антитіл. Для огляду деяких фрагментів антитіл див. Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003). Для огляду фрагментів scFv див., наприклад, Pluckthün, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); див. також WO 93/16185; і патенти США № № 5571894 та 5587458. Для обговорення фрагментів Fab та F(ab')₂, що містять залишки епітопа, який зв'язує рецептор реутилізації, і мають збільшений період напіввиведення in vivo, див. патент США № 5869046. Діатіла представляють собою фрагменти антитіл з двома антигензв'язуючими доменами, що можуть бути двовалентними або біспецифічними, див., наприклад, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003); і Hollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993). Тріатіла та тетратіла також описані в публікації Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003). Односторонні антитіла являють собою фрагменти антитіл, що містять весь або частину варіабельного домену важкого ланцюга або весь або частину варіабельного домену легкого ланцюга антитіла. У деяких варіантах здійснення одностороннє антитіло являє собою людське одностороннє антитіло (Domantis, Inc., Уолтем, Массачусетс; див., наприклад., патент США № 6248516 B1). Крім того, фрагменти антитіл містять одноланцюгові поліпептиди, що мають характеристики домену VH, а саме, здатність збиратися разом з доменом VL, або домену VL, а саме, здатність збиратися разом з доменом VH у функціональний антигензв'язуючий сайт і тим самим забезпечуючи антигензв'язуючу властивість повнорозмірних антитіл. Фрагменти антитіл можуть бути отримані різними способами, включаючи, але не обмежуючись цим, протеолітичне розщеплення інтактного антитіла, а також продукцію рекомбінантними клітинами-хазяями (наприклад, E. coli чи фагом), як описано в цьому документі.

Розщеплення інтактних антитіл папаїном дає два ідентичних антигензв'язуючих фрагмента, званих "Fab-фрагментами", кожен з яких містить варіабельні домени важкого і легкого ланцюгів, а також константний домен легкого ланцюга і перший константний домен (CH1) важкого ланцюга. Використовуваний в цьому документі термін "Fab-фрагмент" відноситься до фрагменту антитіла, що містить фрагмент легкого ланцюга, що містить домен VL і константний домен легкого ланцюга (CL), а також домен VH і перший константний домен (CH1) важкого ланцюга. Fab'-фрагменти відрізняються від Fab-фрагментів додаванням кількох залишків на карбоксильному кінці CH1 домену важкого ланцюга, включаючи один або більше цистеїнів з шарнірної області антитіла. Fab'-SH являють собою Fab'-фрагменти, в яких залишок (залишки) цистеїну константних доменів мають вільну тиольну групу. Обробка пепсином дає F(ab')₂-фрагмент, який має два антигензв'язуючих сайти (два Fab-фрагменти) і частину Fc-області.

Термін "cross-Fab фрагмент" або "xFab фрагмент" або "кросоверний Fab-фрагмент" відноситься до Fab-фрагмента, в якому відбувається обмін варіабельних областей, або константних областей важкого і легкого ланцюга. Можливі дві різні композиції ланцюгів кросоверної молекули Fab, які включені в біспецифічні антитіла відповідно до винаходу: З одного боку, варіабельні області важкого і легкого ланцюга Fab обмінюються, тобто кросоверна

молекула Fab містить пептидний ланцюг, що складається з варіабельної області легкого ланцюга (VL) і константної області важкого ланцюга (CH1), і пептидний ланцюг, що складається з варіабельної області важкого ланцюга (VH) і константної області легкого ланцюга (CL). Ця кросоверна молекула Fab також називається CrossFab_(VLVH). З іншого боку, коли константні області важкого і легкого ланцюга Fab обмінюються, кросоверна молекула Fab містить пептидний ланцюг, що складається з варіабельної області важкого ланцюга (VH) і константної області легкого ланцюга (CL), і пептидний ланцюг, що складається з варіабельної області легкого ланцюга (VL) і константної області важкого ланцюга (CH1). Ця кросоверна молекула Fab також називається CrossFab_(CLCH1).

"Одноланцюговий Fab-фрагмент" або "scFab" являє собою поліпептид, що складається з варіабельного домену важкого ланцюга антитіла (VH), константного домену антитіла 1 (CH1), варіабельного домену легкого ланцюга антитіла (VL), константного домену легкого ланцюга антитіла (CL) і лінкера, при цьому зазначені домени антитіла і вказаний лінкер мають один з наступних порядків в напрямку від N-кінця до C-кінця: а) VH-CH1-лінкер-VL-CL, б) VL-CL-лінкер-VH-CH1, с) VH-CL-лінкер-VL-CH1 або d) VL-CH1-лінкер-VH-CL; і при цьому зазначений лінкер являє собою поліпептид щонайменше з 30 амінокислот, переважно від 32 до 50 амінокислот. Зазначені одноланцюгові Fab-фрагменти стабілізуються за допомогою природнього дисульфідного зв'язку між доменом CL і доменом CH1. Крім того, ці одноланцюгові молекули Fab можуть бути додатково стабілізовані шляхом генерації міжланцюгових дисульфідних зв'язків за допомогою вставки залишків цистеїну (наприклад, положення 44 у варіабельній області важкого ланцюга і положення 100 у варіабельній області легкого ланцюга згідно з нумерацією за Кабатом).

"Кросоверний одноланцюговий Fab-фрагмент" або "x-scFab" являє собою поліпептид, що складається з варіабельного домену важкого ланцюга антитіла (VH), константного домену антитіла 1 (CH1), варіабельного домену легкого ланцюга антитіла (VL), константного домену легкого ланцюга антитіла (CL) і лінкера, при цьому зазначені домени антитіла і вказаний лінкер мають один з наступних порядків в напрямку від N-кінця до C-кінця: а) VH-CL-лінкер-VL-CH1 і б) VL-CH1-лінкер-VH-CL; при цьому VH і VL утворюють разом антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з антигеном, і при цьому вказаний лінкер являє собою поліпептид, що містить щонайменше 30 амінокислот. Крім того, ці молекули x-scFab можуть бути додатково стабілізовані шляхом генерації міжланцюгових дисульфідних зв'язків за допомогою вставки залишків цистеїну (наприклад, положення 44 у варіабельній області важкого ланцюга і положення 100 у варіабельній області легкого ланцюга згідно з нумерацією за Кабатом).

"Одноланцюговий варіабельний фрагмент (scFv)" являє собою злитий білок, що складається з варіабельних областей важкого (V_H) і легкого ланцюгів (V_L) антитіла, з'єднаних з коротким лінкерним пептидом, що містить від 10 до приблизно 25 амінокислот. Лінкер зазвичай багатий гліцином для гнучкості, а також серином або треоніном для розчинності і може або з'єднувати N-кінець V_H з C-кінцем V_L, або навпаки. Цей білок зберігає специфічність вихідного антитіла, незважаючи на видалення константних областей і введення лінкера. scFv-антитіла, наприклад, описані в Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96). Крім того, фрагменти антитіла містять одноланцюгові поліпептиди, що мають характеристики домену VH, а саме, здатність збиратися разом з доменом VL, або домену VL, а саме, здатність збиратися разом з доменом VH у функціональний антигензв'язуючий сайт і тим самим забезпечуючи антигензв'язуючу властивість повнорозмірних антитіл.

"Каркасні антигензв'язуючі білки" відомі в цій галузі техніки, наприклад, фібрoneктин і сконструйовані білки з анкіриновим повтором (DARPin) були використані в якості альтернативних каркасів для антигензв'язуючих доменів, див., наприклад, Gebauer and Skerra, *Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics.* *Curr Opin Chem Biol* 13:245-255 (2009) і Stumpp et al., *Darpins: A new generation of protein therapeutics.* *Drug Discovery Today* 13:695-701 (2008). В одному аспекті винаходу каркасний антигензв'язуючий білок вибирають з групи, що складається з CTLA-4 (Evibody), ліпокалінів (антикалін), молекули, отриманої з білка A, такої як Z-домен білка A (афітіло), A-домену (Avimer/Maxibody), сироваткового трансферину (транс-тіло); сконструйованого білка з анкіриновим повтором (DARPin), варіабельного домену легкого ланцюга або важкого ланцюга антитіла (однодоменне антитіло, одАт), варіабельного домену важкого ланцюга антитіла (нанотіло, aVH), фрагментів V_{NAR}, фібрoneктину (AdNectin), домена лектину С-типу (тетранектин); варіабельного домену нового рецептора антигену бета-лактамази (фрагменти V_{NAR}), людського гамма-кристаліну або убіквітину (молекули афіліна); домену Кунітц-типу інгібіторів протеази людини, мікротіла, такого як білки з сімейства кноттинів, пептидні аптамери та фібрoneктин (аднектин). CTLA-4 (білок 4, асоційований з цитотоксичними Т-лімфоцитами) являє собою рецептор сімейства CD28, що експресується в основному на CD4

+ Т-клітинах. Його позаклітинний домен має конформацію, подібну до варіабельного домена Ig. Петлі, відповідні до CDR антитіл, можуть бути заміщені гетерологічною послідовністю для додання різних властивостей зв'язування. Молекули CTLA-4, сконструйовані так, щоб мати різну специфічність зв'язування, також відомі як Evibody (наприклад, US7166697B1). Evibody мають приблизно той самий розмір, що і виділена варіабельна область антитіла (наприклад, доменного антитіла). Для отримання додаткової інформації див. *Journal of Immunological Methods* 248 (1-2), 31-45 (2001). Ліпокаліни являють собою сімейство позаклітинних білків, які транспортують невеликі гідрофобні молекули, такі як стероїди, біліни, ретиноїди і ліпіди. Вони мають жорстку вторинну структуру типу бета-складчастості з декількома петлями на відкритому кінці конічної структури, які можуть бути сконструйовані для зв'язування з різними цільовими антигенами. Антикаліни мають розмір від 160 до 180 амінокислот і є похідними ліпокалінів. Для отримання додаткової інформації див. *Biochim Biophys Acta* 1482: 337-350 (2000), US7250297B1 і US20070224633. Афтіло являє собою каркас, отриманий з білка A *Staphylococcus aureus*, який може бути сконструйований для зв'язування з антигеном. Домен складається з триспирального пучка з приблизно 58 амінокислот. Бібліотеки були отримані шляхом рандомізації поверхневих залишків. Для отримання додаткової інформації див. *Protein Eng. Des. Sel.* 2004, 17, 455-462 і EP 1641818A1. Авімери являють собою мультидоменні білки, отримані з сімейства А-доменного каркаса. Нативні домени розміром приблизно 35 амінокислот набувають певної структури, що зв'язана дисульфідними зв'язками. Різноманітність отримують шляхом перегрупування природних варіацій, які проявляються сімейством А-доменів. Для отримання додаткової інформації див. *Nature Biotechnology* 23 (12), 1556 - 1561 (2005) і *Expert Opinion on Investigational Drugs* 16 (6), 909-917 (June 2007). Трансферин являє собою мономерний сироватковий транспортний глікопротеїн. Трансферини можуть бути сконструйовані для зв'язування різних цільових антигенів шляхом введення пептидних послідовностей в пермісивну поверхневу петлю. Приклади сконструйованих трансферинових каркасів включають транс-тіло. Для отримання додаткової інформації див. *J. Biol. Chem* 274, 24066-24073 (1999). Сконструйовані білки з анкіриновим повтором (DARPin) отримані з анкірина, що відноситься до сімейства білків, які забезпечують прикріплення інтегральних мембранних білків до цитоскелету. Один анкіриновий повтор являє собою мотив з 33 залишків, що складається з двох альфа-спіралей і бета-вигину. Вони можуть бути сконструйовані так, щоб зв'язувати різні цільові антигени шляхом рандомізації залишків в першій альфа-спіралі і бета-вигину кожного повтору. Їхня поверхня зв'язування може бути збільшена шляхом збільшення кількості модулів (спосіб дозрівання афінності). Для отримання додаткової інформації див. *J. Mol. Biol.* 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) і *J. Mol. Biol.* 369, 1015-1028 (2007) і US20040132028A1.

Однодоменне антитіло являє собою фрагмент антитіла, що складається з одного мономерного варіабельного домену антитіла. Перші одиничні домени були отримані з варіабельного домену важкого ланцюга антитіла з верблюдів (нанотіла або фрагменти V_HH). Крім того, термін "однодоменне антитіло" включає автономний варіабельний домен важкого ланцюга людини (aVH) або фрагменти V_{NAR}, отримані з акул. Фібронектин являє собою каркас, який може бути сконструйований для зв'язування з антигеном. Аднектини складаються з основного ланцюга природної амінокислотної послідовності 10-го домену з 15 повторюваних ланок людського фібронектина типу III (FN3). Три петлі на одному кінці бета-сендвіча можуть бути сконструйовані так, щоб дозволити аднектину специфічно розпізнавати терапевтичну мішень, що представляє інтерес. Для отримання додаткової інформації див. *Protein Eng. Des. Sel.* 18, 435-444 (2005), US20080139791, WO2005056764 і US6818418B1. Пептидні аптамери являють собою комбінаторні молекули розпізнавання, що складаються з константного каркасного білка, зазвичай тіоредоксина (TrxA), який містить обмежену варіабельну пептидну петлю, вставлену в активний сайт. Для отримання додаткової інформації див. *Expert Opin. Biol. Ther.* 5, 783-797 (2005). Мікротіла отримані з мікропротеїнів, що зустрічаються в природі, довжиною 25-50 амінокислот, які містять 3-4 цистеїнові містки. Приклади мікропротеїнів включають KalataBI, конотоксин і кноттини. Мікропротеїни мають петлю, що може включати до 25 амінокислот, не зачіпаючи загальну складчастість мікропротеїну. Для отримання додаткової інформації про сконструйовані домени ноттини див. WO2008098796.

"Антигензв'язуюча молекула, що зв'язується з тим самим епітопом", що і еталонна молекула, відноситься до антигензв'язуючої молекули, яка блокує зв'язування еталонної молекули з її антигеном у конкурентному аналізі на 50 % або більше, і навпаки, еталонна молекула блокує зв'язування антигензв'язуючої молекули до її антигена в конкурентному аналізі на 50 % або більше.

Використовуваний в цьому документі термін "антигензв'язуючий домен" або "антигензв'язуючий сайт" відноситься до частини антигензв'язуючої молекули, яка специфічно

зв'язується з антигенною детермінантою. Більш конкретно, термін "антигензв'язуючий домен" відноситься до частини антитіла, що містить область, яка специфічно зв'язується з частиною або повним антигеном і є комплементарною їм. Коли антиген великий, антигензв'язуюча молекула може зв'язуватися тільки з певною частиною антигена, ця частина називається епітопом. Антигензв'язуючий домен може бути забезпечений, наприклад, одним або більше варіабельними доменами (також званими варіабельними областями). Переважно антигензв'язуючий домен містить варіабельну область легкого ланцюга антитіла (VL) і варіабельну область важкого ланцюга антитіла (VH). В одному аспекті антигензв'язуючий домен здатен зв'язуватися зі своїм антигеном і блокувати або частково блокувати його функцію. Антигензв'язуючі домени, що специфічно зв'язуються з PD1 або з LAG3, включають антитіла і їхні фрагменти, як додатково визначено в цьому документі. Крім того, антигензв'язуючі домени можуть включати каркасні антигензв'язуючі білки, наприклад такі, що зв'язують домени, які засновані на сконструйованих повторюваних білках або сконструйованих повторюваних доменах (див., наприклад, WO 2002/020565).

Використовуваний в цьому документі термін "антигенна детермінанта" являє собою синонімом "антиген" і "епітоп" і відноситься до сайту (наприклад, безперервної ділянки амінокислот або конформаційної конфігурації, що складається з різних областей несуміжних амінокислот) на макромолекулі поліпептиду, з яким зв'язується антигензв'язуючий фрагмент, утворюючи комплекс антигензв'язуючий фрагмент-антиген. Придатні антигенні детермінанти можуть бути виявлені, наприклад, на поверхнях пухлинних клітин, на поверхнях інфікованих вірусом клітин, на поверхнях інших уражених клітин, на поверхні імунних клітин, в сироватці крові у вільному вигляді, і/або в позаклітинному матриксі (ECM). Білки, що використовуються в якості антигенів в цьому винаході, можуть являти собою будь-яку нативну форму білків з будь-якого джерела, яке відноситься до хребетних, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, люди) і гризуни (наприклад, миші та щури), якщо не вказано інше. У конкретному варіанті здійснення антиген являє собою людський білок. Коли в цьому документі робиться посилання на конкретний білок, цей термін охоплює "повнорозмірний", непроцесований білок, а також будь-яку форму білка, яка є результатом процесингу в клітині. Термін також охоплює варіанти білка, що зустрічаються в природі, наприклад, сплайсингові варіанти або алельні варіанти.

Під "специфічним зв'язуванням" мається на увазі, що зв'язування є селективним для антигена і може бути відокремлене від небажаних або неспецифічних взаємодій. Здатність антигензв'язуючої молекули зв'язуватися зі специфічним антигеном може бути виміряна або за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА), або за допомогою інших способів, відомих фахівцям в цій галузі техніки, наприклад, за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (ППР) (аналіз на приладі BIAcore) (Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)) і стандартних аналізів зв'язування (Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)). В одному варіанті здійснення ступінь зв'язування антигензв'язуючої молекули з неспорідненим білком становить менш ніж близько 10 % від зв'язування антигензв'язуючої молекули з антигеном, як виміряно, наприклад, за допомогою ППР. У деяких варіантах здійснення молекула, що зв'язується з антигеном, має константу дисоціації (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ або $\leq 0,001$ нМ (наприклад, 10^{-7} М або менше, наприклад, від 10^{-7} М до 10^{-13} М, наприклад, від 10^{-9} М до 10^{-13} М).

"Афінність" або "афінність зв'язування" відноситься до сили загальної суми нековалентних взаємодій між одним сайтом зв'язування молекули (наприклад, антитілом) і його партнером по зв'язуванню (наприклад, антигеном). Якщо не вказано інше, як використовується в цьому документі, "афінність зв'язування" відноситься до внутрішньої афінності зв'язування, яка відображає взаємодію 1: 1 між членами пари зв'язування (наприклад, антитілом і антигеном). Афінність молекули X до її партнера Y зазвичай може бути представлена константою дисоціації (K_d), яка є відношенням констант швидкості дисоціації і асоціації (k_{off} і k_{on} , відповідно). Таким чином, еквівалентні афінності можуть включати різні константи швидкості, за умови, що співвідношення констант швидкості залишається незмінним. Афінність може бути виміряна загальноприйнятими способами, відовими в цій галузі техніки, у тому числі описаними в цьому документі. Конкретним способом вимірювання афінності є поверхневий плазмонний резонанс (ППР).

Використовуваний в цьому документі термін "висока афінність" антитіла відноситься до антитіла, що має для цільового антигена K_d 10^{-9} М або менше, а ще більш конкретно, 10^{-10} М або менше. Термін "низька афінність" антитіла відноситься до антитіла, що має K_d 10^{-8} або вище.

Антитіло з "дозрілою афінністю" відноситься до антитіла з однією або більше змінами в одній або більше гіперваріабельних ділянках (HVR) порівняно з вихідним антитілом, яке не містить таких змін, такі зміни, призводять до підвищення афінності антитіла до антигена.

Терміни "біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3", "біспецифічне антитіло, яке специфічно зв'язується з PD1 і LAG3", "біспецифічна антигензв'язуюча молекула, специфічна для PD1, і LAG3 "або" анти-PD1/анти-LAG3 антитіло" використовуються в цьому документі як взаємозамінні і відносяться до біспецифічного антитіла, яке здатне пов'язувати PD1 і LAG3 з достатньою афінністю, так що антитіло може використовуватися в якості діагностичного та/або терапевтичного агента при націлюванні на PD1 і LAG3.

Термін "PD1", також відомий як білок запрограмованої загибелі клітин 1, являє собою мембранний білок типу I з 288 амінокислот, який був вперше описаний в 1992 році (Ishida et al., EMBO J., 11 (1992), 3887-3895). PD-1 є членом розширеного сімейства регуляторів Т-клітин CD28/CTLA-4 і має два ліганда, PD-L1 (B7-H1, CD274) і PD-L2 (B7-DC, CD273). Структура білка включає позаклітинний домен IgV, за яким іде трансмембранна область і внутрішньоклітинний хвіст. Внутрішньоклітинний хвіст містить два сайти фосфорилування, розташованих в імунорецепторному тирозиновому інгібуєчому мотиві і імунорецепторному тирозиновому перемикаючому мотиві, що свідчить про те, що PD-1 негативно регулює сигнали ТКР. Це узгоджується зі зв'язуванням фосфатаз SHP-1 і SHP-2 з цитоплазматичним хвостом PD-1 при зв'язуванні ліганда. Хоча PD-1 не експресується на наївних Т-клітинах, його експресія підвищується після активації, опосередкованої Т-клітинним рецептором (ТКР), і він спостерігається як на активованих, так і на виснажених Т-клітинах (Agata et al., Int. Immunology 8 (1996), 765-772). Ці виснажені Т-клітини мають дисфункціональний фенотип і нездатні відповісти відповідним чином. Хоча PD-1 має відносно широкий патерн експресії, його найбільш важлива роль, ймовірно, полягає в тому, що він є коінгібіруючим рецептором Т-клітин (Chinai et al., Trends in Pharmacological Sciences 36 (2015), 587-595). Таким чином, сучасні терапевтичні підходи спрямовані на блокування взаємодії PD-1 з його лігандами для посилення Т-клітинної відповіді. Терміни "запрограмована загибель клітин 1", "запрограмована смерть клітин 1", "білок PD1", "PD-1", "PD1", "PDCD1", "hPD-1" і "hPD-I" можуть використовуватися як взаємозамінні і включають варіанти, ізоформи, видові гомологи людського PD-1 і аналоги, які мають щонайменше один загальний епітоп з PD-1. Амінокислотна послідовність людського PD1 наведена в UniProt (www.uniprot.org), номер доступу Q15116 (SEQ ID NO: 128).

Терміни "анти-PD1 антитіло" і "антитіло, що містить антигензв'язуючий домен, який зв'язується з PD1" відносяться до антитіла, яке здатне зв'язувати PD1, особливо поліпептид PD1, що експресується на поверхні клітини, з достатньою афінністю, так що антитіло може використовуватися в якості діагностичного і/або терапевтичного агента при націлюванні на PD1. В одному аспекті ступінь зв'язування анти-PD1 антитіла з неспоріднених білком, які не є PD1, становить менш ніж близько 10 % від зв'язування антитіла з PD1, як виміряно, наприклад, за допомогою радіоімуноаналіза (RIA) або проточної цитометрії, що включає флюоресцентно-активоване сортування клітин (FACS), або за допомогою аналізу методом поверхневого плазмонного резонансу з використанням біосенсорної системи, такої як система Biacore®. У конкретних аспектах антигензв'язуючий білок, який зв'язується з людським PD1, має значення K_D афінності зв'язування для зв'язування з людським PD1 ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ або $\leq 0,001$ нМ (наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад, від 10^{-8} М до 10^{-13} М, наприклад, від 10^{-9} М до 10^{-13} М). В одному кращому варіанті здійснення відповідне значення K_D афінності зв'язування визначають в аналізі методом поверхневого плазмонного резонансу з використанням позаклітинного домену (ECD) людського PD1 (PD1-ECD) для афінності зв'язування PD1. Термін "анти-PD1 антитіло" також охоплює біспецифічні антитіла, які здатні зв'язувати PD1 і другий антиген.

Терміни "LAG3" або "Lag-3" або "ген активації лімфоцитів 3" або "CD223", використовувані в цьому документі, відносяться до будь-якого нативного LAG3 з будь-якого джерела, що відноситься до хребетних, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, люди) і гризуни (наприклад, миші та щури), якщо не вказано інше. Термін охоплює "повнорозмірний" непроцесований LAG3, а також будь-яку форму LAG3, отриману в результаті процесингу в клітині. Термін охоплює також варіанти LAG3, які зустрічаються в природі, наприклад, сплайсингові варіанти або алельні варіанти. В одному кращому варіанті здійснення термін "LAG3" відноситься до людського LAG3. Амінокислотна послідовність типового процесованого (без сигнальних послідовностей) LAG3 наведена в SEQ ID NO: 73. Амінокислотна послідовність типового позаклітинного домену (ECD) LAG3 наведена в SEQ ID NO: 74.

Терміни "анти-LAG3 антитіло" і "антитіло, що зв'язується з LAG3" відносяться до антитіла, яке здатне зв'язувати LAG3 з достатньою афінністю, так що антитіло може використовуватися в якості діагностичного та/або терапевтичного агента при націлюванні на LAG3. В одному аспекті

ступінь зв'язування анти-LAG3 антитіла з неспоріднених білком, який не є LAG3, становить менш ніж близько 10 % від зв'язування антитіла з LAG3, як виміряно, наприклад, за допомогою радіоімунаналіза (RIA). У деяких варіантах здійснення антитіла, яке зв'язується з LAG3, має константу дисоціації (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ або $\leq 0,001$ нМ (наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад, від 10^{-8} М до 10^{-13} М, наприклад, від 10^{-9} М до 10^{-13} М). У певних аспектах анти-LAG3 антитіло зв'язується з епітопом LAG3, який є консервативним серед LAG3 від різних видів. В одному кращому варіанті здійснення "анти-LAG3 антитіло", "антитіло, що специфічно зв'язується з LAG3 людини" і "антитіло, яке зв'язується з LAG3 людини" відноситься до антитіла, що специфічно зв'язується з антигеном LAG3 людини або його позаклітинним доменом (ECD) з афінністю зв'язування зі значенням K_D $1,0 \times 10^{-8}$ моль/л або нижче, в одному варіанті здійснення із значенням K_D $1,0 \times 10^{-9}$ моль/л або нижче, в одному варіанті здійснення із значенням K_D від $1,0 \times 10^{-9}$ моль/л до $1,0 \times 10^{-13}$ моль/л. У цьому контексті афінність зв'язування визначають за допомогою стандартного аналізу зв'язування, такого як метод поверхневого плазмонного резонансу (BIAcore®, GE-Healthcare Уппсала, Швеція), наприклад, з використанням позаклітинного домену LAG3. Термін "анти-LAG3 антитіло" також охоплює біспецифічні антитіла, які здатні зв'язувати LAG3 і другий антиген.

"Блокуюче" антитіло або "антагоністичне" антитіло являє собою антитіло, що пригнічує або знижує біологічну активність антигена, який воно зв'язує. У деяких варіантах блокуючі антитіла або антагоністичні антитіла по суті або повністю пригнічують біологічну активність антигена. Наприклад, біспецифічні антитіла відповідно до винаходу блокують сигналінг через PD-1 і LAG3, щоб відновити функціональну відповідь Т-клітин (наприклад, проліферацію, продукцію цитокінів, знищення цільових клітин) з дисфункціонального стану на стимуляцію антигеном.

Термін "варіабельна область" або "варіабельний домен" відноситься до домену важкого або легкого ланцюга антитіла, який приймає участь у зв'язуванні антигензв'язуючих молекули з антигеном. Варіабельні домени важкого ланцюга і легкого ланцюга (VH і VL, відповідно) нативного антитіла зазвичай мають подібні структури, при цьому кожен домен містить чотири консервативні каркасні області (FR) і три гіперваріабельні області (HVR). Див., наприклад, Kindt et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007). Одного домену VH або VL може бути достатньо для надання антигензв'язуючої специфічності.

Використовуваний в цьому документі термін "гіперваріабельна область" або "HVR" відноситься до кожної з областей варіабельного домену антитіла, які є гіперваріабельні за послідовністю та/або утворюють структурно певні петлі ("гіперваріабельні петлі"). Як правило нативні чотириланцюгові антитіла містять шість HVR; три в VH (H1, H2, H3) і три в VL (L1, L2, L3). HVR зазвичай містять амінокислотні залишки з гіперваріабельних петель та/або з "областей, що визначають комплементарність" (CDR), при цьому останні мають найвищу варіабельність послідовності і/або беруть участь у розпізнаванні антигена. Типові гіперваріабельні петлі розташовуються у амінокислотних залишків 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), і 96-101 (H3). (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987).) Типові CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2, і CDR-H3) розташовуються у амінокислотних залишків 24-34 L1, 50-56 L2, 89-97 L3, 31-35B H1, 50-65 H2 і 95-102 H3. (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).) Гіперваріабельні області (HVR) також називають областями, що визначають комплементарність (CDR) і ці терміни використовуються в цьому документі як взаємозамінні щодо частин варіабельної області, які утворюють антигензв'язуючі області. Ця конкретна область була описана Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) і Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), при цьому визначення включають амінокислотні залишки, що перекриваються, або підмножини амінокислотних залишків при порівнянні один з одним. Проте, передбачається, що застосування будь-якого визначення для посилення на CDR антитіла або його варіантів знаходиться в межах обсягу терміна, визначеного і використаного в цьому документі. Відповідні амінокислотні залишки, які охоплюють CDR, як визначено в кожному з наведених вище посилань, наведені нижче в Таблиці А як порівняння. Точні числа залишків, які охоплюють конкретні CDR, будуть варіюватися в залежності від послідовності і розміру CDR. Фахівці в цій галузі техніки можуть зазвичай визначати, які залишки складають конкретну CDR, враховуючи амінокислотну послідовність варіабельної області антитіла.

Таблиця А

Визначення CDR¹

CDR	Кабат	Чотіа	AbM ²
CDR1 V _H	31-35	26-32	26-35
CDR2 V _H	50-65	52-58	50-58
CDR3 V _H	95-102	95-102	95-102
CDR1 V _L	24-34	26-32	24-34
CDR2 V _L	50-56	50-52	50-56
CDR3 V _L	89-97	91-96	89-97

¹ Нумерація всіх визначень CDR в Таблиці А відповідає системам нумерацій, викладеним Kabat et al. (див. нижче).

² "AbM" з малої літери "b", як використовується в Таблиці А, відноситься до CDR, як визначено за допомогою програмного забезпечення для моделювання антитіл "AbM" від Oxford Molecular.

Kabat et al. також склали систему нумерації послідовностей варіабельної області, яка може бути застосована до будь-якого антитіла. Фахівець у цій галузі техніки може однозначно використати цю систему "нумерації за Кабатом" для будь-якої послідовності варіабельної області, не покладаючись на будь-які експериментальні дані, крім самої послідовності. Використовуваний в цьому документі термін "нумерація за Кабатом" відноситься до системи нумерації, встановленої Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Якщо не вказано інше, посилання на нумерацію конкретних положень амінокислотних залишків у варіабельній області антитіла відповідають системі нумерації за Кабатом.

За винятком CDR1 в V_H, CDR зазвичай містять амінокислотні залишки, які утворюють гіперваріабельні петлі. CDR також містять "визначаючі специфічність залишки" або "SDR", які являють собою залишки, які зв'язуються з антигеном. SDR містяться в областях CDR, званих вкороченими CDR, або a-CDR. Типові a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 і a-CDR-H3) розташовуються із амінокислотними залишками 31-34 L1, 50-55 L2, 89-96 L3, 31-35B H1, 50-58 H2 і 95-102 H3. (Див. Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008).) Якщо не вказано інше, залишки HVR і інші залишки у варіабельному домені (наприклад, залишки FR) пронумеровані в цьому документі згідно Kabat et al.

"Каркасна область" або "FR" відноситься до залишків варіабельного домену, що відрізняються від залишків гіперваріабельної області (HVR). FR варіабельного домену зазвичай складається з чотирьох доменів FR: FR1, FR2, FR3 і FR4. Відповідно, послідовності HVR і FR, як правило, розташовуються в наступному порядку в V_H (або V_L): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

"Акцепторна людська каркасна область" для цілей цього винаходу являє собою каркасну область, що містить амінокислотну послідовність каркасної області варіабельного домену легкого ланцюга (VL) або каркасної області варіабельного домену важкого ланцюга (VH), отриману з каркасної області імуноглобуліну людини або людської консенсусної каркасної області, як визначено нижче. Акцепторна людська каркасна область, "отримана з" каркасної області імуноглобуліну людини або людського консенсусна каркасна область, може містити таку ж амінокислотну послідовність або може містити зміни амінокислотної послідовності. У деяких варіантах здійснення число заміни амінокислот становить 10 або менше, 9 або менше, 8 або менше, 7 або менше, 6 або менше, 5 або менше, 4 або менше, 3 або менше або 2 або менше. У деяких варіантах здійснення послідовність акцепторної людської каркасної області VL ідентична з послідовністю каркасної області VL людського імуноглобуліну або людської консенсусної каркасної області.

Термін "химерне" антитіло відноситься до антитіла, в якому частина важкого і/або легкого ланцюга отримана з конкретного джерела або виду, в той час як залишок важкого і/або легкого ланцюга отримано з іншого джерела або виду.

"Клас" антитіла відноситься до типу константного домену або константної області, що належить його важкому ланцюгові. Існує п'ять основних класів антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG, і IgM, і деякі з них можуть бути далі розділені на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, і IgA₂. Константні домени важкого ланцюга, які відповідають різним класам імуноглобулінів,

називаються α , δ , ϵ , γ , і μ , відповідно.

"Гуманізоване" антитіло відноситься до химерних антитіл, що містить амінокислотні залишки з нелюдських HVR і амінокислотні залишки з людських FR. У деяких варіантах здійснення гуманізоване антитіло буде містити по суті все з щонайменше одного і, як правило, двох варіабельних доменів, в яких всі або по суті всі HVR (наприклад, CDR) відповідають таким з антитіл нелюдського походження, і всі або по суті всі FR відповідають таким з людського антитіла. Гуманізоване антитіло необов'язково може містити щонайменше частину константної області антитіла, отриманої з людського антитіла. "Гуманізована форма" антитіла, наприклад нелюдського антитіла, відноситься до антитіла, яке піддали гуманізації. Іншими формами "гуманізованих антитіл", які охоплюються цим винаходом, є ті, в яких константна область була додатково модифікована або змінена в порівнянні з формою вихідного антитіла для створення властивостей відповідно до винаходу, особливо щодо зв'язування C1q і/або зв'язування Fc-рецептора (FcR).

"Людське" антитіло являє собою антитіло, що має амінокислотну послідовність, яка відповідає послідовності антитіла, що продукується організмом людини або клітиною людини, або отриманого з джерела, відмінного від людини, яке використовує репертуари антитіл людини або інші послідовності, що кодують антитіла людини. Таке визначення людського антитіла явно виключає гуманізоване антитіло, що містить нелюдські антигензв'язуючі залишки.

Використовуваний в цьому документі термін "моноклональне антитіло" відноситься до антитіла, отриманого з популяції по суті однорідних антитіл, тобто окремі антитіла, що входять до складу популяції, є ідентичними та/або зв'язують один і той самий епітоп, за винятком можливих варіантів антитіл, наприклад, що містять мутації, що зустрічаються в природі або виникають під час отримання препарату моноклонального антитіла, такі варіанти зазвичай присутні в невеликих кількостях. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, що зазвичай включають різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло препарату моноклональних антитіл направлено проти однієї детермінанти на антигені. Таким чином, визначення "моноклональний" вказує на характеристику антитіла, яке отримане по суті з однорідної популяції антитіл, і не повинно бути витлумачено як необхідність отримання антитіла яким-небудь конкретним способом. Наприклад, моноклональні антитіла для використання відповідно до цього винаходу можна отримати за допомогою різних способів, включаючи, без обмежень, метод гібридоми, методи рекомбінантних ДНК, методи фагового дисплея і способи з використанням трансгенних тварин, що повністю або частково містять локуси людського імуноглобуліну, при цьому такі способи і інші типові способи отримання моноклональних антитіл описані в цьому документі.

Термін "Fc-домен" або "Fc-область" в цьому описі використовується для визначення C-кінцевої області важкого ланцюга антитіла, що містить щонайменше частину константної області. Термін включає нативні послідовності Fc-області і варіанти Fc-областей. Зокрема, Fc-область важкого ланцюга людського IgG знаходиться в межах від Cys226 або від Pro230 до карбоксильного кінця важкого ланцюга. Однак, Fc-область може містити або не містити C-кінцевий лізин (Lys447). Амінокислотні послідовності важких ланцюгів завжди представлені C-кінцевим лізином, проте варіанти без C-кінцевого лізину включені до винаходу.

Fc-область IgG містить домен CH2 IgG і домен CH3 IgG. "Домен CH2" Fc-області людського IgG зазвичай знаходиться в межах від амінокислотного залишку в положенні близько 231 до амінокислотного залишку в положенні близько 340. В одному варіанті здійснення вуглеводний ланцюг з'єднано з доменом CH2. У цьому документі домен CH2 може являти собою домен CH2 з нативної послідовністю або варіант домену CH2. "Домен CH3" містить ділянку із залишками C-кінця до домену CH2 в Fc-області (тобто від амінокислотного залишку приблизно в положенні 341 до амінокислотного залишку приблизно в положенні 447 IgG). Область CH3 в цьому документі може являти собою домен CH3 з нативної послідовністю або варіант домену CH3 (наприклад, домен CH3 з введеним "випинанням" ("виступом") в одному його ланцюзі і відповідною введеною "порожниною" ("отвором") в іншому його ланцюзі; див. патент США № 5821333, який включений в цей документ за допомогою посилання). Такі варіанти доменів CH3 можуть бути використані для прискорення гетеродімеризації двох неідентичних важких ланцюгів антитіл, як описано в цьому документі. Якщо не вказано інше, нумерація амінокислотних залишків в Fc-області або константної області здійснюється відповідно до системи нумерації EU, також званої індексом EU, як описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

Технологія "виступ-в-отвір" описана, наприклад, в US 5731168; US 7695936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) і Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Зазвичай спосіб включає введення випинання ("виступу") на поверхні зв'язування першого поліпептиду і відповідної

порожнини ("отвора") на поверхні взаємодії другого поліпептиду, так що випинання може бути розташоване в порожнині так, що сприяє утворенню гетеродимера і перешкоджає утворенню гомодимеру. Випинання конструюють шляхом заміни невеликих бічних ланцюгів амінокислот з поверхні зв'язування першого поліпептиду більшими бічними ланцюгами (наприклад, тирозином або триптофаном). Компенсаторні порожнини ідентичного або схожого розміру з випинаннями створюються на поверхні взаємодії другого поліпептиду шляхом заміни великих бічних ланцюгів амінокислот дрібнішими (наприклад, аланіном або треоніном). Випинання і порожнина можуть бути отримані шляхом зміни нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептиди, наприклад, за допомогою сайт-специфічного мутагенезу або пептидного синтезу. У конкретному варіанті здійснення модифікація виступу включає амінокислотну заміну T366W в одній з двох субодиниць Fc-домену, а модифікація отвору включає амінокислотні заміни T366S, L368A і Y407V в іншій з двох субодиниць Fc-домену. У ще одному конкретному варіанті здійснення субодиниця Fc-домену, що містить модифікацію виступу, додатково містить амінокислотну заміну S354C, а субодиниця Fc-домену, що містить модифікацію отвору, додатково містить амінокислотну заміну Y349C. Введення цих двох залишків цистеїну призводить до утворення дисульфідного містка між двома субодиницями Fc-області, таким чином, додатково стабілізуючи димер (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)).

Передбачається, що "область, яка еквівалентна Fc-області імуноглобуліну" включає алельні варіанти Fc-області імуноглобуліну, що зустрічаються в природі, а також варіанти, які мають зміни, які викликають заміни, додавання або делеції, але які суттєво не знижують здатність імуноглобуліну опосередковувати ефекторні функції (наприклад, антитілозалежну клітинну цитотоксичність). Наприклад, одна або більше амінокислот можуть бути видалені з N-кінця або C-кінця Fc-області імуноглобуліну без істотної втрати біологічної функції. Такі варіанти можуть бути обрані відповідно до загальних правил, відомих у цій галузі техніки, таким чином, щоб надавати мінімальний вплив на активність (див., наприклад, Bowie, J. U. et al., Science 247:1306-10 (1990)).

Термін "ефекторні функції" відноситься до тих біологічних активностей, пов'язаних з Fc-областю антитіла, які змінюються в залежності від ізотипу антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіл включають: зв'язування C1q і компліментзалежну цитотоксичність (K3Ц); зв'язування з Fc-рецептором; антитілозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (A3KЦ); антитілозалежний клітинний фагоцитоз (A3КФ); секрецію цитокінів, опосередковане імунним комплексом поглинання антигену антигенпрезентуючими клітинами, зниження експресії клітинних поверхневих рецепторів (наприклад, B-клітинного рецептора) і B-клітинну активацію.

"Активуючий Fc-рецептор" являє собою Fc-рецептор, який після захоплення Fc-областю антитіла викликає сигнальні події, які стимулюють несучу рецептор клітку для виконання ефекторних функцій. Активуючі Fc-рецептори включають FcγRIIIa (CD16a), FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), і FcαRI (CD89). Конкретним активуючим Fc-рецептором є людський FcγRIIIa (див. UniProt, номер доступу № P08637, версія 141).

Термін "пептидний лінкер" відноситься до пептиду, який містить одну або більше амінокислот, зазвичай близько 2-20 амінокислот. Пептидні лінкери відомі в цій галузі техніки або описані в цьому документі. Відповідними неімуногенними лінкерними пептидами є, наприклад, пептидні лінкери ((G₄S)_n, (SG₄)_n або G₄ (SG₄)_n, де "n" зазвичай являє собою число від 1 до 10, як правило, від 2 до 4, зокрема, 2, тобто пептиди, вибрані з групи, що складається з GGGGS (SEQ ID NO: 129) GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 130), SGGGSGGGG (SEQ ID NO: 131) і GGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 132), але також включають послідовності GSPGSSSSGS (SEQ ID NO: 133), (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 134), (G₄S)₄ (SEQ ID NO: 135), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 136), GSGSGNGS (SEQ ID NO: 137), GSGSGSGS (SEQ ID NO: 138), GGSGSG (SEQ ID NO: 139), GGSG (SEQ ID NO: 140), GGSGNGSG (SEQ ID NO: 141), GGNGSGSG (SEQ ID NO: 142) і GGNGSG (SEQ ID NO: 143). Пептидними лінкерами, що представляють особливий інтерес є (G₄S) (SEQ ID NO: 129), (G₄S)₂ або GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 130), (G₄S)₃ (SEQ ID NO: 134) і (G₄S)₄ (SEQ ID NO: 135), зокрема, (G₄S)₂ або GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 130).

Термін "злитий з" або "зв'язаний з" означає, що компоненти (наприклад, антигензв'язуючих домен і Fc-домен) зв'язані пептидними зв'язками або безпосередньо, або через один або більше пептидних лінкерів.

Термін "амінокислота", що використовується в цій заявці, позначає групу карбокси-α-амінокислот, які зустрічаються в природі, що містять аланін (трилітерний код: ala, однолітерний код: A), аргінін (arg, R), аспарагін (asn, N), аспарагінову кислоту (asp, D), цистеїн (cys, C), глутамін (gln, Q), глутамінову кислоту (glu, E), гліцин (gly, G), гістидин (his, H), ізолейцин (ile, I), лейцин (leu, L), лізин (lys, K), метіонін (met, M), фенілаланін (phe, F), пролін (pro, P), серин (ser, S), треонін (thr, T), триптофан (trp, W), тирозин (tyr, Y), і валін (val, V).

"Відсоток (%) ідентичності амінокислотної послідовності" щодо послідовності еталонного поліпептиду (білка) визначається як відсоткова частка амінокислотних залишків в кандидатній послідовності, які ідентичні амінокислотним залишкам в послідовності еталонного поліпептиду після вирівнювання послідовності і внесення, у разі потреби, гепів для досягнення максимальної процентної ідентичності послідовностей, але без урахування будь-яких консервативних заміни як частини ідентичності послідовностей. Вирівнювання в цілях визначення відсотка ідентичності амінокислотних послідовностей може здійснюватися різними способами, які відомі фахівцям в цій галузі техніки, наприклад, з використанням загальнодоступного комп'ютерного програмного забезпечення, такого як BLAST, BLAST-2, ALIGN. SAWI або програмного забезпечення Megalign (DNASTAR). Фахівці в цій галузі техніки можуть визначити відповідні параметри для вирівнювання послідовностей, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання по всій довжині порівнюваних послідовностей. Однак для цілей цього винаходу значення % ідентичності амінокислотних послідовностей генеруються з використанням комп'ютерної програми порівняння послідовностей ALIGN-2. Комп'ютерна програма для порівняння послідовностей ALIGN-2 розроблена компанією Genentech Inc., і вихідний код було подано разом з документацією користувача в Бюро реєстрації авторських прав США, Вашингтон, округ Колумбія, 20559, де вона зареєстрована під № реєстрації авторського права США TXU510087. Програма ALIGN-2 знаходиться у вільному доступі в Genentech, Inc., Південний Сан-Франциско, штат Каліфорнія, або її можна скопіювати з вихідного коду. Для застосування в операційній системі UNIX, що включає цифрову версію UNIX V4.0D, програму ALIGN-2 слід скопіювати. Усі параметри порівняння послідовностей встановлюються програмою ALIGN-2 і залишаються незмінними. У тих випадках, коли для порівняння амінокислотних послідовностей використовується ALIGN-2, % ідентичності амінокислотної послідовності цієї амінокислотної послідовності А до, з, або по відношенню до цієї амінокислотної послідовності В (що в альтернативному варіанті може бути сформульоване як ця амінокислотна послідовність А, яка має або містить певний % ідентичності амінокислотної послідовності до, з або по відношенню до цієї амінокислотної послідовності В) розраховують наступним чином:

100 помножити на співвідношення X/Y,

де X являє собою число амінокислотних залишків, які оцінювались програмою вирівнювання послідовностей ALIGN-2 як ідентичні співпаданню при програмному вирівнюванні А і В, і де Y являє собою загальну кількість амінокислотних залишків в В. Слід розуміти, що якщо довжина амінокислотної послідовності А не дорівнює довжині амінокислотної послідовності В, % ідентичності амінокислотних послідовностей А до В не дорівнює % ідентичності амінокислотних послідовностей В до А. Якщо спеціально не вказано інше, всі значення % ідентичності амінокислотної послідовності, які використовується в цьому документі, отримують, як описано в попередньому абзаці з використанням комп'ютерної програми ALIGN-2.

У певних аспектах розглядаються варіанти амінокислотних послідовностей біспецифічних антитіл згідно винаходу, представлених у цьому документі. Наприклад, може бути бажано покращити афінність зв'язування і/або інші біологічні властивості біспецифічних антитіл. Варіанти амінокислотних послідовностей біспецифічних антитіл можуть бути отримані шляхом введення відповідних модифікацій в нуклеотидну послідовність, що кодує молекули, або шляхом пептидного синтезу. Такі модифікації включають, наприклад, делеції, та/або вставки, та/або заміни залишків в амінокислотних послідовностях антитіла. Будь-яка комбінація делеції, вставки і заміни може бути зроблена для досягнення кінцевого конструкту, за умови, що кінцевий конструкт має бажані характеристики, наприклад, зв'язування антигену. Сайти для мутагенезу з замінами, що представляють інтерес включають HVR і каркасні області (FR). Консервативні заміни представлені в Таблиці В під заголовком "Кращі заміни" і додатково описані нижче з посиланням на класи амінокислотних бічних ланцюгів (1) - (6). Амінокислотні заміни можна вводити в молекулу, що представляє інтерес, і проводити скринінг отриманих продуктів щодо необхідної активності, наприклад, збереженого/покращеного зв'язування антигена, зниженої імуногенності або покращеної АЗКЦ або КЗЦ.

Таблиця В

Вихідний залишок	Типові заміни	Кращі заміни
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln

Таблиця В

Вихідний залишок	Типові заміни	Кращі заміни
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; норлейцин	Leu

Амінокислоти можуть бути згруповані у відповідності до загальних властивостей бічного ланцюга:

- (1) гідрофобні: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислотні: Asp, Glu;
- (4) основні: His, Lys, Arg;
- (5) залишки, що впливають на орієнтацію ланцюгів: Gly, Pro;
- (6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміни включають заміщення представника одного з цих класів іншим класом.

Термін "варіанти амінокислотної послідовності" включає істотні варіанти, в яких є амінокислотні заміни в одному або більше залишках гіперваріабельної області вихідної антигензв'язуючої молекули (наприклад, гуманізованого або людського антитіла). Як правило, отриманий варіант (и), обраний (і) для подальшого вивчення, матиме (уть) модифікації (наприклад, покращення) певних біологічних властивостей (наприклад, підвищену афінність, знижену імуногенність) в порівнянні з вихідним антитілом, і/або буде мати по суті збережені певні біологічні властивості вихідної антигензв'язуючої молекули. Типовий варіант заміни являє собою антитіло з дозрілої афінністю, яке може бути легко отримано, наприклад, із застосуванням методів дозрівання на основі фагового дисплея, таких як ті, що описані в цьому документі. Якщо коротко, один або більше залишків HVR піддають мутації, і варіанти антигензв'язуючих молекул відображаються на фагові та піддають скринінгу на предмет певної біологічної активності (наприклад, афінності зв'язування). У деяких варіантах здійснення заміни, вставки або делеції можуть відбуватися в одній або більше HVR, за умови, що такі зміни суттєво не знижують здатність антигензв'язуючих молекул зв'язувати антиген. Наприклад, у HVR можна робити консервативні заміни (наприклад, консервативні заміни, запропоновані в цьому документі), які суттєво не знижують афінність зв'язування. Корисний метод ідентифікації залишків або областей антитіла, які можуть бути мішенями для мутагенезу, називається "аланін-скануючим мутагенезом", як описано Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081-1085. У цьому способі залишок або група цільових залишків (наприклад, заряджені залишки, такі як Arg, Asp, His, Lys і Glu) ідентифікуються і замінюються нейтральною або негативно зарядженою амінокислотою (наприклад, аланіном або поліаланіном) з метою визначити, чи впливає це на взаємодію антитіла з антигеном. Додаткові заміни можуть бути внесені в ті розташування амінокислот, які проявляли функціональну чутливість до початкових замін. Альтернативно або додатково, кристалічна структура комплексу антиген-антигензв'язуюча молекула дозволяє ідентифікувати точки контакту між антитілом і антигеном. Такі контактні залишки й сусідні залишки можуть бути використані в якості мішеней або виключені в якості кандидатів на заміщення. Можна проводити скринінг варіантів, щоб визначити, чи мають вони необхідні властивості.

Амінокислотні вставки включають аміно- і/або карбокси-кінцеві злиття з діапазоном довжини від одного залишку до поліпептидів, що містять сто або більше залишків, а також вставки одного або більше амінокислотних залишків всередині послідовності. Приклади кінцевих вставок включають біспецифічні антитіла з N-кінцевим залишком метіоніла. Інші інсерційні варіанти молекули включають злиття з N- або C-кінцем з поліпептидом, яке збільшує період напіввиведення в сироватці біспецифічного антитіла.

У певних аспектах біспецифічні антитіла, представлені в цьому документі, змінюють для збільшення або зменшення ступеня, до якого антитіло є глікозильованим. Варіанти глікозильованих молекул можуть бути легко отримані шляхом зміни амінокислотної послідовності таким чином, що створюється або видаляється один або більше сайтів глікозилювання, наприклад вуглеводи, приєднані до Fc-домену, можуть бути змінені. Нативні антитіла, що продукуються клітинами ссавців, зазвичай містять розгалужений біантенний олігосахарид, який зазвичай приєднується за допомогою N-зв'язку до Asn297 домену CH2 Fc-області. Див., наприклад, Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997). Олігосахарид може включати різні вуглеводи, наприклад, манозу, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), галактозу і сіалову кислоту, а також фукозу, приєднану до GlcNAc в "стовбурі" біантенної олігосахаридної структури. У деяких варіантах здійснення модифікації олігосахариду в біспецифічних антитілах відповідно до винаходу можуть бути зроблені для створення варіантів з певними покращеними властивостями. В одному аспекті запропоновано варіанти біспецифічних антитіл, що мають вуглеводну структуру, в якій відсутня фукоза, що приєднується (прямо чи опосередковано) до Fc-області. Такі варіанти фукозилювання можуть мати покращену функцію A3KЦ, див., наприклад, публікації патентів США №№ US 2003/0157108 (Presta, L.) або US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Інші варіанти біспецифічних антитіл згідно винаходу включають варіанти з розділеними олігосахаридами, наприклад, в яких біантенний олігосахарид, приєднаний до Fc-області, ділиться навпіл GlcNAc. Такі варіанти можуть мати знижене фукозилювання і або покращену функцію A3KЦ, див., наприклад, WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); патент США № 6602684 (Umana et al.); і US 2005/0123546 (Umana et al.). Також пропонуються варіанти з щонайменше одним залишком галактози в олігосахариді, приєднаному до Fc-області. Такі варіанти антитіл можуть мати покращену функцію K3Ц і описані, наприклад, в WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); і WO 1999/22764 (Raju, S.).

У певних аспектах може бути бажаним створення цистеїн-сконструйованих варіантів біспецифічних антитіл згідно винаходу, наприклад, "тіомкАт", в яких один або більше залишків молекули заміщені залишками цистеїну. У конкретних варіантах здійснення заміщені залишки розташовані в доступних сайтах молекули. Таким чином, в результаті заміни таких залишків на цистеїн, реактивні тіольні групи розташовуються в доступних сайтах антитіла і можуть бути використані для кон'югації антитіла з іншими компонентами, такими як лікарські компоненти або лінкер-лікарські компоненти, для створення імунокон'югата. У конкретних випадках здійснення будь-який один або більше з таких залишків можуть бути заміщені цистеїном: V205 (нумерація за Кабатом) легкого ланцюга; A118 (нумерація EU) важкого ланцюга; і S400 (нумерація EU) Fc-області важкого ланцюга. Цистеїн-сконструйовані антигензв'язуючі молекули можуть бути отримані, як описано, наприклад, в патенті США № 7521541.

У конкретних аспектах біспецифічні антитіла, запропоновані в цьому документі, можуть бути додатково модифіковані, щоб утримувати додаткові небілкові компоненти, які відомі в цій галузі техніки і легко доступні. Компоненти, які підходять для дериватизації антитіла, включають, але не обмежуються ними, водорозчинні полімери. Необмежуючі приклади водорозчинних полімерів включають, без обмежень, поліетиленгліколь (ПЕГ), сополімери етиленгліколю/пропіленгліколю, карбоксиметилцелюлозу, декстран, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, полі- 1,3-діоксолан, полі-1,3,6-триоксану, сополімер етилену/малеїнового ангідриду, поліамінокислоти (або гомополімери, або статистичні сополімери), декстран або полі (н-вінілпіролідон) поліетиленгліколь, гомополімери пропропіленгліколю, сополімери проліпропіленоксиду/етиленоксиду, поліоксиетильовані поліоли (наприклад, гліцерин), полівініловий спирт та їхні суміші. Поліетиленгліколю пропіональдегід може мати переваги у виробництві завдяки його стабільності у воді. Полімер може мати будь-яку молекулярну масу і може бути розгалуженим або нерозгалуженим. Кількість полімерів, прикріплених до антитіла, може варіюватися, і якщо приєднано більше одного полімеру, вони можуть бути однаковими або різними молекулами. Загалом, кількість і/або тип полімерів, використовуваних для дериватизації, може бути визначений на основі міркувань, що включають, але не обмежуються ними, конкретні властивості або функції антитіла, що підлягає покращенню, незалежно від того, чи буде похідне біспецифічного антитіла використовуватися в терапії за певних умов тощо.

В іншому аспекті запропоновані кон'югати антитіла й небілкового фрагмента, які можна

вибірково нагрівати шляхом впливу іонізуючого випромінювання. В одному варіанті здійснення небілковий фрагмент являє собою вуглецеву нанотрубку (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). Іонізуюче випромінювання може мати будь-яку довжину хвилі і включає, але не обмежується цим, довжини хвиль, які не завдають шкоди звичайним клітинам, але які нагрівають небілковий фрагмент до температури, за якої клітини, розташовані близько до кон'югата антитіла-небілковий фрагмент, гинуть.

"Імунокон'югат" являє собою антитіло, кон'юговане з однією або більше гетерологічними молекулами (ою), включаючи, але не обмежуючись цим, цитотоксичний агент.

Термін "полінуклеотид" відноситься до виділеної молекули або конструкту нуклеїнової кислоти, наприклад, матричної РНК (мРНК), отриманої з вірусу РНК, або плазмідної ДНК (пДНК). Полінуклеотид може містити звичайний фосфодіестерний зв'язок або нестандартний зв'язок (наприклад, амідний зв'язок, такий, що виявлено в пептидних нуклеїнових кислотах (ПНК). Термін "молекула нуклеїнової кислоти" відноситься до будь-якого одного або більше сегментів нуклеїнової кислоти, наприклад, фрагментів ДНК або РНК, присутніх у полінуклеотиді.

Під "виділеною" молекулою нуклеїнової кислоти або полінуклеотидом мають на увазі молекулу нуклеїнової кислоти, ДНК або РНК, яку було видалено з її природного середовища. Наприклад, рекомбінантний полінуклеотид, що кодує поліпептид, що міститься у векторі, вважається виділеним для цілей цього винаходу. Додаткові приклади виділеного полінуклеотиду включають рекомбінантні полінуклеотиди, які містяться в гетерологічних клітинах-хазяях, або очищені (частково або практично) полінуклеотиди в розчині. Виділений полінуклеотид включає полінуклеотидну молекулу, що міститься в клітинах, які зазвичай містять полінуклеотидну молекулу, але полінуклеотидна молекула присутня поза хромосоми або в області хромосоми, що відрізняється від її природного розташування в хромосомі. Виділені молекули РНК включають РНК-транскрипти *in vivo* або *in vitro* згідно з винаходом, а також форми позитивних і негативних ланцюгів і дволанцюгові форми. Виділені полінуклеотиди або нуклеїнові кислоти згідно з винаходом додатково включають такі молекули, які отримані синтетичним шляхом. Крім того, полінуклеотид або нуклеїнова кислота можуть являти собою або можуть включати регуляторний елемент, такий як промотор, сайт зв'язування рибосоми або термінатор транскрипції.

Під нуклеїною кислотою або полінуклеотидом, які мають нуклеотидну послідовність щонайменше, наприклад, на 95 % "ідентичну" до еталонної нуклеотидної послідовності згідно з винаходом, мається на увазі, що нуклеотидна послідовність полінуклеотиду ідентична до еталонної послідовності, за винятком того, що полінуклеотидна послідовність може включати до п'яти точкових мутацій на кожні 100 нуклеотидів еталонної нуклеотидної послідовності. Іншими словами, для отримання полінуклеотиду, що має нуклеотидну послідовність щонайменше на 95 % ідентичну до еталонної нуклеотидної послідовності, аж до 5 % нуклеотидів в еталонній послідовності може бути видалено або заміщено іншим нуклеотидом, або число нуклеотидів аж до 5 % від загальної кількості нуклеотидів в еталонній послідовності може бути вставлено в еталонну послідовність. Ці зміни еталонної послідовності можуть відбуватися в 5'- або 3'-кінцевих положеннях еталонної нуклеотидної послідовності або в будь-якому місці між цими кінцевими положеннями, по черзі або індивідуально серед залишків в еталонній послідовності, або в одній або більше суміжних групах всередині еталонної послідовності. На практиці, використовуючи відомі комп'ютерні програми, такі, що обговорювалися вище для поліпептидів (наприклад, ALIGN-2) можна визначити звичайним шляхом, чи є будь-яка конкретна полінуклеотидна послідовність щонайменше на 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичною до нуклеотидної послідовності згідно з винаходом.

Термін "касета експресії" відноситься до полінуклеотиду, що генерується рекомбінантно або синтетично, з рядом певних елементів нуклеїнової кислоти, які забезпечують транскрипцію конкретної нуклеїнової кислоти в цільовій клітині. Рекомбінантна касета експресії може бути включена в плазмід, хромосому, мітохондріальну ДНК, пластидну ДНК, вірус або фрагмент нуклеїнової кислоти. Як правило, рекомбінантна частина касети експресії з вектора експресії включає, крім інших послідовностей, послідовність нуклеїнової кислоти, яка має бути транскрибована, і промотор. У деяких варіантах здійснення касета експресії відповідно до винаходу містить полінуклеотидні послідовності, які кодують біспецифічні антигензв'язуючі молекули відповідно до винаходу або їхні фрагменти.

Термін "вектор" або "вектор експресії" є синонімом "конструкту експресії" і відноситься до молекули ДНК, яка використовується для введення і спрямування експресії конкретного гена, з яким вона функціонально пов'язана, у цільову клітину у цільовій клітині. Термін включає вектор як структуру нуклеїнової кислоти, що самореplikується, а також вектор, вбудований у геном клітини-хазяїна, в яку він був введений. Вектор експресії згідно з винаходом містить касету

експресії. Вектори експресії забезпечують транскрипцію великих кількостей стабільної мРНК. Як тільки вектор експресії знаходиться всередині цільової клітини, молекула або білок рибонуклеїнової кислоти, який кодується геном, продукується за допомогою клітинної транскрипції і/або механізму трансляції. В одному варіанті здійснення вектор експресії

відповідно до винаходу містить касету експресії, яка містить полінуклеотидні послідовності, які кодують біспецифічні антигензв'язуючі молекули відповідно до винаходу або їхні фрагменти.

Терміни "клітина-хазяїн", "лінія клітин-хазяїв" і "культура клітин-хазяїв" використовуються як взаємозамінні і відносяться до клітин, в які була введена екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи потомство таких клітин. Клітини-хазяї включають "трансформанти" і "трансформовані клітини", які включають первинну трансформовану клітину і її потомство, незалежно від кількості пасажів. Потомство може не бути повністю ідентичним за вмістом нуклеїнової кислоти з вихідної кліткою, але може містити мутації. Даний опис включає мутантне потомство, для якого притаманні та ж сама функція або біологічна активність, яку спостерігали під час скринінгу або відбору з первинно трансформованих клітин. Клітка-хазяїн являє собою клітинну систему будь-якого типу, яку можна використовувати для отримання біспецифічних антигензв'язуючих молекул згідно з винаходом. Зокрема, клітина-хазяїн являє собою прокаріотичну або еукаріотичну клітину-хазяїна. Клітини-хазяї включають культивовані клітини, наприклад, культивовані клітини ссавців, такі як клітини CHO, клітини BHK, клітини NS0, клітини SP2/0, клітини мієломи YO, клітини мієломи миші P3X63, клітини PER, клітини PER.C6 або клітини гібридами, клітини дріжджів, клітини комах і клітини рослин, і це лише деякі з них, але також і клітини, що містяться в трансгенній тварині, трансгенній рослині або культивованих рослинних або тваринних тканинах.

"Ефективна кількість" агента відноситься до кількості, необхідної для того, щоб призвести до фізіологічних змін в клітині або тканині, в які його вводять.

"Терапевтично ефективна кількість" агента, наприклад, фармацевтичної композиції відноситься до кількості, ефективній в дозах і протягом періодів часу, необхідних для досягнення бажаного терапевтичного або профілактичного результату. Терапевтична ефективна кількість агента, наприклад, усуває, зменшує, затримує, мінімізує або запобігає несприятливим впливам захворювання.

"Індивідуум" або "суб'єкт" є ссавцем. Ссавці включають, але не обмежуються ними, одомашнених тварин (наприклад, корів, овець, кішок, собак і коней), приматів (наприклад, людей і приматів, які не є людиною, таких як мавпи), кролів і гризунів (наприклад, мишей і щурів). Зокрема, індивідуум або суб'єкт являє собою людину.

Термін "фармацевтична композиція" відноситься до препарату, який знаходиться в такій формі, яка забезпечує ефективність біологічної активності активного інгредієнта, що міститься в ньому, і не містить додаткових компонентів, що є неприйнятно токсичними для суб'єкта, якому повинна бути введена композиція.

"Фармацевтично прийнятний наповнювач" відноситься до інгредієнта у фармацевтичній композиції, що відрізняється від активного інгредієнта та є нетоксичним для суб'єкта. Фармацевтично прийнятний наповнювач включає, але не обмежується ними, буфер, стабілізатор або консервант.

Термін "листок-вкладиш" відноситься до інструкцій, які зазвичай вкладають в комерційні упаковки терапевтичних продуктів для продажу, що містять інформацію про показання, використання, дозування, прийом, комбіновану терапію, протипоказання та/або застереження, що стосуються використання таких терапевтичних продуктів.

У цьому документі термін "лікування" (і його граматичні варіанти, наприклад, "лікувати" або "процес лікування") відноситься до клінічного втручання при спробі змінити природний хід захворювання у індивідуума, що піддається лікуванню, і може здійснюватися для профілактики або в процесі клінічного прояву патології. Бажані ефекти лікування включають, без обмежень, запобігання виникненню або рецидиву захворювання, полегшення симптомів, зменшення будь-яких прямих або непрямих патологічних наслідків захворювання, запобігання метастазуванню, зниження швидкості прогресування захворювання, покращення або тимчасове полегшення патологічного стану і ремісію або покращення прогнозу. В деяких варіантах здійснення антитіла за винаходом використовують для затримки розвитку захворювання або уповільнення прогресування захворювання.

Використаний в цьому документі термін "онкологічне захворювання" відноситься до проліферативних захворювань, таких як лімфоми, лімфоцитарні лейкози, рак легені, недрібноклітинний рак легені (NSCL), бронхіолоальвеолярний рак легені, рак кісток, рак підшлункової залози, рак шкіри, рак голови або шиї, меланома шкіри або інтраокулярна меланома, рак матки, рак яєчників, рак прямої кишки, рак анальної області, рак шлунку, рак

шлунково-кишкового тракту, рак товстої кишки, рак молочної залози, рак матки, карцинома фаллопійових труб, карцинома ендометрія, карцинома шийки матки, карцинома піхви, карцинома вульви, хвороба Ходжкіна, рак стравоходу, рак тонкої кишки, рак ендокринної системи, рак щитоподібної залози, рак парашитоподібної залози, рак надниркової залози, саркома м'яких тканин, рак сечовипускального каналу, рак статевого члена, рак простати, рак сечового міхура, рак нирки або сечоводу, нирково-клітинна карцинома, карцинома ниркової миски, мезотеліома, гепатоцелюлярний рак, рак жовчних шляхів, новоутворення центральної нервової системи (ЦНС), пухлини осі хребта, гліома стовбура головного мозку, мультиформна гліобластома, астроцити, шваноми, епендимоми, медулобластоми, менінгіоми, плоскоклітинні карциноми, аденома гіпофізу та саркома Юїнга, у тому числі рефрактерні види будь-якого з вищевказаних видів злоякісних новоутворень, або комбінація одного або більше з вищевказаних видів злоякісних новоутворень.

Біспецифічні антитіла за винаходом

Винахід забезпечує нові біспецифічні антитіла, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з білком запрограмованої смерті клітини 1 (PD1), і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з геном активації лімфоцитів-3 (LAG3), з особливо корисними властивостями, такими як продуктивність, стабільність, афінність зв'язування, біологічна активність, специфічне націлювання на певні Т-клітини, ефективність націлювання і зниження токсичності.

У певних аспектах запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, який демонструє зменшену інтерналізацію при зв'язуванні з поверхнею Т-клітин. Інтерналізація являє собою важливе поглинання для молекули, яка може розкладатися протягом декількох годин, в той час як цільові рецептори швидко повторно експресуються на поверхні клітини, готової пригнічувати ТКР-сигналінг. У додаткових аспектах запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, який переважно зв'язується з типовими Т-клітинами, а не з Трег. Це вигідно, тому що націлювання на LAG-3 на Трег з використанням блокуючих антитіл може бути шкідливим, збільшуючи їхню переважну функцію і, у кінцевому підсумку, маскуючи позитивний блокуючий ефект щодо інших Т-клітин. У додатковому аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, який здатний відновлювати ефекторні функції Т-клітин від Трег пригнічення. В іншому аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, яке здатне індукувати секрецію гранзиму В CD4 Т-клітинами при спільному культивуванні з лінією пухлинних клітин ARH77, як показано в представленому в цьому документі аналізі. У додатковому аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, який демонструє підвищені специфічні для пухлини ефекторні функції Т-клітин та/або посилює цитотоксичний ефект Т-клітин. В іншому аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, який демонструє підвищену ерадикацію пухлини *in vivo*.

А. Типові біспецифічні антитіла, які зв'язуються з PD1 і LAG3

В одному аспекті у винаході запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому зазначений перший антигензв'язуючий домен, специфічно зв'язується з PD1, містить

домен VH, що містить:

- (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1,
- (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і
- (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; і

домен VL, що містить:

- (i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4;
- (ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, і
- (iii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6.

В одному аспекті біспецифічне антитіло містить Fc-домен, який являє собою Fc-домен IgG, зокрема, Fc-домен IgG1 або Fc-домен IgG4, і причому Fc-домен має знижену або навіть

скасовану ефекторну функцію. Зокрема, Fc-домен містить одну або більше амінокислотних замінів, які зменшують зв'язування з Fc-рецептором, зокрема, з Fcγ-рецептором.

У додатковому аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому біспецифічне антитіло містить Fc-домен, який являє собою Fc-домен IgG, зокрема Fc-домен IgG1 або Fc-домен IgG4, і при цьому Fc-домен містить одну або більше амінокислотних замінів, які зменшують зв'язування з Fc-рецептором, зокрема, з Fcγ-рецептором.

В іншому аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, містить:

(a) домен VH, що містить:

(i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 14,

(ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 15, і

(iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 16; і

домен VL, що містить:

(i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 17,

(ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 18, і

(iii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 19; або

(b) домен VH, що містить:

(i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 22,

(ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 23, і

(iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 24; і

домен VL, що містить:

(i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 25,

(ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 26, і

(iii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 27; або

(c) домен VH, що містить:

(i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30,

(ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 31, і

(iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 32; і

домен VL, що містить:

(i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 33,

(ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 34, і

(iii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35; або

(d) домен VH, що містить:

(i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38,

(ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 39, і

(iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40; і

домен VL, що містить:

(i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41,

(ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42, і

(iii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 43; або

(e) домен VH, що містить:

(i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 46,

(ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 47, і

(iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48; і

домен VL, що містить:

(i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 49,

(ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 50, і

(iii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 51.

В додатковому аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, містить:

(a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8, або

(b) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, або

послідовність SEQ ID NO: 98, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 100, і другий легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 101.

У додатковому аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому біспецифічне антитіло містить Fc-домен, перший Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, який злитий з C-кінцем Fc-домену. Зокрема, Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, злитий з C-кінцем FC-домену через його домен VH (формат транс 1+1).

У конкретному аспекті біспецифічне антитіло містить перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 96, перший легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 98, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 144, і другий легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 101. Більш конкретно, біспецифічне антитіло містить перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 96, перший легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 98, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 144, і другий легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 101.

У додатковому аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому біспецифічне антитіло містить Fc-домен, перший Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, другий Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, і третій Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3. У конкретному аспекті Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, злитий через пептидний лінкер з C-кінцем одного з важких ланцюгів.

У цьому аспекті біспецифічне антитіло є тривалентним з двовалентним зв'язуванням з LAG3 і моновалентним зв'язуванням з PD1. Це означає, що біспецифічне антитіло містить один антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і два антигензв'язуючих домени, які специфічно зв'язуються з LAG3 (формат 2+1).

У конкретному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому біспецифічне антитіло містить:

(a) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 118, перший легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 115,

другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 119, і два других легкі ланцюги, що містять амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 101, або

(b) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 120, перший легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 115,

другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 121, і два других легкі ланцюги, що містять амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 99, або

(c) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 122, перший легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 115,

другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 103, і два других легкі ланцюги, що містять

ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 125, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 103, і другий легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 105.

5 Більш конкретно, біспецифічне антитіло містить:

(а) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 123, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 119, і два легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 101, або

10 (b) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 124, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 121, і два легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 99, або

(c) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 125, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 103, і два легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 105.

15 У додатковому аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому біспецифічне антитіло містить Fc-домен, два Fab-фрагменти, кожен з яких містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, і домен VH і VL, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1. Зокрема, домен VH антигензв'язуючого домену, який специфічно зв'язується з PD1, злитий через пептидний лінкер з C-кінцем одного з важких ланцюгів, а домен VL антигензв'язуючого домену, який специфічно зв'язується з PD1, злитий через пептидний лінкер з C-кінцем іншого важкого ланцюга.

25 У конкретному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому біспецифічне антитіло містить перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 126, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 127, і два легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 109. Більш конкретно, біспецифічне антитіло містить перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 126, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 127, і два легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 109.

35 У додатковому аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому біспецифічне антитіло містить Fc-домен, перший Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, другий Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, третій Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, і четвертий Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1.

40 У цьому аспекті біспецифічне антитіло є чотирихвалентним з двовалентним зв'язуванням з LAG3 і двовалентним зв'язуванням з PD1. Це означає, що біспецифічне антитіло містить два антигензв'язуючих домени, які специфічно зв'язуються з PD1, і два антигензв'язуючих домени, які специфічно зв'язуються з LAG3 (формат 2+2).

В одному аспекті біспецифічне антитіло за винаходом містить:

(а) два легких ланцюги та два важких ланцюги антитіла, що містить два Fab-фрагменти, що містять антигензв'язуючі домени, які специфічно зв'язуються з LAG3, і

50 (b) два додаткових Fab-фрагмента, що містять антигензв'язуючі домени, які специфічно зв'язуються з PD1, причому кожен із зазначених додаткових Fab-фрагментів з'єднаний через пептидний лінкер з C-кінцем важких ланцюгів (а).

У конкретному аспекті пептидний лінкер являє собою (G₄S)₄. В іншому аспекті два додаткових Fab-фрагмента, що містять антигензв'язуючі домени, які специфічно зв'язуються з PD1, являють собою кросоверні Fab-фрагменти, при цьому варіабельні домени VL і VH замінені один на одного, і кожен з ланцюгів VL-CH з'єднаний через пептидний лінкер з C-кінцем важких ланцюгів (а).

В одному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому кожний з двох Fab-фрагментів, містить

антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і при цьому кожен злитий через пептидний лінкер з С-кінцем одного з важких ланцюгів, відповідно.

У конкретному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому біспецифічне антитіло містить:

(а) два важкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 114, два перші легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 115, і два других легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 101, або

(б) два важкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 116, два перші легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 115, і два других легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 99, або

(с) два важкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 117, два перші легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 115, і два других легкі ланцюги, що містять амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 105.

Більш конкретно, біспецифічне антитіло містить:

(а) два важкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 114, два перші легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 115, і два других легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 101, або

(б) два важкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 116, два перші легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 115, і два других легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 99, або

(с) два важкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 117, два перші легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 115, і два другі легкі ланцюги, які містять амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 105.

Модифікації Fc-домену, що знижують зв'язування Fc-рецептора та/або ефекторну функцію

У певних аспектах запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому біспецифічне антитіло містить Fc-домен, що містить одну або більше амінокислотних модифікацій, які зменшують зв'язування з Fc-рецептором, зокрема з Fcγ-рецептором, і зменшують або відмінюють ефекторну функцію.

У певних аспектах одна або більше амінокислотних модифікацій можуть бути введені в Fc-область антитіла, запропонованого в цьому документі, тим самим генеруючи варіант Fc-області. Варіант Fc-області може містити послідовність Fc-області людини (наприклад, Fc-область IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 людини), що містить амінокислотну модифікацію (наприклад, заміну) в одному або більше амінокислотних положеннях.

У наступному розділі описані кращі аспекти біспецифічних антигензв'язуючих молекул за винаходом, що містять модифікації Fc-домену, що знижують зв'язування Fc-рецептора та/або ефекторну функцію. В одному аспекті винахід відноситься до біспецифічного антитіла, який містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому Fc-домен містить одну або більше амінокислотних замін, які зменшують зв'язування з Fc-рецептором, зокрема, з Fcγ-рецептором. Зокрема, Fc-домен належить до підкласу IgG1 людини з амінокислотними мутаціями L234A, L235A і P329G (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

Fc-домен дає відповідні фармакокінетичні властивості біспецифічних антитіл за винаходом, включаючи тривалий період напіввиведення в сироватці, який сприяє відповідному накопиченню в цільовій тканині, і оптимальному співвідношенню в розподілі між тканиною і кров'ю. У той самий час це може, однак, привести до небажаного націлювання біспецифічних антитіл згідно винаходу на клітини, які експресують Fc-рецептори, а не на кращі клітини, які несуть антиген. Відповідно, у конкретних варіантах здійснення Fc-домен біспецифічних антитіл за винаходом проявляє знижену афінність зв'язування з Fc-рецептором та/або знижену ефекторну функцію в порівнянні з нативним Fc-доменом IgG, зокрема, Fc-доменом IgG1 або Fc-доменом IgG4. Більш конкретно, Fc-домен являє собою Fc-домен IgG1.

В одному такому аспекті Fc-домен (або біспецифічна антигензв'язуюча молекула за

винаходом, що містить зазначений Fc-домен) проявляє менш ніж 50 %, переважно менше ніж 20 %, більш переважно менше ніж 10 % і найбільш переважно менше ніж 5 % афінності зв'язування з Fc -рецептором у порівнянні з нативним Fc-доменом IgG1 (або біспецифічною антигензв'язуючою молекулою за винаходом, що містить нативний Fc-домен IgG1) та/або менш ніж 50 %, переважно менше ніж 20 %, більш переважно менше ніж 10 % і найбільш переважно менше ніж 5 % ефекторної функції в порівнянні з нативним Fc-доменом IgG1 (або біспецифічною антигензв'язуючою молекулою за винаходом, що містить нативний Fc-домен IgG1). В одному аспекті Fc-домен (або біспецифічна антигензв'язуюча молекула за винаходом, що містить зазначений Fc-домен) по суті не зв'язується з Fc-рецептором та/або не індукуює ефекторну функцію. У конкретному аспекті Fc-рецептор являє собою Fcγ-рецептор. В одному аспекті Fc-рецептор являє собою людський Fc-рецептор. В одному аспекті Fc-рецептор являє собою активуючий Fc-рецептор. У конкретному аспекті Fc-рецептор являє собою активуючий людський Fcγ-рецептор, більш конкретно людський FcγRIIIa, FcγRI або FcγRIIa, найбільш конкретно людський FcγRIIIa. В одному аспекті Fc-рецептор являє собою інгібуючий Fc-рецептор. У конкретному аспекті Fc-рецептор являє собою інгібуючий людський Fcγ-рецептор, більш конкретно людський FcγRIIB. В одному аспекті ефекторна функція являє собою одну або більше з K3Ц, A3KЦ, A3KF і секреції цитокінів. У конкретному аспекті ефекторна функція являє собою A3KЦ. В одному аспекті Fc-домен проявляє по суті подібну афінність зв'язування з неонатальним Fc-рецептором (FcRn) в порівнянні з нативним Fc-доменом IgG1. По суті аналогічне зв'язування з FcRn досягається, коли Fc-домен (або біспецифічна антигензв'язуюча молекула за винаходом, що містить зазначений Fc-домен) проявляє більш ніж близько 70 %, зокрема, більш ніж близько 80 %, більш конкретно, більш ніж близько 90 % афінності зв'язування нативного Fc-домену IgG1 (або біспецифічної антигензв'язуючої молекули за винаходом, що містить нативний Fc-домен IgG1) з FcRn.

У конкретному аспекті, Fc-домен конструюють так, щоб мати знижену афінність зв'язування з Fc-рецептором та/або знижену ефекторну функцію в порівнянні з несконструйованим Fc-доменом. У конкретному аспекті Fc-домен біспецифічної антигензв'язуючої молекули за винаходом містить одну або більше амінокислотних мутацій, які знижують афінність зв'язування Fc-домену з Fc-рецептором та/або ефекторною функцією. Як правило, одна і та ж або більш амінокислотних мутацій присутні в кожній з двох субодиниць Fc-домену. В одному аспекті амінокислотна мутація знижує афінність зв'язування Fc-домену з Fc-рецептором. В іншому аспекті амінокислотна мутація знижує афінність зв'язування Fc-домену з Fc-рецептором щонайменше в 2 рази, щонайменше в 5 або щонайменше в 10 разів. В одному аспекті біспецифічна антигензв'язуюча молекула за винаходом, що містить сконструйований Fc-домен, проявляє менше 20 %, зокрема, менше 10 %, більш конкретно, менше 5 % афінності зв'язування з Fc-рецептором в порівнянні з біспецифічними антитілами за винаходом, що містять несконструйований Fc-домен. У конкретному аспекті Fc-рецептор являє собою Fcγ-рецептор. В інших аспектах Fc-рецептор являє собою людський Fc-рецептор. В одному аспекті Fc-рецептор являє собою інгібуючий Fc-рецептор. У конкретному аспекті Fc-рецептор являє собою інгібуючий людський Fcγ-рецептор, більш конкретно людський FcγRIIB. У деяких аспектах Fc-рецептор являє собою активуючий Fc-рецептор. У конкретному аспекті Fc-рецептор являє собою активуючий людський Fcγ-рецептор, більш конкретно людський FcγRIIIa, FcγRI або FcγRIIa, найбільш конкретно людський FcγRIIIa. Переважно зв'язування з кожним з цих рецепторів зменшується. У деяких аспектах афінність зв'язування з компонентом комплексу, зокрема, афінність зв'язування з C1q, також знижується. В одному аспекті афінність зв'язування з неонатальним Fc-рецептором (FcRn) не знижується. По суті аналогічне зв'язування з FcRn, тобто збереження афінності зв'язування Fc-домену із зазначеним рецептором, досягається, коли Fc-домен (або біспецифічна антигензв'язуюча молекула відповідно до винаходу, що містить зазначений Fc-домен) проявляє більше ніж близько 70 % афінності зв'язування несконструйованої форми Fc-домену (або біспецифічної антигензв'язуючої молекули відповідно до винаходу, що містить зазначену несконструйовану форму Fc-домену) з FcRn. Fc-домен або біспецифічна антигензв'язуюча молекула відповідно до винаходу, що містить зазначений Fc-домен, може проявляти більше ніж близько 80 % і навіть більше ніж близько 90 % такої афінності. У деяких варіантах здійснення винаходу Fc-домен біспецифічної антигензв'язуючої молекули відповідно до винаходу має знижену ефекторну функцію у порівнянні з несконструйованим Fc-доменом. Знижена ефекторна функція може включати, але не обмежується цим, одне або більше з наступного: знижену комплементзалежну цитотоксичність (K3Ц), знижену антитілозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (A3KЦ), знижений антитілозалежний клітинний фагоцитоз (A3KF), знижену секрецію цитокінів, знижене опосередковане імунним комплексом поглинання антигена антигенпрезентуючими клітинами,

знижене зв'язування з NK-клітинами, знижене зв'язування з макрофагами, знижене зв'язування з моноцитами, знижене зв'язування з поліморфно-ядерними клітинами, знижений сигналінг, індукуючий апоптоз, зменшене дозрівання дендритних клітин, або знижене преміювання Т-клітин.

Антитіла зі зниженою ефекторною функцією включають антитіла з заміною одного або більше залишків Fc-області 238, 265, 269, 270, 297, 327 і 329 (патент США № 6737056). Такі Fc-мутанти включають Fc-мутанти з замінами в двох або більше амінокислотних положеннях 265, 269, 270, 297 і 327, включаючи так званий "DANA" Fc-мутант із заміною залишків 265 і 297 на аланін (патент США № 7332581). Описано деякі варіанти антитіл з покращеним або зменшеним зв'язуванням з FcR. (наприклад, патент США № 6737056; WO 2004/056312 і Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604).

В одному аспекті винаходу Fc-домен містить амінокислотну заміну в положенні E233, L234, L235, N297, P331 і P329. У деяких аспектах Fc-домен містить амінокислотні заміни L234A і L235A ("LALA"). В одному такому варіанті здійснення Fc-домен являє собою Fc-домен IgG1, зокрема, Fc-домен людського IgG1. В одному аспекті Fc-домен містить амінокислотну заміну в положенні P329. У більш конкретному аспекті амінокислотна заміна являє собою P329A або P329G, зокрема, P329G. В одному варіанті здійснення Fc-домен містить амінокислотну заміну в положенні P329 і додаткову амінокислотну заміну, обрану з групи, що складається з E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D або P331S. У більш конкретних варіантах здійснення Fc-домен містить амінокислотні мутації L234A, L235A і P329G ("P329G LALA"). Комбінація амінокислотних замін "P329G LALA" практично повністю усуває зв'язування Fc γ -рецептора з Fc-доменом людського IgG1, як описано в заявці на патент PCT № WO 2012/130831 A1. Таким антитілом є IgG1 з мутаціями L234A і L235A або з мутаціями L234A, L235A і P329G (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

В одному аспекті біспецифічне антитіло відповідно до винаходу містить (всі положення відповідно до індексу EU за Кабатом) (i) гомодимерну Fc-область підкласу IgG1 людини необов'язково з мутаціями P329G, L234A і L235A, або (ii) гомодимерну Fc-область підкласу IgG4 людини необов'язково з мутаціями P329G, S228P і L235E, або (iii) гомодимерну Fc-область підкласу IgG1 людини необов'язково з мутаціями P329G, L234A, L235A, I253A, H310A і H435A, або необов'язково з мутаціями P329G, L234A, L235A, H310A, H433A і Y436A, або (iv) гетеродимерну Fc-область, де один поліпептид Fc-області містить мутацію T366W, а інший поліпептид Fc-області містить мутації T366S, L368A і Y407V, або де один поліпептид Fc-області містить мутації T366W і Y349C, а інший поліпептид Fc-області містить мутації T366S, L368A, Y407V і S354C, або де один поліпептид Fc-області містить мутації T366W і S354C, а інший поліпептид Fc-області містить мутації T366S, L368A, Y407V і Y349C або (v) гетеродимерну Fc-область підкласу IgG1 людини, де обидва поліпептиду Fc-області містять мутації P329G, L234A і L235A, і один поліпептид Fc-області містить мутацію T366W, а інший поліпептид Fc-області містить мутації T366S, L368A і Y407V, або де один поліпептид Fc-області містить мутації T366W і Y349C, а інший поліпептид Fc-області містить мутації T366S, L368A, Y407V і S354C або де один поліпептид Fc-області містить мутації T366W і S354C, а інший поліпептид Fc-області містить мутації T366S, L368A, Y407V і Y349C.

В одному аспекті Fc-домен являє собою Fc-домен IgG4. У більш конкретному варіанті здійснення Fc-домен являє собою Fc-домен IgG4, що містить амінокислотну заміну в положенні S228 (нумерація за Кабатом), зокрема амінокислотну заміну S228P. У більш конкретному варіанті здійснення Fc-домен являє собою Fc-домен IgG4, що містить амінокислотні заміни L235E і S228P і P329G. Ця амінокислотна заміна знижує *in vivo* обмін Fab-фрагментами IgG4-антитіл (див. Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)). Таким чином, в одному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить (всі положення відповідно до індексу EU за Кабатом) гетеродимерну Fc-область підкласу IgG4 людини, при цьому обидва поліпептида Fc-області містять мутації P329G, S228P і L235E і один поліпептид Fc-області містить мутацію T366W, а інший поліпептид Fc-області містить мутації T366S, L368A і Y407V, або де один поліпептид Fc-області містить мутації T366W і Y349C, а інший поліпептид Fc-області містить мутації T366S, L368A, Y407V і S354C, або де один поліпептид Fc-області містить мутації T366W і S354C, а інший поліпептид Fc-області містить мутації T366S, L368A, Y407V і Y349C.

Антитіла зі збільшеним періодом напіввиведення і покращеним зв'язуванням з неонатальним Fc-рецептором (FcRn), який відповідає за передачу материнських IgG до плоду (Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593, і Kim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434), як описано в US 2005/0014934. Ці антитіла містять Fc-область з однієї або більше

замінами, які покращують зв'язування Fc-області з FcRn. Такі варіанти Fc включають варіанти з замінами при одному або більше залишках Fc-області: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 або 434, наприклад, заміну залишку Fc-області 434 (патент США № 7371826). Див. також Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; US 5648260; US 5624821; i WO 94/29351, що стосуються інших прикладів варіантів Fc-області.

Зв'язування з Fc-рецепторами може бути легко визначено, наприклад, за допомогою ІФА або поверхневого плазмонного резонансу (ППР) з використанням стандартних приладів, таких як прилад BIAcore (GE Healthcare), і такі Fc-рецепторами можуть бути отримані шляхом рекомбінантної експресії. У цьому документі описано такий відповідний аналіз. Альтернативно, афінність зв'язування Fc-доменів або активуючих клітини біспецифічних антигензв'язуючих молекул, що містять Fc-домен для Fc-рецепторів, може бути оцінена з використанням клітинних ліній, про які відомо, що вони експресують конкретні Fc-рецептори, наприклад, людських NK-клітин, експресуючих FcγIIIa-рецептор. Ефекторна функція Fc-домену або біспецифічних антитіл згідно винаходу, що містять Fc-домен, може бути виміряна способами, відомими в цій галузі техніки. Відповідний аналіз для вимірювання АЗКЦ описаний в цьому документі. Інші приклади аналізів *in vitro* для оцінки активності АЗКЦ молекули, що представляє інтерес, описані в патенті США № 5500362; Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986) і Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985); патенті США № 5821337; Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987). В альтернативному варіанті можуть бути використані способи нерадіоактивного аналізу (див., наприклад, спосіб нерадіоактивного аналізу цитотоксичності ACT1™ для проточної цитометрії (CellTechnology, Inc., Маунтін-В'ю, штат Каліфорнія) і спосіб нерадіоактивного аналізу цитотоксичності CytoTox 96® (Promega, Медисон, штат Вісконсін)). Придатні ефекторні клітини для таких аналізів включають моноклеарні клітини периферичної крові (МКПК) і природні клітини-кілери (NK). Альтернативно або додатково, активність АЗКЦ молекули, що представляє інтерес, можна оцінити *in vivo*, наприклад, на тваринній моделі, такий як описано в Clynes et al. Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998).

У наступному розділі описані кращі аспекти біспецифічних антитіл згідно винаходу, що містять модифікації Fc-домену, що знижують зв'язування Fc-рецептора і/або ефекторну функцію. В одному аспекті винахід відноситься до біспецифічного, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язує PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому Fc-домен містить одну або більше амінокислотних замінів, які зменшують афінність зв'язування антитіла з Fc-рецептором, зокрема, з Fcγ-рецептором. В іншому аспекті винахід відноситься до біспецифічного антитіла, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому Fc-домен містить одну або більше амінокислотних замінів, які знижують ефекторну функцію. У конкретному аспекті Fc-домен належить до підкласу IgG1 людини з амінокислотними мутаціями L234A, L235A і P329G (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

Модифікації Fc-домену, що сприяють гетеродимеризації

Біспецифічні антигензв'язуючі молекули відповідно до винаходу містять різні антигензв'язуючі домени, злиті з однією чи другою з двох субодиниць Fc-домену, з цієї причини дві субодиниці Fc-домену можуть міститися в двох неідентичних поліпептидних ланцюгах. Рекомбінантна коекспресія цих поліпептидів і подальша димеризація призводить до виникнення кількох можливих комбінацій двох поліпептидів. Таким чином, для підвищення виходу і чистоти біспецифічних антитіл згідно винаходу при рекомбінантній продукції буде вигідно вводити в Fc-домен біспецифічних антигензв'язуючих молекул відповідно до винаходу модифікацію, що сприяє асоціації необхідних поліпептидів.

Відповідно, в конкретних аспектах винахід відноситься до біспецифічного антитіла, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому Fc-домен містить модифікацію, що сприяє асоціації першої і другої субодиниць Fc-домену. Сайт найбільш значної міжбілкової взаємодії між двома субодиницями Fc-домену IgG людини знаходиться в домені CH3 Fc-домену. Таким чином, в одному аспекті зазначена модифікація знаходиться в домені CH3 Fc-домену.

У конкретному аспекті зазначена модифікація являє собою так звану модифікацію "виступ-в-отвір", що містить модифікацію "виступ" в одній з двох субодиниць Fc-домену і модифікацію "отвір" в іншій з двох субодиниць Fc-домену. Таким чином, винахід відноситься до біспецифічного антитіла, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно

зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий сайт, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому перша субодиниця Fc-домену містить виступи і друга субодиниця Fc-домену містить отвори відповідно до способу "виступи-в-отвори". У конкретному аспекті перша субодиниця Fc-домену містить амінокислотні заміни S354C і T366W (нумерація EU), а друга субодиниця Fc-домену містить амінокислотні заміни Y349C, T366S і Y407V (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

Технологія "виступ-в-отвір" описана, наприклад, в US 5731168; US 7695936; Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) і Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001). Зазвичай спосіб включає введення випинання ("виступу") на поверхні зв'язування першого поліпептиду і відповідної порожнини ("отвора") на поверхні взаємодії другого поліпептиду, так що випинання може бути розташоване в порожнині так, що сприяє утворенню гетеродимера і перешкоджає утворенню гомодимеру. Випинання конструюють шляхом заміни невеликих бічних ланцюгів амінокислот з поверхні взаємодії першого поліпептиду більшими бічними ланцюгами (наприклад, тирозином або триптофаном). Компенсаторні порожнини ідентичного або схожого розміру з випинаннями створюються на поверхні взаємодії другого поліпептиду шляхом заміни великих бічних ланцюгів амінокислот дрібнішими (наприклад, аланіном або треоніном).

Відповідно, в одному аспекті в домені CH3 першої субодиниці Fc-домену біспецифічних антигензв'язуючих молекул відповідно до винаходу амінокислотний залишок замінений амінокислотним залишком, що має більший об'єм бічного ланцюга, тим самим створюючи випинання всередині домену CH3 першої субодиниці, яке може розміщуватися в порожнині всередині домену CH3 другої субодиниці, а в домені CH3 другої субодиниці Fc-домену амінокислотний залишок замінений амінокислотним залишком, що має менший об'єм бічного ланцюга, в результаті чого утворюється порожнина в домені CH3 другої субодиниці, всередині якої може розміщуватися випинання, що знаходиться в межах домену CH3 першої субодиниці. Випинання і порожнина можуть бути отримані шляхом зміни нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептиди, наприклад, за допомогою сайт-специфічного мутагенезу або пептидного синтезу. У конкретному аспекті в домені CH3 першої субодиниці Fc-домену залишок треоніну в положенні 366 замінений залишком триптофану (T366W), а в домені CH3 другої субодиниці Fc-домену залишок тирозину в положенні 407 замінений залишком валіну (Y407V). В одному аспекті в другій субодиниці Fc-домену додатково залишок треоніну в положенні 366 замінений залишком серину (T366S), а залишок лейцину в положенні 368 замінений залишком аланіну (L368A).

У ще одному додатковому аспекті в першій субодиниці Fc-домену додатково сериновий залишок в положенні 354 замінений залишком цистеїну (S354C), а в другій субодиниці Fc-домену додатково залишок тирозину в положенні 349 замінений на залишок цистеїну (Y349C). Введення цих двох залишків цистеїну призводить до утворення дисульфідного містка між двома субодиницями Fc-домену, що додатково стабілізує димер (Carter (2001), J Immunol Methods 248, 7-15). У конкретному аспекті перша субодиниця Fc-домену містить амінокислотні заміни S354C і T366W (нумерація EU), а друга субодиниця Fc-домену містить амінокислотні заміни Y349C, T366S і Y407V (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

Але також можуть використовуватися альтернативно або додатково інші технології "виступи-в-отвори", описані в EP 1870459. В одному варіанті здійснення мультиспецифічне антитіло містить мутації R409D і K370E в домені CH3 "ланцюга з виступами" і мутації D399K і E357K в домені CH3 "ланцюга з отвором" (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В одному аспекті біспецифічне антитіло містить мутацію T366W в домені CH3 "ланцюга з виступами" і мутації T366S, L368A і Y407V в домені CH3 "ланцюга з отвором" і, крім того, мутації R409D і K370E в домені CH3 "ланцюга з виступами" і мутації D399K і E357K в домені CH3 "ланцюга з отвором" (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В одному аспекті біспецифічне антитіло містить мутації Y349C і T366W в одному з двох доменів CH3 і мутації S354C, T366S, L368A і Y407V в іншому з двох доменів CH3, або мультиспецифічне антитіло містить мутації Y349C і T366W в одному з двох доменів CH3, і мутації S354C, T366S, L368A і Y407V в другому з двох доменів CH3 і, крім того, мутації R409D і K370E в домені CH3 "ланцюга з виступами" і мутації D399K і E357K в домені CH3 "ланцюга з отвором" (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В альтернативному аспекті модифікація, що сприяє асоціації першої і другої субодиниць Fc-області, включає модифікацію, що опосередковує ефекти електростатичних сил, наприклад, як описано в публікації PCT WO 2009/089004. Як правило, цей спосіб включає заміну одного або більше амінокислотних залишків на поверхні взаємодії двох субодиниць Fc-домену зарядженими амінокислотними залишками, так що утворення гомодимеру стає електростатично не вигідним, а гетеродимеризація електростатично вигідною.

Крім "технології виступ-в-отвір" в цій галузі техніки відомі інші способи модифікації доменів СНЗ важких ланцюгів мультиспецифічного антитіла для забезпечення гетеродимеризації. Дані технології, особливо ті, які описані в WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011 / 143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 і WO 2013/096291 розглядаються в цьому документі в якості альтернативи "технології виступ-в-отвір" у комбінації з біспецифічним антитілом.

В одному аспекті в біспецифічному антитілі підхід, описаний в EP 1870459, використовується для підтримки гетеродимеризації першого важкого ланцюга і другого важкого ланцюга мультиспецифічного антитіла. Цей підхід заснований на введенні заряджених амінокислот з протилежними зарядами в певних положеннях амінокислот на поверхні взаємодії доменів СНЗ/СНЗ між як першим, так і другим важким ланцюгом.

Відповідно, в цьому аспекті в третинній структурі мультиспецифічного антитіла домен СНЗ першого важкого ланцюга і домен СНЗ другого важкого ланцюга формують поверхню взаємодії, яка розташована між відповідними доменами СНЗ антитіла, при цьому кожна з відповідних амінокислотних послідовностей домену СНЗ першого важкого ланцюга і амінокислотних послідовностей домену СНЗ другого важкого ланцюга містять набір амінокислот, який розташований на вказаній поверхні взаємодії в третинній структурі антитіла, при цьому з набору амінокислот, який розташований на поверхні взаємодії в домені СНЗ одного важкого ланцюга, перша амінокислота замінюється позитивно зарядженою амінокислотою і з набору амінокислот, який знаходиться на поверхні в домені СНЗ другого важкого ланцюга, друга амінокислота заміщена негативно зарядженою амінокислотою. Біспецифічне антитіло відповідно до цього аспекту в цьому документі також позначається як "СНЗ (+/-) - сконструйоване біспецифічне антитіло" (де аббревіатура "+/-" позначає протилежно заряджені амінокислоти, які були введені у відповідні домени СНЗ).

В одному аспекті в СНЗ (+/-) - сконструйованому біспецифічному антитілі позитивно заряджену амінокислоту обирають з К, R і Н, а негативно заряджену амінокислоту обирають з Е або D.

В одному аспекті в СНЗ (+/-) - сконструйованому біспецифічному антитілі позитивно заряджену амінокислоту обирають з К і R, а негативно заряджену амінокислоту обирають з Е або D.

В одному аспекті в СНЗ (+/-) - сконструйованому біспецифічному антитілі позитивно заряджена амінокислота являє собою К, а негативно заряджена амінокислота являє собою Е.

В одному аспекті в СНЗ (+/-) - сконструйованому біспецифічному антитілі в домені СНЗ одного важкого ланцюга амінокислоту R в положенні 409 заміщують на D, і амінокислоту К в положенні заміщують на Е, і в домені СНЗ іншого важкого ланцюга амінокислоту D в положенні 399 заміщують на К, і амінокислоту Е в положенні 357 заміщують на К (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В одному аспекті підхід, описаний в WO 2013/157953, використовується для підтримки гетеродимеризації першого важкого ланцюга і другого важкого ланцюга мультиспецифічного антитіла. В одному варіанті здійснення в домені СНЗ одного важкого ланцюга амінокислоту Т в положенні 366 заміщують на К, і в домені СНЗ іншого важкого ланцюга амінокислоту L в положенні 351 заміщують на D (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом). В іншому варіанті здійснення в домені СНЗ одного важкого ланцюга амінокислоту Т в положенні 366 заміщують на К, і амінокислоту L в положенні 351 заміщують на К, і в домені СНЗ іншого важкого ланцюга амінокислоту L в положенні 351 заміщують на D (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В іншому аспекті в домені СНЗ одного важкого ланцюга амінокислоту Т в положенні 366 заміщують на К, і амінокислоту L в положенні 351 заміщують на К, і в домені СНЗ іншого важкого ланцюга амінокислоту L в положенні 351 заміщують на D (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом). Крім того, щонайменше одна з наступних замінь міститься в домені СНЗ іншого важкого ланцюга: амінокислоту Y в положенні 349 заміщують на Е, амінокислоту Y в положенні 349 заміщують на D, а амінокислоту L в положенні 368 заміщують на Е (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом). В одному варіанті здійснення амінокислоту L в положенні 368 заміщують на Е (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В одному аспекті підхід, описаний в WO 2012/058768, використовується для підтримки гетеродимеризації першого важкого ланцюга і другого важкого ланцюга мультиспецифічного антитіла. В одному аспекті в домені СНЗ одного важкого ланцюга амінокислоту L в положенні 351 заміщують на Y, і амінокислоту Y в положенні 407 заміщують на А, і в домені СНЗ іншого важкого ланцюга амінокислоту Т в положенні 366 заміщують на А, і амінокислоту К в положенні 409 заміщують на F (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом). В іншому варіанті

здійснення, додатково до вищезазначених заміन, в домені СН₃ другого важкого ланцюга щонайменше одну з амінокислот, яка знаходяться в положеннях 411 (спочатку Т), 399 (спочатку D), 400 (спочатку S), 405 (спочатку F), 390 (спочатку N) і 392 (спочатку K), заміщують (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом). Кращими замінами є:

- 5 - заміна амінокислоти Т в положенні 411 амінокислотою, обраною з N, R, Q, K, D, E і W (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом),
- заміна амінокислоти D в положенні 399 амінокислотою, обраною з R, W, Y і K (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом),
- заміна амінокислоти S в положенні 400 амінокислотою, обраною з E, D, R і K (нумерація
- 10 відповідно до індексу EU за Кабатом),
- заміна амінокислоти F в положенні 405 амінокислотою, обраною з I, M, T, S, V і W (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом);
- заміна амінокислоти N в положенні 390 амінокислотою, обраною з R, K і D (нумерація
- відповідно до індексу EU за Кабатом); і
- 15 - заміна амінокислоти K в положенні 392 амінокислотою, обраною з V, M, R, L, F і E (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В іншому аспекті біспецифічне антитіло сконструйовано відповідно до WO 2012/058768), тобто в домені СН₃ одного важкого ланцюга амінокислоту L в положенні 351 заміщують на Y, і амінокислоту Y в положенні 407 заміщують на A, і в домені СН₃ іншого важкого ланцюга амінокислоту T в положенні 366 заміщують на V, і амінокислоту до в положенні 409 заміщують на F (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом). В іншому варіанті здійснення мультиспецифічного антитіла в домені СН₃ одного важкого ланцюга амінокислоту Y в положенні 407 заміщують на A, і в домені СН₃ іншого важкого ланцюга амінокислоту T в положенні 366 заміщують на A і амінокислоту K в положенні 409 заміщують на F (нумерація

20 відповідно до індексу EU за Кабатом). В останньому вищезгаданому варіанті здійснення в домені СН₃ іншого важкого ланцюга амінокислоту K в положенні 392 заміщують на E, амінокислоту T в положенні 411 заміщують на E, амінокислоту D в положенні 399 заміщують на R і амінокислоту S в положенні 400 заміщують R (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В одному аспекті підхід, описаний в WO 2011/143545, використовується для підтримки гетеродимеризації першого важкого ланцюга і другого важкого ланцюга мультиспецифічного антитіла. В одному аспекті амінокислотні модифікації в доменах СН₃ обох важких ланцюгів здійснюються в положеннях 368 і / або 409 (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В одному аспекті підхід, описаний в WO 2011/090762, використовується для підтримки гетеродимеризації першого важкого ланцюга і другого важкого ланцюга біспецифічного антитіла. WO 2011/090762 відноситься до амінокислотних модифікацій відповідно до технології "виступ-в-отвір" (KiH). В одному варіанті здійснення в домені СН₃ одного важкого ланцюга амінокислоту T в положенні 366 заміщують на W, а в домені СН₃ іншого важкого ланцюга амінокислоту Y в положенні 407 заміщують на A (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

40 В іншому варіанті здійснення в домені СН₃ одного важкого ланцюга амінокислоту T в положенні 366 заміщують на Y, а в домені СН₃ іншого важкого ланцюга амінокислоту Y в положенні 407 заміщують на T (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В одному аспекті підхід, описаний в WO 2009/089004, використовується для підтримки гетеродимеризації першого важкого ланцюга і другого важкого ланцюга біспецифічного антитіла. В одному варіанті здійснення в домені СН₃ одного важкого ланцюга амінокислоту K або N в положенні 392 заміщують негативно зарядженою амінокислотою (в одному варіанті здійснення на E або D, в одному кращому варіанті здійснення на D) і в домені СН₃ іншого важкого ланцюга амінокислоту D в положенні 399, амінокислоту E або D в положенні 356 або амінокислоту E в положенні 357 заміщують позитивно зарядженою амінокислотою (в одному

50 варіанті здійснення на K або R, в одному кращому варіанті здійснення на K, в одному кращому варіанті здійснення амінокислоти в положеннях 399 або 356 заміщують на K) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом). В одному додатковому варіанті здійснення, додатково до вищезазначених замін, в домені СН₃ одного важкого ланцюга амінокислоту K або R в положенні 409 заміщують негативно зарядженою амінокислотою (в одному варіанті здійснення на E або D, в одному кращому варіанті здійснення на D) (нумерація згідно індексом EU за Кабатом). У ще

55 одному додатковому аспекті, додатково або в якості альтернативи до вищезазначених замін, в домені СН₃ одного важкого ланцюга амінокислоту K в положенні 439 і/або амінокислоту K в положенні 370 незалежно одну від одної заміщують негативно зарядженою амінокислотою (в

60 одному варіанті здійснення на E або D, в одному кращому варіанті здійснення на D) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В одному аспекті підхід, описаний в WO 2007/147901, використовується для підтримки гетеродимеризації першого важкого ланцюга і другого важкого ланцюга мультиспецифічного антитіла. В одному варіанті здійснення в домені CH3 одного важкого ланцюга амінокислоту K в положенні 253 заміщують на E, амінокислоту D в положенні 282 заміщують на K, а амінокислоту K в положенні 322 заміщують на D, і в домені CH3 іншого важкого ланцюга, амінокислоту D в положенні 239 заміщують на K, амінокислоту E в положенні 240 заміщують на K, а амінокислоту K в положенні 292 заміщують на D (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

С-кінець важкого ланцюга біспецифічного антитіла, як зазначено в цьому документі, може являти собою повнорозмірний С-кінець, який закінчується амінокислотними залишками ФГК (фосфогліцераткінази). С-кінець важкого ланцюга може бути вкороченим С-кінцем, в якому один або два С-кінцевих амінокислотних залишку були видалені. В одному кращому аспекті С-кінець важкого ланцюга являє собою вкорочений С-кінець, який закінчується ФГ.

В одному аспекті із всіх аспектів, описаних у цьому документі, біспецифічне антитіло, що містить важкий ланцюг, що включає С-кінцевий домен CH3, як зазначено в цьому документі, містить С-кінцевий гліцин-лізиновий дипептид (G446 і K447, нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом). В одному варіанті здійснення всіх аспектів, як зазначено в цьому документі, біспецифічне антитіло, що містить важкий ланцюг, що включає С-кінцевий домен CH3, як зазначено в цьому документі, містить С-кінцевий залишок гліцину (G446, нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

Модифікації в Fab-доменах

В одному аспекті винахід відноситься до біспецифічного антитіла, що містить перший Fab-фрагмент, який специфічно зв'язується з PD1, і другий Fab-фрагмент, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому в одному з Fab-фрагментів здійснюють обмін або варіабельних доменів VH і VL, або константних доменів CH1 і CL. Біспецифічні антитіла отримують за технологією Crossmab.

Поліспецифічні антитіла з заміною/обміном доменів в одному зв'язуючому плечі (CrossMabVH-VL або CrossMabCH-CL) докладно описані в WO2009/080252, WO2009/080253 і Schaefer, W. et al., PNAS, 108 (2011) 11187-11191. Вони чітко зменшують побічні продукти, викликані невідповідністю легкого ланцюга проти першого антигена з неправильним важким ланцюгом проти другого антигена (в порівнянні з підходами без такого обміну доменами).

У конкретному аспекті винахід відноситься до біспецифічного антитіла, що містить перший Fab-фрагмент, який специфічно зв'язується з PD1, і другий Fab-фрагмент, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому в одному з Fab-фрагментів варіабельні домени VL і VH замінені кожен один на одного, так що домен VH є частиною легкого ланцюга, а домен VL є частиною важкого ланцюга. У конкретному аспекті біспецифічне антитіло являє собою антитіло, в якому в першому Fab-фрагменті, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, варіабельні домени VL і VH замінені один на одного.

В іншому аспекті і для подальшого покращення відповідного спарювання біспецифічне антитіло, що містить перший Fab-фрагмент, який специфічно зв'язується з PD1, і другий Fab-фрагмент, який специфічно зв'язується з LAG3, може містити різні заряджені амінокислотні заміни (так звані "заряджені залишки"). Ці модифікації вводяться в кросоверні або некросоверні домени CH1 і CL. Такі модифікації описані, наприклад, в WO 2015/150447, WO 2016/020309 і PCT/EP2016/073408.

У конкретному аспекті винахід відноситься до біспецифічного антитіла, що містить перший Fab-фрагмент, який специфічно зв'язується з PD1, і другий Fab-фрагмент, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому в одному з Fab-фрагментів в константному домені CL амінокислоту в положенні 124 незалежно заміщують на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом), а в константному домені CH1 амінокислоти в положеннях 147 і 213 незалежно заміщують глутаміновою кислотою (E) або аспарагіновою кислотою (D) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом). У конкретному аспекті біспецифічне антитіло являє собою антитіло, в якому в другому Fab-фрагменті, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з TIM3 константним доменом CL, амінокислоту в положенні 124 незалежно заміщують на лізин (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом), а в константному домені CH1 амінокислоти в положеннях 147 і 213 незалежно заміщують глутаміновою кислотою (E) або аспарагіновою кислотою (D) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

У конкретному аспекті винахід відноситься до біспецифічного антитіла, що містить перший Fab-фрагмент, який специфічно зв'язується з PD1, і другий Fab-фрагмент, який специфічно зв'язується з LAG3, при цьому в одному з доменів CL амінокислота в положенні 123 (нумерація EU) була замінена аргініном (R), а амінокислота в положенні 124 (нумерація EU) була замінена

на лізін (K), і в одному з доменів CH1 амінокислоти в положенні 147 (нумерація EU) і в положенні 213 (нумерація EU) були замінені глутаміною кислотою (E). У конкретному аспекті біспецифічне антитіло являє собою антитіло, в якому в другому Fab-фрагменті, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, амінокислота в положенні 123 (нумерація EU) була замінена аргініном (R), а амінокислота в положенні 124 (нумерація EU) була замінена на лізін (K), і в одному з доменів CH1 амінокислоти в положенні 147 (нумерація EU) і в положенні 213 (нумерація EC) були замінені глутаміною кислотою (E).

У додатковому аспекті біспецифічне антитіло являє собою двовалентне антитіло, що містить:

а) перший легкий ланцюг і перший важкий ланцюг антитіла, що специфічно зв'язується з першим антигеном, і

б) другий легкий ланцюг і другий важкий ланцюг антитіла, що специфічно зв'язується з другим антигеном, при цьому варіабельні домени VL і VH другого легкого ланцюга і другий важкий ланцюг замінені один на одного.

Антитіло згідно з а) не містить модифікацію, як описано згідно б), а важкий ланцюг і легкий ланцюг згідно з а) є ізольованими ланцюгами.

В антитілі згідно з б) в легкому ланцюзі варіабельний домен легкого ланцюга VL замінений варіабельним доменом важкого ланцюга VH зазначеного антитіла, а всередині важкого ланцюга варіабельний домен важкого ланцюга VH замінений варіабельним доменом легкого ланцюга VL зазначеного антитіла.

В одному аспекті (i) в константному домені CL першого легкого ланцюга згідно з а) амінокислоту в положенні 124 (нумерація за Кабатом) заміщують позитивно зарядженою амінокислотою і при цьому в константному домені CH1 першого важкого ланцюга згідно з а) амінокислоту в положенні 147 або амінокислоту в положенні 213 (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом) заміщують негативно зарядженою амінокислотою або (ii) в константному домені CL другого легкого ланцюга згідно з б) амінокислоту в положенні 124 (нумерація за Кабатом) заміщують позитивно зарядженою амінокислотою, і при цьому в константному домені CH1 другого важкого ланцюга згідно з б) амінокислоту в положенні 147 або амінокислоту в положенні 213 (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом) заміщують негативно зарядженою амінокислотою.

В іншому аспекті (i) в константному домені CL першого легкого ланцюга згідно з а) амінокислоту в положенні 124 незалежно заміщують на лізін (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація за Кабатом) (в одному кращому варіанті здійснення незалежно на лізін (K) або аргінін (R)), і при цьому в константному домені CH1 першого важкого ланцюга згідно з а) амінокислоту в положенні 147 або амінокислоту в положенні 213 незалежно заміщують глутаміною кислотою (E) або аспарагіною кислотою (D) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом) або (ii) в константному домені CL другого легкого ланцюга згідно з б) амінокислоту в положенні 124 незалежно заміщують на лізін (K), аргінін (R) або гістидин (H) (нумерація за Кабатом) (в одному кращому варіанті здійснення незалежно на лізін (K) або аргінін (R)) і при цьому в константному домені CH1 другого важкого ланцюга згідно з б) амінокислоту в положенні 147 або амінокислоту в положенні 213 незалежно заміщують глутаміною кислотою (E) або аспарагіною кислотою (D) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В одному аспекті в константному домені CL другого важкого ланцюга амінокислоти в положеннях 124 і 123 заміщують на K (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В одному аспекті в константному домені CL другого важкого ланцюга амінокислоту в положенні 123 заміщують на R, а амінокислоту в положенні 124 заміщують на K (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В одному аспекті в константному домені CH1 другого легкого ланцюга амінокислоти в положеннях 147 і 213 заміщують на E (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В одному аспекті в константному домені CL першого легкого ланцюга амінокислоти в положенні 124 і 123 заміщують на K, а в константному домені CH1 першого важкого ланцюга амінокислоти в положенні 147 і 213 заміщують на E (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В одному аспекті в константному домені CL першого легкого ланцюга амінокислоту в положенні 123 заміщують на R, а амінокислоту в положенні 124 заміщують на K, а в константному домені CH1 першого важкого ланцюга амінокислоти в обох положеннях 147 і 213 заміщують на E (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В одному аспекті в константному домені CL другого важкого ланцюга амінокислоти в положенні 124 і 123 заміщують на K, і при цьому в константному домені CH1 другого легкого

ланцюга амінокислоти в положенні 147 і 213 заміщують на Е, а у варіабельному домені VL першого легкого ланцюга амінокислоту в положенні 38 заміщують на К, у варіабельному домені VH першого важкого ланцюга амінокислоту в положенні 39 заміщують на Е, у варіабельному домені VL з другого важкого ланцюга амінокислоту в положенні 38 заміщують на К, а у варіабельному домені VH другого легкого ланцюга амінокислоту в положенні 39 заміщують на Е (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

В одному аспекті біспецифічне антитіло являє собою двовалентне антитіло, що містить:

а) перший легкий ланцюг і перший важкий ланцюг антитіла, що специфічно зв'язується з першим антигеном, і

б) другий легкий ланцюг і другий важкий ланцюг антитіла, що специфічно зв'язується з другим антигеном, при цьому варіабельні домени VL і VH другого легкого ланцюга і другого важкого ланцюга замінені один на одного, і при цьому константні домени CL і CH1 другого легкого ланцюга і другого важкого ланцюга замінені один на одного.

Антитіло згідно з а) не містить модифікації, як описано згідно з б), а важкий ланцюг і легкий ланцюг згідно з а) являють собою ізолювані ланцюги. У антитілі згідно з б) в легкому ланцюзі варіабельний домен легкого ланцюга VL замінений варіабельним доменом важкого ланцюга VH зазначеного антитіла, а константний домен легкого ланцюга CL замінений константним доменом важкого ланцюга CH1 зазначеного антитіла; і всередині важкого ланцюга варіабельний домен важкого ланцюга VH замінений варіабельним доменом легкого ланцюга VL зазначеного антитіла, а константний домен важкого ланцюга CH1 замінений константним доменом легкого ланцюга CL зазначеного антитіла.

В одному аспекті біспецифічне антитіло являє собою двовалентне антитіло, що містить:

а) перший легкий ланцюг і перший важкий ланцюг антитіла, що специфічно зв'язується з першим антигеном, і

б) другий легкий ланцюг і другий важкий ланцюг антитіла, що специфічно зв'язується з другим антигеном, при цьому константні домени CL і CH1 другого легкого ланцюга і другого важкого ланцюга замінені один на одного.

Антитіло згідно з а) не містить модифікацію, як описано згідно з б), а важкий ланцюг і легкий ланцюг згідно з а) є ізолюваними ланцюгами. У антитілі згідно з б) в легкому ланцюзі константний домен CL легкого ланцюга замінений константним доменом важкого ланцюга CH1 зазначеного антитіла; і всередині важкого ланцюга константний домен важкого ланцюга CH1 замінений константним доменом легкого ланцюга CL зазначеного антитіла.

В одному аспекті біспецифічне антитіло являє собою біспецифічне антитіло, що містить:

а) повнорозмірне антитіло, яке специфічно зв'язується з першим антигеном і складається з двох важких ланцюгів антитіла і двох легких ланцюгів антитіла, і

б) один, два, три або чотири одноланцюгових Fab-фрагмента, що специфічно зв'язуються з другим антигеном,

при цьому зазначені одноланцюгові Fab-фрагменти згідно з б) злиті з зазначеним повнорозмірним антитілом згідно з а) через пептидний лінкер на С- або N-кінці важкого або легкого ланцюга зазначеного повнорозмірного антитіла.

В одному аспекті один або два ідентичних одноланцюгових Fab-фрагмента, що зв'язуються з другим антигеном, злиті з повнорозмірним антитілом через пептидний лінкер на С-кінці важкого або легкого ланцюгів зазначеного повнорозмірного антитіла.

В одному аспекті один або два ідентичних одноланцюгових Fab (scFab)-фрагменти, що зв'язуються з другим антигеном, злиті з повнорозмірним антитілом через пептидний лінкер на С-кінці важкого ланцюга зазначеного повнорозмірного антитіла.

В одному аспекті один або два ідентичних одноланцюгових Fab (scFab) - фрагмента, що зв'язуються з другим антигеном, злиті з повнорозмірним антитілом через пептидний лінкер на С-кінці легкого ланцюга зазначеного повнорозмірного антитіла.

В одному аспекті два ідентичних одноланцюгових Fab (scFab)-фрагменти, що зв'язуються з другим антигеном, злиті з повнорозмірним антитілом через пептидний лінкер на С-кінці кожного важкого або легкого ланцюга зазначеного повнорозмірного антитіла.

В одному аспекті два ідентичних одноланцюгових Fab (scFab)-фрагменти, що зв'язуються з другим антигеном, злиті з повнорозмірним антитілом через пептидний лінкер на С-кінці кожного важкого ланцюга зазначеного повнорозмірного антитіла.

В одному аспекті два ідентичних одноланцюгових Fab (scFab)-фрагменти, що зв'язуються з другим антигеном, злиті з повнорозмірним антитілом через пептидний лінкер на С-кінці кожного легкого ланцюга зазначеного повнорозмірного антитіла.

В одному аспекті біспецифічне антитіло являє собою тривалентне антитіло, що містить:

а) повнорозмірне антитіло, що специфічно зв'язується з першим антигеном і складається з

двох важких ланцюгів антитіла і двох легких ланцюгів антитіла,

b) перший поліпептид, що складається з

ba) варіабельного домену важкого ланцюга антитіла (VH) або

5 bb) варіабельного домену важкого ланцюга антитіла (VH) і константного домену антитіла 1 (CH1),

при цьому вказаний перший поліпептид злитий з N-кінцем його VH-домену через пептидний лінкер C-кінця одного з двох важких ланцюгів зазначеного повнорозмірного антитіла,

c) другий поліпептид, що складається з

ca) варіабельного домену легкого ланцюга антитіла (VL) або

10 cb) варіабельного домену легкого ланцюга (VL) антитіла і константного домену легкого ланцюга (CL) антитіла,

при цьому вказаний другий поліпептид злитий з N-кінцем домену VL через пептидний лінкер C-кінця іншого з двох важких ланцюгів зазначеного повнорозмірного антитіла, і

15 при цьому варіабельний домен важкого ланцюга (VH) антитіла першого поліпептиду і варіабельний домен легкого ланцюга антитіла (VL) другого поліпептиду разом утворюють антигензв'язуючий домен, що специфічно зв'язується з другим антигеном.

В одному аспекті варіабельний домен важкого ланцюга антитіла (VH) поліпептиду згідно з b) і варіабельний домен легкого ланцюга антитіла (VL) поліпептиду згідно з c) зв'язані і стабілізовані за допомогою міжланцюгового дисульфідного містка шляхом введення 20 дисульфідного зв'язку між наступними положеннями:

(i) від положення 44 варіабельного домену важкого ланцюга до положення 100 варіабельного домену легкого ланцюга, або

(ii) від положення 105 варіабельного домену важкого ланцюга до положення 43 варіабельного домену легкого ланцюга, або

25 (iii) від положення 101 варіабельного домену важкого ланцюга до положення 100 варіабельного домену легкого ланцюга (нумерація завжди відповідно до індексу EU за Кабатом).

Способи введення неприродних дисульфідних містків для стабілізації описані, наприклад, в WO 94/029350, Rajagopal, V., et al., Prot. Eng. (1997) 1453-1459; Kobayashi, H., et al., Nucl. Med. Biol. 25 (1998) 387-393; і Schmidt, M., et al., Oncogene 18 (1999) 1711-1721. В одному варіанті здійснення необов'язковий дисульфідний зв'язок між варіабельними доменами поліпептидів в положеннях b) і c) знаходиться між положенням 44 варіабельного домену важкого ланцюга і положенням 100 варіабельного домену легкого ланцюга. В одному варіанті здійснення необов'язковий дисульфідний зв'язок між варіабельними доменами поліпептидів в положеннях 35 b) і c) знаходиться між положенням 105 варіабельного домену важкого ланцюга і положенням 43 варіабельного домену легкого ланцюга (нумерація завжди відповідно до індексу EU за Кабатом). В одному варіанті здійснення кращим є тривалентне біспецифічне антитіло без зазначеної необов'язкової дисульфідної стабілізації між варіабельними доменами VH і VL одноланцюгових Fab-фрагментів.

40 В одному аспекті біспецифічне антитіло являє собою триспецифічне або тетраспецифічне антитіло, що містить:

a) перший легкий ланцюг і перший важкий ланцюг повнорозмірного антитіла, що специфічно зв'язується з першим антигеном, і

45 b) другий (модифікований) легкий ланцюг і другий (модифікований) важкий ланцюг повнорозмірного антитіла, що специфічно зв'язується з другим антигеном, при цьому варіабельні домени VL і VH замінені один на одного, і/або при цьому константні домени CL і CH1 замінені один на одного, і

50 c) при цьому від одного до чотирьох антигензв'язуючих доменів, що специфічно зв'язуються з одним або двома додатковими антигенами (тобто з третім і/або четвертим антигеном), злиті через пептидний лінкер з C-або N-кінцем легких ланцюгів або важких ланцюгів a) і/або b).

Антитіло згідно з a) не містить модифікації, як описано згідно з b), а важкий ланцюг і легкий ланцюг згідно з a) являють собою ізольовані ланцюги.

55 В одному аспекті триспецифічне або тетраспецифічне антитіло містить згідно з c) один або два антигензв'язуючих домени, які специфічно зв'язуються з одним або двома додатковими антигенами.

В одному аспекті антигензв'язуючі домени обирають з групи scFv-фрагмента і scFab-фрагмента.

В одному аспекті антигензв'язуючі домени являють собою scFv-фрагменти.

В одному аспекті антигензв'язуючі домени являють собою scFab-фрагменти.

60 В одному аспекті антигензв'язуючі домени злиті з C-кінцем важких ланцюгів a) і/або b).

В одному аспекті триспецифічне або тетраспецифічне антитіло містить згідно з с) один або два антигензв'язуючих домени, що специфічно зв'язуються з одним додатковим антигеном.

В одному аспекті триспецифічне або тетраспецифічне антитіло містить згідно з с) два ідентичних антигензв'язуючих домени, що специфічно зв'язуються з третім антигеном. В одному кращому варіанті здійснення такі два ідентичних антигензв'язуючих домени злиті обидва через один і той самий пептидний лінкер з С-кінцем важких ланцюгів а) і b). В одному кращому варіанті здійснення два ідентичних антигензв'язуючих домени являють собою або scFv-фрагмент, або scFab-фрагмент.

В одному аспекті триспецифічне або тетраспецифічне антитіло містить згідно з с) два антигензв'язуючих домени, що специфічно зв'язуються з третім і четвертим антигеном. В одному варіанті здійснення зазначені два антигензв'язуючих домени злиті через один і той самий пептидний елемент з'єднання з С-кінцем важких ланцюгів а) і b). В одному кращому варіанті здійснення зазначені два антигензв'язуючих домени являють собою або scFv-фрагмент, або scFab-фрагмент.

В одному аспекті біспецифічне антитіло являє собою біспецифічне, чотиривалентне антитіло, що містить:

а) два легких ланцюга і два важких ланцюга антитіла, що специфічно зв'язуються з першим антигеном (і містять два Fab-фрагменти),

б) два додаткових Fab-фрагмента антитіла, що специфічно зв'язуються з другим антигеном, при цьому зазначені додаткові Fab-фрагменти злиті як через пептидний лінкер, так і з С-або N-кінцем важких ланцюгів а), і

при цьому в Fab-фрагментах були виконані наступні модифікації

(i) в обох Fab-фрагментах а) або в обох Fab-фрагментах б) варіабельні домени VL і VH замінені один на одного, і/або константні домени CL і CH1 замінені один на одного, або

(ii) в обох Fab-фрагментах а) варіабельні домени VL і VH замінені один на одного, а константні домени CL і CH1 замінені один на одного, і в обох Fab-фрагментах б) варіабельні домени VL і VH замінені один на одного, або константні домени CL і CH1 замінені один на одного, або

(iii) в обох Fab-фрагментах а) варіабельні домени VL і VH замінені один на одного, або константні домени CL і CH1 замінені один на одного, і в обох Fab-фрагментах б) варіабельні домени VL і VH замінені один на одного, а константні домени CL і CH1 замінені один на одного, або

(iv) в обох Fab-фрагментах а) варіабельні домени VL і VH замінені один на одного, і в обох Fab-фрагментах б) константні домени CL і CH1 замінені один на одного, або

(v) в обох Fab-фрагментах а) константні домени CL і CH1 замінені один на одного, і в обох Fab-фрагментах б) варіабельні домени VL і VH замінені один на одного.

В одному аспекті зазначені додаткові Fab-фрагменти злиті в рівному ступені через пептидний лінкер, або з С-кінцем важких ланцюгів а), або з N-кінцем важких ланцюгів а).

В одному аспекті зазначені додаткові Fab-фрагменти злиті як через пептидний лінкер, так і з С-кінцем важких ланцюгів а).

В одному аспекті зазначені додаткові Fab-фрагменти злиті через пептидний лінкер з N-кінцем важких ланцюгів а).

В одному аспекті в Fab-фрагментах здійснюються такі модифікації: в обох Fab-фрагментах а) або в обох Fab-фрагментах б) варіабельні домени VL і VH заміняють один на одного, і/або константні домени CL і CH1 замінені один на одного.

В одному аспекті біспецифічне антитіло являє собою чотиривалентне антитіло, що містить:

а) (модифікований) важкий ланцюг першого антитіла, що специфічно зв'язується з першим антигеном і містить першу пару доменів VH-CH1, при цьому С-кінець зазначеного важкого ланцюга, N-кінець другої пари доменів VH-CH1 зазначеного першого антитіла злиті через пептидний лінкер,

б) два легких ланцюга зазначеного першого антитіла а),

с) (модифікований) важкий ланцюг другого антитіла, що специфічно зв'язується з другим антигеном і містить першу пару доменів VH-CL, при цьому С-кінець зазначеного важкого ланцюга, N-кінець другої пари доменів VH-CL зазначеного другого антитіла злиті через пептидний лінкер, і

д) два (модифікованих) легких ланцюга зазначеного другого антитіла с), кожен з яких містить пару доменів CL-CH1.

В одному аспекті біспецифічне антитіло містить:

а) важкий ланцюг і легкий ланцюг першого повнорозмірного антитіла, що специфічно зв'язується з першим антигеном, і

б) важкий ланцюг і легкий ланцюг другого повнорозмірного антитіла, що специфічно зв'язується з другим антигеном, при цьому N-кінець важкого ланцюга з'єднаний з С-кінцем легкого ланцюга через пептидний лінкер.

Антитіло згідно з а) не містить модифікації, як описано в б), а важкий ланцюг і легкий ланцюг являють собою ізольовані ланцюги.

В одному аспекті біспецифічне антитіло містить

а) повнорозмірне антитіло, яке специфічно зв'язується з першим антигеном і складається з двох важких ланцюгів антитіла і двох легких ланцюгів антитіла, і

б) Fv-фрагмент, що специфічно зв'язується з другим антигеном, що містить домен VH2 і домен VL2, при цьому обидва домени зв'язані один з одним через дисульфідний місток, де тільки або домен VH2, або домен VL2 злиті через пептидний лінкер з важким або легким ланцюгом повнорозмірного антитіла, що специфічно зв'язується з першим антигеном.

У біспецифічному антитілі важкі ланцюги і легкі ланцюги згідно з а) являють собою ізольовані ланцюги.

В одному аспекті другий домен VH2 або домен VL2 не злитий через пептидний лінкер з важким або легким ланцюгом повнорозмірного антитіла, що специфічно зв'язується з першим антигеном.

У всіх аспектах, як зазначено в цьому документі, перший легкий ланцюг містить домен VL і домен CL, а перший важкий ланцюг містить домен VH, домен CH1, шарнірну область, домен CH2 і домен CH3.

В одному аспекті біспецифічне антитіло являє собою тривалентне антитіло, що містить:

а) два Fab-фрагменти, що специфічно зв'язуються з першим антигеном,

б) один кросоверний Fab-фрагмент, який специфічно зв'язується з другим антигеном, в якому CH1 і домен CL замінені один на одного,

с) одну Fc-область, що містить перший важкий ланцюг Fc-області і другий важкий ланцюг другої Fc-області,

при цьому С-кінець доменів CH1 двох Fab-фрагментів зв'язаний з N-кінцем поліпептидів Fc-області важкого ланцюга, і де С-кінець домену CL кросоверного Fab-фрагмента зв'язаний з N-кінцем домену VH одного з фрагментів.

В одному аспекті біспецифічне антитіло являє собою тривалентне антитіло, що містить:

а) два Fab-фрагменти, що специфічно зв'язуються з першим антигеном,

б) один кросоверний Fab-фрагмент, який специфічно зв'язується з другим антигеном, в якому здійснено обмін CH1 і домена CL один на одного,

с) одну Fc-область, що містить перший важкий ланцюг Fc-області і другий важкий ланцюг другої Fc-області,

при цьому С-кінець домену CH1 першого Fab-фрагмента зв'язаний з N-кінцем одного з поліпептидів Fc-області важкого ланцюга, а С-кінець CL-домену кросоверного Fab-фрагмента зв'язаний з N-кінцем іншого поліпептиду Fc-області важкого ланцюга, і де С-кінець домену CH1 другого Fab-фрагмента зв'язаний з N-кінцем домену VH першого Fab-фрагмента або з N-кінцем VH домену кросоверного Fab-фрагмента.

В одному аспекті біспецифічне антитіло містить:

а) повнорозмірне антитіло, яке специфічно зв'язується з першим антигеном і складається з двох важких ланцюгів антитіла і двох легких ланцюгів антитіла, і

б) Fab-фрагмент, який специфічно зв'язується з другим антигеном, що містить домен VH2 і домен VL2, що містить фрагмент важкого ланцюга та фрагмент легкого ланцюга, при цьому всередині фрагмента легкого ланцюга варіабельний домен легкого ланцюга VL2 замінений варіабельним доменом важкого ланцюга VH2 зазначеного антитіла, і всередині фрагмента важкого ланцюга варіабельний домен важкого ланцюга VH2 замінений варіабельним доменом легкого ланцюга VL2 зазначеного антитіла

при цьому Fab-фрагмент важкого ланцюга вставлений між доменом CH1 одного з важких ланцюгів повнорозмірного антитіла і відповідної Fc-областю повнорозмірного антитіла, а N-кінець Fab-фрагмента легкого ланцюга кон'югований з С-кінцем легкого ланцюга повнорозмірного антитіла, який зв'язаний з важким ланцюгом повнорозмірного антитіла, в яку вставлений Fab-фрагмент важкого ланцюга.

В одному аспекті біспецифічне антитіло містить:

а) повнорозмірне антитіло, яке специфічно зв'язується з першим антигеном і складається з двох важких ланцюгів антитіла і двох легких ланцюгів антитіла, і

б) Fab-фрагмент, який специфічно зв'язується з другим антигеном, що містить домен VH2 і домен VL2, що містить фрагмент важкого ланцюга і фрагмент легкого ланцюга, при цьому всередині фрагмента легкого ланцюга варіабельний домен легкого ланцюга VL2 замінений

варіабельним доменом важкого ланцюга VH2 зазначеного антитіла, і всередині фрагмента важкого ланцюга варіабельний домен важкого ланцюга VH2 замінений варіабельним доменом легкого ланцюга VL2 зазначеного антитіла, і при цьому С-кінець фрагмента важкого ланцюга Fab-фрагмента кон'югований з N-кінцем одного з важких ланцюгів повнорозмірного антитіла та С-кінець фрагмента легкого ланцюга Fab-фрагмента кон'югований з N-кінцем легкого ланцюга повнорозмірного антитіла, яке об'єднують з важким ланцюгом повнорозмірного антитіла, з яким кон'югований фрагмент важкого ланцюга Fab-фрагмента.

Полінуклеотиди

Винахід, крім того, відноситься до виділених полінуклеотидів, які кодують біспецифічне антитіло, як описано в цьому документі, або його фрагмент.

Термін "молекула нуклеїнової кислоти" або "полінуклеотид" включає будь-яке з'єднання та/або речовину, яка містить полімер нуклеотидів. Кожен нуклеотид складається з основи, зокрема пуринової або піримідинової основи (тобто цитозину (C), гуаніну (G), аденіну (A), тиміну (T) або урацилу (U)), цукру (тобто дезоксирибози або рибози) і фосфатної групи. Часто молекула нуклеїнової кислоти описується послідовністю основ, причому зазначені основи являють собою первинну структуру (лінійну структуру) молекули нуклеїнової кислоти. Послідовність основ зазвичай представлена від 5' до 3'. У цьому документі, термін молекула нуклеїнової кислоти охоплює дезоксирибонуклеїнову кислоту (ДНК), включаючи, наприклад, комплементарну ДНК (кДНК) і геномну ДНК, рибонуклеїнову кислоту (РНК), зокрема, матричну РНК (мРНК), синтетичні форми ДНК або РНК і змішані полімери, що містять дві або більше цих молекул. Молекула нуклеїнової кислоти може бути лінійною або кільцевою. Крім того, термін молекула нуклеїнової кислоти включає як смислові, так і антисмислові ланцюги, а також одностанцюгові та двостанцюгові форми. Крім того, описана в цьому документі молекула нуклеїнової кислоти може містити природні або неприродні нуклеотиди. Приклади природних нуклеотидів включають модифіковані нуклеотидні основи з дериватизованими цукрами або фосфатними основними ланцюгами або хімічно модифікованими залишками. Молекули нуклеїнової кислоти також включають молекули ДНК і РНК, які підходять в якості вектора для прямої експресії антитіла *in vitro* за винаходом та/або *in vivo*, наприклад, у хазяїна або пацієнта. Такі вектори ДНК (наприклад, кДНК) або РНК (наприклад, мРНК) можуть бути немодифікованими або модифікованими. Наприклад, мРНК може бути хімічно модифікована для підвищення стабільності вектора РНК та/або експресії кодованої молекули так, щоб мРНК можна було ввести суб'єкту для вироблення антитіла *in vivo* (див., наприклад, Stadler et al, Nature Medicine 2017, опубліковано в мережі 12 червня 2017 м, doi: 10.1038/nm.4356 або EP 2101823 B1).

"Виділений" полінуклеотид відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, яка була виділена з компонента її природного середовища. Виділений полінуклеотид включає молекулу нуклеїнової кислоти, що міститься в клітинах, які зазвичай містять молекулу нуклеїнової кислоти, але молекула нуклеїнової кислоти присутня позахромосомно або в місці локалізації хромосом, яке відрізняється від її природного хромосомного розташування.

Виділені полінуклеотиди, що кодують біспецифічні антитіла за винаходом, можуть бути експресовані у вигляді одного полінуклеотиду, який кодує всю антигензв'язуючу молекулу, або у вигляді безлічі (наприклад, двох або більше) полінуклеотидів, які спільно експресуються. Поліпептиди, що кодуються полінуклеотидами, які спільно експресуються, можуть зв'язуватися, наприклад, через дисульфідні зв'язки або іншими способами, з утворенням функціональної антигензв'язуючої молекули. Наприклад, частина легкого ланцюга імуноглобуліну може кодуватися окремим полінуклеотидом з частини важкого ланцюга імуноглобуліну. При спільній експресії, поліпептиди важкого ланцюга будуть зв'язуватися з поліпептидами легкого ланцюга з утворенням імуноглобуліну.

У деяких аспектах виділений полінуклеотид кодує поліпептид, що міститься в біспецифічному антитілі за винаходом, як описано в цьому документі.

В одному аспекті цей винахід відноситься до виділених полінуклеотидів, які кодують біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з білком запрограмованої смерті клітини 1 (PD1), і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з геном активації лімфоцитів-3 (LAG3), при цьому вказаний перший антигензв'язуючий домен, специфічно зв'язується з PD1, містить домен VH, що містить (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1, (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; і домен VL, що містить (i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4; (ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, і (iii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6.

В. Рекомбінантні способи

Антитіла можуть бути отримані з використанням рекомбінантних способів і композицій, наприклад, як описано в патенті США 4816567. Для цих способів запропонована одна або більше виділених нуклеїнових кислот, що кодують антитіло.

У разі нативного антитіла або фрагмента нативного антитіла потрібні дві нуклеїнові кислоти, одна для легкого ланцюга або його фрагмента і одна для важкого ланцюга або його фрагмента. Така (i) нуклеїнова (i) кислота(и) кодує (ють) амінокислотну послідовність, яка містить VL, та/або амінокислотну послідовність, яка містить VH антитіла (наприклад, легкий та/або важкий ланцюг(и) антитіла). Ці нуклеїнові кислоти можуть перебувати в одному і тому ж векторі експресії або в різних векторах експресії. У разі деяких біспецифічних антитіл з гетеродимерними важкими ланцюгами потрібні чотири нуклеїнові кислоти, одна для першого легкого ланцюга, одна для першого важкого ланцюга, що містить перший гетеромономерний поліпептид Fc-області, одна для другого легкого ланцюга і одна для другого важкого ланцюга, що містить другий гетеромономерний поліпептид Fc-області. Чотири нуклеїнові кислоти можуть міститися в одній або більше молекул нуклеїнових кислот або векторах експресії. Наприклад, така (i) нуклеїнова кислота(и) кодує (ють) амінокислотну послідовність, що містить перший VL, та/або амінокислотну послідовність, яка містить перший VH, включаючи першу гетеромономерну Fc-область, та/або амінокислотну послідовність, яка містить другий VL та/або амінокислотну послідовність, яка містить другий VH, що містить другу гетеромономерну Fc-область антитіла (наприклад, перший та/або другий легкі та/або перший та/або другий важкі ланцюги антитіла). Ці нуклеїнові кислоти можуть перебувати в одному і тому ж векторі експресії або в різних векторах експресії, зазвичай ці нуклеїнові кислоти розташовані в двох або трьох векторах експресії, тобто один вектор може містити більше однієї з цих нуклеїнових кислот. Прикладами цих біспецифічних антитіл є CrossMab і біспецифічні Т-клітини (див., наприклад, Schaefer, W. et al., PNAS, 108 (2011) 11187-11191). Наприклад, один з гетеромономерних важких ланцюгів містить так звані "мутації виступу" (T366W і, необов'язково, одну з S354C або Y349C), а інший містить так звані "мутації отвору" (T366S, L368A і Y407V і необов'язково Y349C або S354C) (див., наприклад, Carter, P. et al., Immunotechnol. 2 (1996) 73).

В одному аспекті запропонована виділена нуклеїнова кислота, що кодує біспецифічне антитіло, яке описане в цьому документі. Така нуклеїнова кислота може кодувати амінокислотну послідовність, яка містить VL та/або амінокислотну послідовність, яка містить VH антигензв'язуючих доменів, які специфічно зв'язуються з PD1 і LAG3 відповідно (наприклад, у легкому та/або важкому ланцюгах антитіла). У додатковому аспекті запропоновано один або більше векторів (наприклад, векторів експресії), що містять таку нуклеїнову кислоту. У додатковому аспекті запропонована клітина-хазяїн, що містить таку нуклеїнову кислоту. В одному такому аспекті клітина-хазяїн містить (наприклад, була трансформована): (1) перший вектор, що містить першу пару нуклеїнових кислот, які кодують амінокислотні послідовності, одна з яких містить перший VL, а інша містить перший VH антитіла, і другий вектор, що містить другу пару нуклеїнових кислот, які кодують амінокислотні послідовності, одна з яких містить другий VL, а інша містить другий VH антитіла, або (2) перший вектор, що містить першу нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, яка містить один з варіабельних доменів (переважно варіабельний домен легкого ланцюга), другий вектор, що містить пару нуклеїнових кислот, які кодують амінокислотні послідовності, одна з яких містить варіабельний домен легкого ланцюга, а інша містить перший варіабельний домен важкого ланцюга, і третій вектор, що містить пару нуклеїнових кислот, які кодують амінокислотну послідовність, одна з яких містить відповідний інший варіабельний домен легкого ланцюга, як у другому векторі, а інша містить другий варіабельний домен важкого ланцюга, або (3) перший вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що містить перший VL антитіла, другий вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що містить перший VH антитіла, третій вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що містить другий VL антитіла, і четвертий вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що містить другий VH антитіла. В одному аспекті клітина-хазяїн являє собою еукаріотичну, наприклад, клітина яєчника китайського хом'ячка (CHO) або лімфоїдну клітину (наприклад, клітину Y0, NS0, Sp20). В одному аспекті запропоновано спосіб отримання біспецифічного антитіла, при чому спосіб включає культивування клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло, як зазначено вище, в умовах, що підходять для експресії антитіла, і, можливо, видалення антитіла з клітини-хазяїна (або середовища для культивування клітин-хазяїв).

Для рекомбінантної продукції біспецифічних антитіл, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно

зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, нуклеїнову кислоту, що кодує біспецифічні антитіла, наприклад, як описано вище, виділяють і вставляють в один або більше векторів для подальшого клонування та/або експресії в клітині-хазяїні. Така нуклеїнова кислота може бути легко виділена та секвенована з використанням звичайних процедур (наприклад, з використанням олігонуклеотидних зондів, які здатні специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкі та легкі ланцюги антитіла).

Відповідні клітини-хазяї для клонування або експресії кодуючих антитіла векторів включають прокариотичні або еукаріотичні клітини, які описані в цьому документі. Наприклад, антитіла можна продукувати в бактеріях, зокрема, якщо глікозилювання та Fc-ефекторні функції не є необхідними. Для експресії фрагментів антитіл і поліпептидів у бактеріях див., наприклад, патенти США 5648237, 5789199 і 5840523. (Див. також Charlton, K.A., In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, де описана експресія фрагментів антитіл в *E. coli*) Після експресії антитіло може бути виділено з маси бактеріальних клітин у розчинній фракції і може бути додатково очищено. На додаток до прокариотів, придатних для клонування або експресії векторів, що кодують антитіло, є еукаріотичні мікроорганізми, наприклад, міцеліальні гриби або дріжджі, у тому числі штами грибів і дріжджів з "гуманізованими" шляхами глікозилювання, що призводить до продукції антитіла з профілем глікозилювання, частково або повністю характерним для людини.

Див. Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414; і Li, H. et al., *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215.

Придатні для експресії глікозилюваних антитіл клітини-хазяї також походять від багатоклітинних організмів (безхребетних і хребетних). Приклади клітин безхребетних включають клітини рослин і комах. Виявлені численні штами бакуловірусів, які можна використовувати у комбінації з клітинами комах, особливо для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*.

Культури клітин рослин також можуть бути використані в якості хазяїв. Див., наприклад, патенти США № 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 і 6417429 (опис технології PLANTIBODIESTM для отримання антитіл у трансгенних рослинах).

Клітини хребетних також можуть бути використані в якості хазяїв. Наприклад, можна використовувати лінії клітин ссавців, які адаптовані для росту в суспензії. Інші приклади відповідних клітинних ліній ссавців-хазяїв являють собою лінію нирки мавпи CV1, трансформовану SV40 (COS-7); лінію ембріональних клітин людської нирки (293 або 293 клітини, як описано, наприклад, у Graham et al., *J. Gen Virol.* 36 (1977) 59-74); клітини нирки новонародженого хом'яка (BHK); клітини Сертолі миші (клітини TM4, як описано, наприклад, в Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-252); клітини нирки мавпи (CV1); клітини нирки африканської зеленої мавпи (VERO-76); клітини карциноми шийки матки людини (HELA); клітини нирки собаки (MDCK); клітини печінки щура Buffalo (BRL 3A); клітини легенів людини (W138); клітини печінки людини (Hep G2); клітини пухлини молочної залози миші (MMT 060562); клітини TRI, як описано, наприклад, в Mather, J.P. et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68; клітини MRC 5; і клітини FS4. Інші відповідні лінії клітин ссавців включають клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), включаючи клітини DHFR-CHO (Urlaub, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4216-4220); і клітинні лінії мієломи, такі як Y0, NS0 і Sp2/0. Огляд деяких ліній клітин-хазяїв ссавців, придатних для отримання антитіл, див., наприклад, Yazaki, P. and Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

С. Аналізи

Біспецифічні антитіла, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, запропоновані в цьому документі, можуть бути ідентифіковані, піддані скринінгу або охарактеризовані на предмет їхніх фізичних/хімічних властивостей та/або біологічних активностей за допомогою різних аналізів, відомих у цій галузі техніки.

1. Аналізи афінності

Афінність біспецифічних антигензв'язуючих молекул, антитіл і фрагментів антитіл, запропонованих у цьому документі, до відповідних антигенів може бути визначена відповідно до способів, описаних у Прикладах, за допомогою поверхневого плазмонного резонансу (ППР) з використанням стандартних приладів, таких як прилад Biacore® (GE Healthcare), і рецептори або такі цільові білки можуть бути отримані шляхом рекомбінантної експресії. Конкретний ілюстративний і типовий варіант прикладу здійснення для вимірювання афінності зв'язування описаний в Прикладах 2, 8 або 11. Відповідно до одного аспекту, K_D вимірюють за допомогою поверхневого плазмонного резонансу з використанням приладу BIACORE® T100 (GE

Healthcare) при 25 °C.

2. Аналізи зв'язування та інші аналізи

В одному аспекті біспецифічні антитіла за винаходом тестують на їхню антигензв'язуючу активність, наприклад, за допомогою відомих способів, таких як ІФА, вестерн-блот тощо

5 Зв'язування біспецифічних антитіл, представлених у цьому документі, з відповідним рекомбінантним антигеном або антигенекспресуючими клітинами може бути оцінено за допомогою ІФА, як описано в Прикладах 8 або 11.

У додатковому аспекті свіжі моноклеарні клітини периферичної крові (МКПК) використовують в аналізах зв'язування щоб продемонструвати зв'язування з різними моноклеарними клітинами периферичної крові (МКПК), такими як моноцити, NK-клітини і Т-клітини.

10

В іншому аспекті клітинний димеризаційний аналіз використовували для демонстрації димеризації або в результаті зв'язування/взаємодії двох різних рецепторів PD1 і LAG3, які злиті в цитоплазмі з двома фрагментами ферменту, при лігуванні або зшиванні з біспецифічним

15 антитілом проти обох мішеней. Таким чином, тільки один рецептор не проявляє ферментативну активність. Для цієї специфічної взаємодії цитозольні С-кінці обох рецепторів окремо були злиті з гетерологічними субодинами репортерного ферменту. Одна тільки субодина ферменту не проявляла репортерну активність. Однак очікувалося, що одночасне зв'язування з обома рецепторами призведе до локального цитозольного накопичення обох рецепторів,

20 комплементу двох субодина гетерологічного ферменту і, нарешті, до утворення специфічного і функціонального ферменту, який гідролізує субстрат, тим самим генеруючи хемілюмінесцентний сигнал (Приклад 11).

3. Аналізи активності

В одному аспекті запропоновані аналізи для ідентифікації біспецифічного антитіла, що

25 містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, що має біологічну активність. Біологічна активність може включати, наприклад, здатність посилювати активацію та/або проліферацію різних імунних клітин, особливо Т-клітин, секрецію імуномодуючих цитокінів, таких як ІФН-γ або ІФН-альфа, блокування шляху PD1, блокування шляху LAG3, знищення

30 пухлинних клітин. Запропоновані антитіла, що також мають таку біологічну активність in vivo та/або in vitro.

У певних аспектах антитіло за винаходом тестують на таку біологічну активність. В одному аспекті запропоновано аналіз імунних клітин, який вимірює активацію лімфоцитів від одного індивідуума (донор Х) до лімфоцитів від іншого індивідуума (донор Y). Реакція змішаної

35 культури лімфоцитів (РЗКЛ) може демонструвати ефект блокування шляху PD1 до ефекторних клітин лімфоцитів. Т-клітини в аналізі тестували на активацію та їхню секрецію ІФН-гамма в присутності або відсутності біспецифічних антитіл за винаходом. Аналіз більш докладно описаний в Прикладі 9.

Д. Імунокон'югати

У винаході також запропоновано імунокон'югати, що містять біспецифічне антитіло за винаходом, яке кон'юговане з одним або більше цитотоксичними агентами, такими як

40 хіміотерапевтичні агенти або лікарські засоби, агенти, які інгібують ріст, токсини (наприклад, білкові токсини, ферментативно активні токсини бактерій, грибків, рослин або тварин або їхні фрагменти) або радіоактивні ізотопи.

Е. Способи і композиції для діагностики та виявлення

У певних аспектах будь-яке з біспецифічних антитіл, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, що представлено в цьому документі, може бути корисним для виявлення в біологічному зразку присутності як PD1, так і LAG3. Використаний в цьому документі термін

50 "виявлення" охоплює кількісне або якісне виявлення. В окремих випадках здійснення біологічний зразок містить клітину або тканину, таку як стовбурові ракові клітини ГМЛ (гострого мієлоїдного лейкозу).

В одному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло для застосування в способі діагностики або виявлення. У додатковому аспекті запропоновано спосіб виявлення присутності

55 в біологічному зразку як PD1, так і LAG3. У деяких варіантах здійснення спосіб включає приведення в контакт біологічного зразка з біспецифічним антитілом, як описано в цьому документі, в умовах, що допускають зв'язування біспецифічного антитіла як з PD1, так і з LAG3, і виявлення того, чи утворюється комплекс між біспецифічним антитілом і обома антигенами. Такий спосіб може являти собою спосіб in vitro або in vivo. В одному варіанті здійснення

60 біспецифічне антитіло використовується для відбору суб'єктів, які підходять для терапії

біспецифічним антитілом, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з антитілом до LAG3, причому, наприклад, PD1 і LAG3 являють собою біомаркери для відбору пацієнтів.

У певних аспектах запропоновані мічені біспецифічні антитіла. Мітки включають, але не обмежуються ними, мітки або фрагменти, які виявляються прямим способом (наприклад, флуоресцентні, хромофорні, електронно-щільні, хемілюмінесцентні та радіоактивні мітки), а також фрагменти, такі як ферменти або ліганди, які виявляються непрямим способом, наприклад, за допомогою ферментативної реакції або молекулярних взаємодій. Типові мітки включають радіоізотопи ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H та ^{131}I , флуорофори, такі як хелати рідкоземельних елементів або флуоресцеїн та його похідні, родамін та його похідні, дансил, умбеліферон, люциферази, наприклад, люциферазу світляка та бактеріальну люциферазу (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигідрофталазиндіони, пероксидазу хрому (ПХ), лужну фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамілазу, лізоцим, оксидази вуглеводів, наприклад, глюкозооксидазу, галактозооксидазу і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу, оксидази гетероциклічних сполук, такі як уриказа та ксантиноксидаза, в поєднанні з ферментом, який використовує перекис водню для окислення попередника забарвлювача, наприклад, ПХ, лактопероксидазу або мікропероксидазу, біотин/авідин, спінові мітки, мітки-бактеріофаги, стабільні вільні радикали.

Г. Фармацевтичні композиції, склади та шляхи введення

У додатковому аспекті винахід відноситься до фармацевтичних композицій, які містять будь-яке з біспецифічних антитіл, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, яка запропонована в цьому документі, наприклад, для застосування по кожному з нижченаведених терапевтичних способів. В одному варіанті здійснення фармацевтична композиція містить будь-яке з біспецифічних антитіл, які запропоновані в цьому документі, і щонайменше один фармацевтично прийнятний наповнювач. В іншому варіанті здійснення фармацевтична композиція містить будь-яке з біспецифічних антитіл, які запропоновані в цьому документі, і щонайменше один додатковий терапевтичний агент, наприклад, як описано нижче.

Фармацевтичні композиції за цим винаходом містять терапевтично ефективну кількість одного або більше біспецифічних антитіл, розчинених або диспергованих у фармацевтично прийнятному наповнювачі. Фрази "фармацевтичні або фармакологічно прийнятний" відносяться до молекулярних речовин і композицій, які зазвичай нетоксичні для реципієнтів у використовуваних дозах і концентраціях, тобто не викликають небажаних алергічних або інших несприятливих реакцій при введенні тварині, такий як, наприклад, людина, в залежності від обставин. Приготування фармацевтичної композиції, яка містить щонайменше одне біспецифічне антитіло і, необов'язково, додатковий активний інгредієнт, буде відомо фахівцям в цій галузії техніки в контексті цього відкриття, прикладом якого є Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, що включено в цей документ за допомогою посилання. Зокрема, композиції являють собою ліофілізовані склади або водні розчини. Використовуваний в цьому документі термін "фармацевтично прийнятний наповнювач" включає всі без винятку розчинники, буфери, дисперсійні середовища, що покривають речовини, поверхнево-активні речовини, антиоксиданти, консерванти (наприклад, антибактеріальні агенти, протигрибкові агенти), ізотонічні агенти, солі, стабілізатори та їхні комбінації, як відомо фахівцям у цій галузії техніки.

Парентеральні композиції включають композиції, призначені для введення шляхом ін'єкції, наприклад, підшкірної, внутрішньошкірної, внутрішньовогнищевої, внутрішньовенної, внутрішньоартеріальної, внутрішньом'язової, інтратекальної або внутрішньочеревної ін'єкції. Для ін'єкції біспецифічні антитіла за винаходом можуть бути приготовлені у формі водних розчинів, переважно у фізіологічно сумісних буферах, таких як розчин Хенкса, розчин Рінгера або фізіологічний сольовий буфер. Розчин може містити рецептурні агенти, такі як суспендуючі, стабілізуючі та/або диспергуючі агенти. Альтернативно, біспецифічні антитіла можуть бути у формі порошку, призначеного для розведення перед застосуванням відповідним носієм, наприклад, стерильною апірогенною водою. Стерильні розчини для ін'єкцій одержують шляхом включення злитих білків за винаходом у необхідній кількості у відповідному розчиннику з різними іншими компонентами, що вказані нижче, за необхідності. Стерильність може бути легко досягнута, наприклад, за допомогою фільтрації через стерильні фільтрувальні мембрани. Зазвичай дисперсії готують шляхом включення різних стерилізованих активних інгредієнтів у стерильний носій, який містить основне дисперсійне середовище та/або інші інгредієнти. У разі стерильних порошків для приготування стерильних розчинів, суспензій або емульсій для ін'єкцій кращими способами приготування є технології вакуумної сушки або ліофільної сушки, які дають вихід у вигляді порошку активного інгредієнта плюс будь-який додатковий бажаний компонент з

їхніх рідких середовищ, попередньо підданих стерилізації фільтрацією. Рідке середовище повинне бути належним чином забуферене, якщо необхідно, і рідкий розчинник перед ін'єкцією необхідно зробити ізотонічним за допомогою достатньої кількості фізіологічного розчину або глюкози. Композиція повинна бути стабільною в умовах виробництва і зберігання, та захищатися від контамінуючої дії мікроорганізмів, таких як бактерії та гриби. Зрозуміло, що контамінація ендотоксином повинна бути мінімальна і підтримуватися на безпечному рівні, наприклад, менше 0,5 нг/мг білка. Відповідні фармацевтично прийнятні наповнювачі включають, але не обмежуються ними: буфери, такі як фосфат, цитрат і інші органічні кислоти; антиоксиданти, включно з аскорбіною кислотою і метіоніном; консерванти (такі як хлорид октадецилдиметилбензиламонію; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію, хлорид бензетонію; фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол та м-крезол); низькомолекулярні (менше ніж близько 10 залишків) поліпептиди; білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, включно з глюкозою, манозою або декстринами; хелатоутворювальні агенти, такі як ЕДТА; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; солеутворювальні протиіони, такі як натрій; комплекси металів (наприклад, комплекси Zn-білок); та/або неіонні поверхнево-активні речовини, такі як поліетиленгліколь (ПЕГ). Водні ін'єкційні суспензії можуть містити сполуки, які збільшують в'язкість суспензії, такі як натрію карбоксиметилцелюлоза, сорбіт, декстран або тощо. Необов'язково, суспензія також може містити відповідні стабілізатори або агенти, які збільшують розчинність сполук, що дозволяє отримувати висококонцентровані розчини. Крім того, суспензії активних сполук можуть бути приготовані у вигляді відповідних масляних ін'єкційних суспензій. Відповідні ліпофільні розчинники або носії включають жирні олії, такі як кунжутне масло, або синтетичні складні естери жирних кислот, такі як етилолеат або тригліцериди, або ліпосоми.

Активні інгредієнти можна включити в мікрокапсули, приготовані, наприклад, за допомогою методів коацервації або міжфазної полімеризації, наприклад, у мікрокапсули з гідроксиметилцелюлози або желатину та мікрокапсули з полі-(метилметацелату), відповідно, в колоїдні системи доставки ліків (наприклад, ліпосоми, альбумін), мікросфери, мікроемульсії, наночастинки і нанокапсули) або в макроемульсії. Такі способи розкриті у Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990). Можуть бути приготовані препарати з уповільненим вивільненням. Відповідні приклади препаратів з уповільненим вивільненням включають напівпроникні матриці з твердих гідрофобних полімерів, що містять поліпептид, причому ці матриці представлені у вигляді формованих виробів, наприклад, плівок або мікрокапсул. У конкретних варіантах здійснення пролонговане всмоктування композиції, введеної шляхом ін'єкції, може бути викликано застосуванням в композиціях агентів, які уповільнюють абсорбцію, таких як, наприклад, моностеарат алюмінію, желатин або їх комбінації.

Приклади фармацевтично прийнятних наповнювачів в цьому документі додатково включають агенти для диспергування лікарських засобів, такі як розчинні нейтрально-активні глікопротеїни гіалуронідази (sHASEGP), наприклад, людські розчинні глікопротеїни гіалуронідази PH-20, такі як rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Деякі типові sHASEGP і способи їхнє застосування, у тому числі rHuPH20, описані в патентних публікаціях США № 2005/0260186 та 2006/0104968. В одному аспекті sHASEGP об'єднують з однією або більше додатковими глюкозаміногліканазами, такими як хондроїтинази.

Ілюстративні ліофілізовані композиції антитіл описані в патенті США № 6267958. Водні композиції антитіл включають препарати, описані в патенті США № 6171586 та WO 2006/044908, причому останні композиції включають гістидин-ацетатний буфер.

На додаток до композицій, описаних раніше, біспецифічні антитіла також можуть бути складені у вигляді депо-препарату. Такі препарати тривалої дії можуть вводити шляхом імплантації (наприклад, підшкірно або внутрішньом'язово) або за допомогою внутрішньом'язової ін'єкції. Так, наприклад, біспецифічні антитіла можуть бути складені з відповідних полімерних або гідрофобних матеріалів (наприклад, у вигляді емульсії в прийнятній олії) або іонообмінних смол або у вигляді важкорозчинних похідних, наприклад, у вигляді важкорозчинної солі.

Фармацевтичні композиції, що містять біспецифічні антитіла за винаходом, можуть бути отримані за допомогою звичайних процесів змішування, розчинення, емульгування, інкапсуляції, захоплення або ліофілізації. Фармацевтичні композиції можуть бути складені загальноприйнятим способом з використанням одного або більше фізіологічно прийнятних носіїв, розріджувачів, наповнювачів або допоміжних речовин, які полегшують технологію

виготовлення білків у препарати, які можуть бути використані фармацевтично. Відповідний склад залежить від вибраного шляху введення.

Біспецифічні антитіла можуть бути складені в композицію у формі вільної кислоти або основи, нейтральній або сольовій формі. Фармацевтично прийнятні солі являють собою солі, які по суті зберігають біологічну активність вільної кислоти або основи. Вони включають солі приєднання кислоти, наприклад, ті, які утворені вільними аміногрупами білкової композиції, або які утворені з неорганічними кислотами, такими як, наприклад, соляна або фосфорна кислоти, або такими органічними кислотами, як оцтова, щавлева, винна чи мигдальна кислота. Солі, які утворені з вільними карбоксильними групами, також можуть бути отримані з неорганічних основ, таких як, наприклад, гідроксиди натрію, калію, амонію, кальцію або заліза; або таких органічних основ як ізопропіламін, триметіламін, гістидин або прокаїн. Фармацевтичні солі мають тенденцію бути більш розчинними у водних та інших протонних розчинниках, ніж відповідні форми вільної основи.

Композиція в цьому документі може також містити більше одного активного інгредієнта, якщо це необхідно для конкретного симптому, що підлягає лікуванню, переважно тих, які мають додаткові активності, які не мають негативного впливу одна на одну. Такі активні компоненти відповідно присутні в комбінації в кількостях, ефективних для передбачуваної мети.

Композиції, які використовуються для введення *in vivo*, зазвичай є стерильними. Стерильність може бути легко досягнута, наприклад, за допомогою фільтрації через стерильні фільтруючі мембрани.

G. Терапевтичні способи і композиції

Будь-яке з біспецифічних антитіл, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, яке запропоноване в цьому документі, можна використовувати в терапевтичних способах.

Для використання в терапевтичних способах біспецифічні антитіла, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як визначено в цьому документі, можуть включати до складу препарату, дозувати і вводити за допомогою способів, які узгоджуються з належною медичною практикою. Чинники, які слід враховувати в цьому контексті, включають конкретний розлад, що підлягає лікуванню, конкретного хворого, що підлягає лікуванню, клінічний стан окремого пацієнта, причину розладу, область доставки агента, спосіб введення, схему введення та інші чинники, відомі лікарям-практикам.

В одному аспекті запропоновані біспецифічні антитіла, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як визначено в цьому документі, для застосування в якості лікарського засобу. У додаткових аспектах запропоновані біспецифічні антитіла, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як визначено в цьому документі, для застосування при лікуванні захворювання, зокрема, для застосування при лікуванні онкологічного захворювання. У деяких варіантах здійснення запропоновані біспецифічні антитіла, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, для використання в способі лікування. В одному аспекті запропоновано біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, або фармацевтичну композицію, яка містить біспецифічне антитіло, для застосування в лікуванні захворювання у людини, який цього потребує. У деяких варіантах здійснення винахід відноситься до біспецифічних антитіл, які містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, для використання в способі лікування індивідуума, що має захворювання, що включає введення індивідууму терапевтично ефективної кількості біспецифічного антитіла. В окремих варіантах здійснення захворювання, яке підлягає лікуванню, являє собою онкологічне захворювання. В іншому аспекті захворювання, яке підлягає лікуванню, являє собою інфекційне захворювання, зокрема хронічну вірусну інфекцію, таку як ВІЛ (вірус імунодефіциту людини), ВГВ (вірус гепатиту В), ВГС (гепатит С), ВПГ1 (вірус простого герпесу типу 1), ЦМВ (цитомегаловірус), ВЛХМ (вірус лімфоцитарного хориоменінгіту) або ВЕБ (вірус Епштейна-Барр). Суб'єкт, пацієнт або "індивідуум", який потребує лікування, зазвичай є ссавцем, більш конкретно людиною.

У додатковому аспекті у винаході запропоновано використання біспецифічних антитіл, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий

антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як визначено в цьому документі раніше, при виготовленні або приготуванні лікарського засобу для лікування захворювання у індивідуума, який потребує цього. В одному варіанті здійснення лікарський засіб призначений для застосування в способі лікування захворювання, що включає введення індивідууму, який страждає на це захворювання, терапевтично ефективної кількості лікарського засобу.

У певних аспектах захворювання, яке підлягає лікуванню, являє собою проліферативну хворобу, зокрема онкологічне захворювання. Приклади онкологічного захворювання включають рак сечового міхура, рак головного мозку, рак голови та шиї, рак підшлункової залози, рак легені, рак молочної залози, рак яєчників, рак матки, рак шийки матки, рак ендометрія, рак стравоходу, рак товстої кишки, колоректальний рак, рак прямої кишки, рак шлунку, рак простати, рак крові, рак шкіри, плоскоклітинний рак, рак кісток і рак нирок. Інші порушення проліферації клітин, які можна лікувати з використанням біспецифічних антитіл, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3 за винаходом, включають, але не обмежуються цим, новоутворення, розташовані в черевній порожнині, кістці, молочній залозі, травній системі, печінці, підшлунковій залозі, очеревині, ендокринних залозах (наднирковій залозі, паращитоподібній залозі, гіпофізі, яєчках, яєчниках, тимусі, щитоподібній залозі), оці, голові та шиї, нервовій системі (центральної та периферичній), лімфатичній системі, тазі, шкірі, м'яких тканинах, селезінці, області грудної клітини та сечостатевої системі. Також включені передракові стани або ураження та метастази злоякісних новоутворень. У певних аспектах злоякісне новоутворення вибирають з групи, що складається з нирково-клітинного раку, раку шкіри, раку легені, колоректального раку, раку молочної залози, раку головного мозку, раку голови та шиї. У додаткових аспектах злоякісне новоутворення вибирають з карциноми, лімфоми (наприклад, лімфоми Ходжкіна та неходжкінської лімфоми), бластоми, саркоми і лейкоза. В іншому аспекті злоякісного новоутворення, яке підлягає лікуванню, вибирають з плоскоклітинного раку, дрібноклітинного раку легені, недрібноклітинного раку легені, аденокарциноми легені, плоскоклітинного раку легені, раку очеревини, гепатоцелюлярного раку, раку шлунково-кишкового тракту, раку підшлункової залози, гліоми, раку шийки матки, раку яєчників, раку печінки, раку сечового міхура, гепатоми, раку молочної залози, раку товстої кишки, колоректального раку, раку ендометрія або матки, раку слинної залози, раку нирки, раку печінки, раку простати, раку вульви, раку щитоподібної залози, раку печінки, лейкозу та інших лімфопроліферативних захворювань, а також різних видів раку голови та шиї.

У додатковому аспекті захворювання, яке підлягає лікуванню, являє собою інфекційне захворювання, зокрема хронічну вірусну інфекцію. Термін "хронічна вірусна інфекція" відноситься до суб'єкта, ураженого або інфікованого хронічним вірусом. Прикладами хронічних вірусних інфекцій є вірус імунодефіциту людини (ВІЛ), вірусна інфекція гепатиту В (ВГВ), вірусна інфекція гепатиту С (ВГС), вірус простого герпесу 1 (ВПГ1), цитомегаловірус (ЦМВ), вірус лімфоцитарного хориомеїнігіту (ВЛХМ) або вірус Епштейна-Барр (ВЕБ).

Фахівець у цій галузі техніки легко визнає, що в багатьох випадках біспецифічна молекула може не забезпечувати лікування, а може давати тільки часткову користь. У деяких варіантах здійснення фізіологічні зміни, які мають певну користь, також вважаються терапевтично корисними. Таким чином, у деяких варіантах здійснення кількість біспецифічного антитіла, яке забезпечує зміна фізіологічного стану, вважається "ефективною кількістю" або "терапевтично ефективною кількістю".

У додатковому аспекті винахід відноситься до способу лікування захворювання у індивідуума, який включає введення зазначеному індивідууму терапевтично ефективної кількості біспецифічних антитіл, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується до LAG3 за винаходом. В одному варіанті здійснення зазначеному індивідууму вводять композицію, що містить біспецифічне антитіло за винаходом у фармацевтично прийнятній формі. В окремих варіантах здійснення захворювання, яке підлягає лікуванню, являє собою проліферативне захворювання. У конкретному варіанті здійснення захворювання являє собою онкологічне захворювання. У деяких варіантах здійснення спосіб додатково включає введення індивідууму терапевтично ефективної кількості щонайменше одного додаткового терапевтичного агента, наприклад, протиракового засобу, якщо захворювання, що підлягає лікуванню, являє собою онкологічне захворювання. В іншому аспекті захворювання являє собою хронічну вірусну інфекцію. "Індивідуум" відповідно до будь-яким з вищевказаних варіантів здійснення може бути ссавцем, переважно людиною.

Для запобігання або лікування захворювання відповідна доза біспецифічних антитіл, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий

антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3 за винаходом (при використанні окремо або в комбінації з одним або іншими додатковими терапевтичними агентами) буде залежати від типу захворювання, що підлягає лікуванню, шляху введення, маси тіла пацієнта, типу злитого білка, тяжкості та перебігу захворювання, від того, чи вводиться біспецифічне антитіло для профілактичних або терапевтичних цілей, від попередніх або паралельних терапевтичних втручань, історії хвороби пацієнта та реакції на злитий білок, а також рішення лікаря. У будь-якому випадку, фахівець, відповідальний за введення, буде визначати концентрацію активного (их) інгредієнта (ів) в композиції і відповідну (і) дозу (и) для конкретного суб'єкта. У цьому документі розглядаються різні схеми застосування препарату, включаючи, але не обмежуючись, одноразове або багаторазове введення в різні моменти часу, болюсне введення та імпульсна інфузія.

Біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як визначено в цьому документі, відповідним чином вводять пацієнту за один раз або протягом серії процедур. Залежно від типу та тяжкості захворювання вихідною потенційною дозою для введення пацієнту може бути доза від приблизно 1 мкг/кг до 15 мг/кг (наприклад, від 0,1 мг/кг до 10 мг/кг) біспецифічного антитіла, будь то, наприклад, одне або більше окремих введень або безперервна інфузія. Одна типова добова доза може варіюватися від близько 1 мкг/кг до 100 мг/кг або більше, залежно від факторів, згаданих вище. Для повторних введень протягом декількох днів або довше, залежно від стану, лікування зазвичай триватиме до тих пір, поки не відбудеться бажане пригнічення симптомів захворювання. Одна типова доза біспецифічного антитіла повинна знаходитися в діапазоні від близько 0,005 мг/кг до близько 10 мг/кг. В інших прикладах доза також може становити від близько 1 мкг/кг маси тіла, близько 5 мкг/кг маси тіла, близько 10 мкг/кг маси тіла, близько 50 мкг/кг маси тіла, близько 100 мкг/кг маси тіла, близько 200 мкг/кг маси тіла, близько 350 мкг/кг маси тіла, близько 500 мкг/кг маси тіла, близько 1 мг/кг маси тіла, близько 5 мг/кг маси тіла, близько 10 мг/кг маси тіла, близько 50 мг/кг маси тіла, близько 100 мг/кг маси тіла, близько 200 мг/кг маси тіла, близько 350 мг/кг маси тіла, близько 500 мг/кг маси тіла до близько 1000 мг/кг маси тіла або більше на введення і будь-який діапазон, виведений з описаного вище. У прикладах похідного діапазону з чисел, перерахованих у цьому документі, діапазон від близько 5 мг/кг маси тіла до близько 100 мг/кг маси тіла, від близько 5 мкг/кг маси тіла до близько 500 мг/кг маси тіла тощо, можна вводити, ґрунтуючись на числах, описаних вище. Таким чином, пацієнту може бути введена одна або більше доз у близько 0,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 5,0 мг/кг або 10 мг/кг (або будь-яка їхня комбінація). Такі дози можуть вводити періодично, наприклад, щотижня або кожні три тижні (наприклад, так, щоб пацієнт отримував від близько двох до близько двадцяти або, наприклад, близько шести доз злитого білка). Може бути призначена спочатку більш висока навантажувальна доза, за якою йде одна або кілька нижчих доз. Проте, можуть бути корисні інші схеми лікування. Прогрес цієї терапії легко контролювати за допомогою традиційних способів і аналізів.

Біспецифічні антитіла, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як визначено в цьому документі, зазвичай використовуються в кількості, ефективній для досягнення поставленої мети. Для застосування в лікуванні або запобіганні хворобливого стану біспецифічні антитіла за винаходом або їхні фармацевтичні композиції вводять або застосовують у терапевтично ефективній кількості. Визначення терапевтично ефективної кількості знаходиться в межах можливостей фахівців у цій галузі техніки, особливо в контексті докладного опису, представленого в цьому документі.

Для системного введення терапевтично ефективна доза може бути спочатку оцінена з аналізів *in vitro*, таких як аналізи клітинних культур. Потім на тваринних моделях можна розрахувати дозу для досягнення діапазону концентрацій в кровотоці, який включає IC_{50} , як визначено в культурі клітин. Така інформація може бути використана для більш точного визначення корисних доз у людини.

Початкові дози також можуть бути оцінені за даними *in vivo*, наприклад, на тваринних моделях, з використанням методик, які добре відомі в цій галузі техніки. Фахівець у цій галузі техніки може легко оптимізувати введення людям на основі даних, отриманих з досліджень на тваринах.

Кількість і інтервал дозування можна регулювати індивідуально, щоб забезпечити рівні біспецифічного антитіла в плазмі, які є достатніми для підтримки терапевтичного ефекту. Звичайні дози для пацієнтів для введення шляхом ін'єкції становлять від близько 0,1 до 50 мг/кг/доба, зазвичай від близько 0,5 до 1 мг /кг/доба. Терапевтично ефективні рівні в плазмі можуть бути досягнуті шляхом введення декількох доз щодоби. Рівні в плазмі можуть бути

виміряні, наприклад, за допомогою ВЕРХ.

У випадках місцевого введення або селективного поглинання ефективна локальна концентрація біспецифічного антитіла може не бути пов'язана з концентрацією в плазмі. Фахівець у цій галузі техніки зможе оптимізувати терапевтично ефективні місцеві дози без надмірного експериментування.

Терапевтично ефективна доза біспецифічних антитіл, описаних у цьому документі, зазвичай забезпечує терапевтичну користь, не викликаючи суттєвої токсичності. Токсичність і терапевтична ефективність злитого білка можуть бути визначені стандартними фармацевтичними процедурами на клітинній культурі або експериментальних тваринах. Аналізи клітинних культур і дослідження на тваринах можна використовувати для визначення LD₅₀ (доза, летальна для 50 % популяції) і ED₅₀ (доза, терапевтично ефективна для 50 % популяції). Співвідношення доз між токсичним та терапевтичним ефектами являє собою терапевтичний індекс, який може бути виражений як співвідношення LD₅₀/ED₅₀. Біспецифічні антитіла, які демонструють великі терапевтичні показники, є кращими. В одному варіанті здійснення біспецифічне антитіло за винаходом проявляє високий терапевтичний індекс. Дані, отримані з аналізів клітинних культур і досліджень на тваринах, можуть бути використані при складанні діапазону доз, придатних для застосування у людей. Доза переважно знаходиться в діапазоні концентрацій в кровотоці, які включають ED₅₀ з мінімальною токсичністю або без неї. Доза може змінюватися в цьому діапазоні в залежності від безлічі факторів, наприклад, використовуваної лікарської форми, використовуваного способу введення, стану суб'єкта тощо. Точний склад, спосіб введення та доза можуть бути вибрані окремим лікарем з урахуванням стану пацієнта (див., наприклад, Fingl et al., 1975, in: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p. 1, включений в цей документ за допомогою посилання у всій своїй повноті).

Лікуючий лікар для пацієнтів, яких лікують біспецифічними антитілами за винаходом, знає, як і коли припинити, перервати або скорегувати введення через токсичність, дисфункції органів тощо. І навпаки, лікуючий лікар також знав би, як скорегувати лікування до більш високих рівнів, якщо клінічна відповідь не була достатньою (виключно з токсичністю). Величина введеної дози при лікуванні розладу, що представляє інтерес, буде варіюватися залежно від тяжкості патологічного стану, що підлягає лікуванню, від шляху введення тощо. Тяжкість патологічного стану може, наприклад, оцінюватися частково за допомогою стандартних методів оцінки для прогнозування. Крім того, доза і, можливо, частота введення дози також будуть варіюватися залежно від віку, маси тіла і відповіді окремого пацієнта.

Інші агенти та способи лікування

Біспецифічні антитіла, що містять перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі раніше, можуть вводитися в комбінації з одним або більше іншими агентами в терапії. Наприклад, біспецифічне антитіло відповідно за винаходом можна вводити щонайменше з одним додатковим терапевтичним агентом. Термін "терапевтичний агент" охоплює будь-який агент, який можна вводити для лікування симптому або захворювання у індивідуума, що потребує такого лікування. Такий додатковий терапевтичний агент може містити будь-які активні інгредієнти, які підходять для конкретного показання, що піддається лікуванню, переважно ті, які мають комплементарні активності, які не мають небажаного впливу один на одний. В окремих варіантах здійснення додатковий терапевтичний агент являє собою інший протираковий агент.

В одному аспекті винаходу біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, або фармацевтична композиція, що містить зазначене біспецифічне антитіло, призначені для застосування в профілактиці або лікуванні онкологічного захворювання, при якому біспецифічне антитіло вводять у комбінації з хімотерапевтичним агентом, опроміненням та/або іншими агентами для застосування при імунотерапії онкологічного захворювання.

У конкретному аспекті винаходу біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, або фармацевтична композиція, що містить зазначене біспецифічне антитіло, яке призначене для застосування в профілактиці або лікуванні онкологічного захворювання, при якому біспецифічне антитіло вводять у комбінації з активуючим Т-клітини анти-CD3 біспецифічним антитілом, зокрема, анти-CEA/анти-CD3 біспецифічним антитілом. В одному аспекті анти-CEA/анти-CD3 біспецифічне антитіло являє собою активуюче Т-клітини анти-CD3 біспецифічне антитіло, що містить другий антигензв'язуючий домен, що містить (а) варіабельну область важкого ланцюга (V_HCEA), що

містить послідовність CDR-H1 SEQ ID NO: 154, послідовність CDR-H2 SEQ ID NO: 155 і послідовність CDR-H3 SEQ ID NO: 156, та/або варіабельну область легкого ланцюга (V_LCEA), що містить послідовність CDR-L1 SEQ ID NO: 157, послідовність CDR-L2 SEQ ID NO: 158 і послідовність CDR-L3 SEQ ID NO: 159, або (b) варіабельну область важкого ланцюга (V_HCEA), що містить послідовність CDR-H1 SEQ ID NO: 162, послідовність CDR-H2 SEQ ID NO: 163 і послідовність CDR-H3 SEQ ID NO: 164, та/або варіабельну область легкого ланцюга (V_LCEA), що містить послідовність CDR-L1 SEQ ID NO: 165, послідовність CDR-L2 SEQ ID NO: 166 і послідовність CDR-L3 SEQ ID NO: 167. В одному аспекті анти-CEA/анти-CD3 біспецифічне антитіло являє собою активуюче Т-клітини анти-CD3 біспецифічне антитіло, що містить варіабельну область важкого ланцюга (V_HCEA), що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 160, та/або варіабельну область легкого ланцюга (V_LCEA), що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 161, або другий антигензв'язуючий домен, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга (V_HCEA), що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 168, та/або варіабельну область легкого ланцюга (V_LCEA), що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 169.

У додатковому аспекті анти-CEA/анти-CD3 біспецифічне антитіло містить Fc-домен, що містить одну або більше амінокислотних замін, які зменшують зв'язування з Fc-рецептором та/або ефекторну функцію. Зокрема, анти-CEA/анти-CD3 біспецифічне антитіло містить Fc-домен IgG1, що містить амінокислотні заміни L234A, L235A і P329G.

У конкретному аспекті анти-CEA/анти-CD3 біспецифічне антитіло містить поліпептид, який щонайменше на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 146, поліпептид, який щонайменше на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 147, поліпептид, який щонайменше на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 148, і поліпептид, який щонайменше на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 149. У додатковому конкретному варіанті здійснення біспецифічне антитіло містить поліпептидну послідовність SEQ ID NO: 146, поліпептидну послідовність SEQ ID NO: 147, поліпептидну послідовність SEQ ID NO: 148 і поліпептидну послідовність SEQ ID NO: 149 (CEA CD3 TCB).

У додатковому аспекті анти-CEA/анти-CD3 біспецифічне антитіло містить поліпептид, який щонайменше на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 150, поліпептид, який щонайменше на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 151, поліпептид, який щонайменше на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 152, і поліпептид, який щонайменше на 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO: 153. У додатковому конкретному варіанті здійснення біспецифічне антитіло містить поліпептидну послідовність SEQ ID NO: 150, поліпептидну послідовність SEQ ID NO: 151, поліпептидну послідовність SEQ ID NO: 152 і поліпептидну послідовність SEQ ID NO: 153 (CEACAM5 CD3 TCB).

В іншому аспекті запропоновано фармацевтичну композицію, що містить біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як описано в цьому документі, і активуюче Т-клітини анти-CD3 біспецифічне антитіло, зокрема, анти-CEA/анти-CD3 біспецифічне антитіло. У конкретному аспекті фармацевтична композиція призначена для застосування в комбінованому, послідовному або одночасному лікуванні захворювання, зокрема, для лікування онкологічного захворювання. Більш конкретно, композиція призначена для застосування при лікуванні солідних пухлин.

В іншому аспекті у винаході запропоновано спосіб лікування або затримки прогресування злоякісного новоутворення у індивідуума, що включає введення суб'єкту ефективної кількості біспецифічного антитіла, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується до LAG3, як описано в цьому документі, у комбінації з активуючим Т-клітини анти-CD3 біспецифічним антитілом, зокрема, анти-CEA/анти-CD3 біспецифічним антитілом або анти-FolR1/анти-CD3 біспецифічним антитілом.

Такі інші агенти відповідним чином присутні в комбінації в кількостях, які ефективні для передбачуваної мети. Ефективна кількість таких інших агентів залежить від кількості використовуваного злитого білка, типу розладу або лікування та інших чинників, що обговорюються вище. Біспецифічні антитіла зазвичай використовуються в тих самих дозах і такими самими способами введення, як описано в цьому документі, або приблизно від 1 до 99 % доз, описаних у цьому документі, або в будь-якій дозі і будь-яким способом, який емпірично/клінічно визначений як відповідний.

Такі види комбінованої терапії, зазначені вище, включають комбіноване введення (де два

або більше терапевтичних агентів включено в одну і ту саму або окремі композиції) і роздільне введення, і в цьому випадку введення біспецифічного антитіла може відбуватися до, одночасно та/або після введення додаткового терапевтичного агента та/або ад'юванта.

Н. Продукти виробництва

- 5 В іншому аспекті винаходу запропонувано продукт виробництва, що містить речовини, корисні для лікування, профілактики та/або діагностики розладів, описаних вище. Продукт виробництва містить контейнер і етикетку або листок-вкладиш на контейнері або зв'язаний з ним. Відповідні контейнери включають, наприклад, пляшки, флакони, шприци, пакети з розчинами для внутрішньовенного введення тощо. Контейнери можуть бути виготовлені з різних матеріалів, таких як скло або пластик. Контейнер містить композицію, одну або в комбінації з іншою композицією, яка ефективна для лікування, профілактики та/або діагностики патологічного стану, і може мати стерильний вхідний отвір (наприклад, контейнер може являти собою пакет з розчинами для внутрішньовенного введення або флакони з пробкою, яка проколюється за допомогою голки для підшкірних ін'єкцій). Щонайменше один активний агент в композиції являє собою біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, як визначено в цьому документі раніше.

На етикетці або листку-вкладиші в упаковці зазначено, що композиція використовується для лікування вибраного патологічного стану. Крім того, продукт виробництва може містити (а) перший контейнер з композицією, яка міститься в ньому, при цьому композиція містить біспецифічне антитіло за винаходом; і (б) другий контейнер з композицією, яка міститься в ньому, при цьому композиція містить додатковий цитотоксичний або інший терапевтичний агент. Продукт виробництва в цьому варіанті здійснення винаходу може додатково містити листок-вкладиш в упаковці із зазначенням, що композиції можуть бути використані для лікування конкретного патологічного стану.

В альтернативному або додатковому варіанті продукт виробництва може додатково містити другий (чи третій) контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буферний розчин, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWF), фосфатно-сольовий буферний розчин, розчин Рінгера та розчин декстрази. Додатково можуть бути включені інші речовини, бажані з комерційної та споживчої точки зору, включно з іншими буферами, розчинниками, фільтрами, голками та шприцами.

Таблиця С (послідовності):

	Назва	Послідовність
1	HVR-H1 важкого ланцюга, PD1-0103	GFSFSSY
2	HVR-H2 важкого ланцюга, PD1-0103	GGR
3	HVR-H3 важкого ланцюга, PD1-0103	TGRVYFALD
4	HVR-L1 легкого ланцюга, PD1-0103	SESVDTSNSF
5	HVR-L2 легкого ланцюга, PD1-0103	RSS
6	HVR-L3 легкого ланцюга, PD1-0103	NYDVPW
7	варіабельний домен важкого ланцюга VH, PD1-0103	EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFSFSSYTMSWVRQTPEKRLDWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLEMSSLMSEDTALYYCVLLTGRVYFALDSWGQGTSTVTVSS
8	варіабельний домен легкого ланцюга VL, PD1-0103	KIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASESVDTSNSFIHWYQQRPGQSPKLLIYRSSTLESQVPAFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDVATYYCQQNYDVPWTFGGGTKEIK
9	гуманізований варіант - варіабельний домен важкого ланцюга VH PD1-0103_01 (PD1 0376)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGTSTVTVSS
10	гуманізований варіант - варіабельний домен легкого ланцюга VL PD1-	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSNSFIHWYQKPGQSPKLLIYRSSTLESQVPAFSGSGSGTDFLTISLQAEADVAVYYCQQNYDVPWTFGGGTKEIK

Таблиця С (послідовності):

	Назва	Послідовність
	0103_01 (PD1 0376)	
11	гуманізований варіант - варіабельний домен легкого ланцюга VL PD1- 0103_02	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRASESVDTSDNSFIHWYQ QRPQGQSPRLLIYRSSTLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVG VYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK
12	гуманізований варіант - варіабельний домен легкого ланцюга VL PD1- 0103_03	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAESVDTSDNSFIHWYQ QKPGQSPRLLIYRSSTLESGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLE PEDFAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK
13	гуманізований варіант - варіабельний домен легкого ланцюга VL PD1- 0103_04	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAESVDTSDNSFIHWYQ QKPGQSPRLLIYRSSTLESGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLE PEDFAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK
14	HVR-H1 важкого ланцюга, aLAG3(0414)	DYTMN
15	HVR-H2 важкого ланцюга, aLAG3(0414)	VISWDGGGTY YTDSVKG
16	HVR-H3 важкого ланцюга, aLAG3(0414)	GLTDDTLYGS DY
17	HVR-L1 легкого ланцюга, aLAG3(0414)	RASQSISSYL N
18	HVR-L2 легкого ланцюга, aLAG3(0414)	AASLQS
19	HVR-L3 легкого ланцюга, aLAG3(0414)	QQTYSSPLT
20	варіабельний домен важкого ланцюга VH, aLAG3(0414)	EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFIFD DYTMNWVRQA PGKGLEWVAV ISWDGGGTY TDSVKGRFTI SRDDFKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKGL TDTTLYGSDY WGQGT LTVS S
21	варіабельний домен легкого ланцюга VL, aLAG3(0414)	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSI SYLNWYQQK PKAPKLLIYA ASTLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTSSLP EDFATYYCQQ TYSSPLTFGG GTKVEIK
22	HVR-H1 важкого ланцюга, aLAG3(0403)	DYTMH
23	HVR-H2 важкого ланцюга, aLAG3(0403)	LVSWDGGGTY YTNSVKG
24	HVR-H3 важкого ланцюга, aLAG3(0403)	AITDTSLYGY DY
25	HVR-L1 легкого ланцюга, aLAG3(0403)	RASQSISSYL N
26	HVR-L2 легкого ланцюга, aLAG3(0403)	AASLQS
27	HVR-L3 легкого ланцюга, aLAG3(0403)	QQTYSTPLT
28	варіабельний домен важкого ланцюга VH, aLAG3(0403)	EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFD DYTMHWVRQA PGKGLEWVSL VSWDGGGTY TNSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYFCAKAI TDTSLYGYDY WGQGILTVS S
29	варіабельний домен легкого ланцюга VL, aLAG3(0403)	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSI SYLNWYQQK PKNAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTSSLP EDFATYYCQQ TYSTPLTFGG GTKVEIK
30	HVR-H1 важкого ланцюга, aLAG3(0411)	DYTMN
31	HVR-H2 важкого ланцюга, aLAG3(0411)	VISWDGGATY YADSVKG
32	HVR-H3 важкого	GLTDDTLYGS DY

Таблиця С (послідовності):

	Назва	Послідовність
	ланцюга, aLAG3(0411)	
33	HVR-L1 легкого ланцюга, aLAG3(0411)	RASQSIVSYL N
34	HVR-L2 легкого ланцюга, aLAG3(0411)	ASSSLQS
35	HVR-L3 легкого ланцюга, aLAG3(0411)	QQTYSTPLT
36	варіабельний домен важкого ланцюга VH, aLAG3(0411)	EVHLLSESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFIVD DYTMNWVRQA PGKGLEWVSV ISWDGGATYY ADSVKGRFTI SRDDFKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKGL TDDTLYGSDY WGQGTTLTVS S
37	варіабельний домен легкого ланцюга VL, aLAG3(0411)	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIV SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA SSSLQSGVPS RFGSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ TYSTPLTFGG GTKVEIK
38	HVR-H1 важкого ланцюга, aLAG3(0417)	DYAMS
39	HVR-H2 важкого ланцюга, aLAG3(0417)	GIDNSGYITY YTDSVKG
40	HVR-H3 важкого ланцюга, aLAG3(0417)	THSGLIVNDA FDI
41	HVR-L1 легкого ланцюга, aLAG3(0417)	RASQSISSYL N
42	HVR-L2 легкого ланцюга, aLAG3(0417)	AASSLQS
43	HVR-L3 легкого ланцюга, aLAG3(0417)	QQTYSTPLT
44	варіабельний домен важкого ланцюга VH, aLAG3(0417)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL ACAASGFTFS DYAMSWVRQA PGKGLEWVSG IDNSGYITYY TDSVKGRFTI SRDDVKNTLY LQMNSLRAED TAVYLCTKTH SGLIVNDAFD IWGQGTMTV SS
45	варіабельний домен легкого ланцюга VL, aLAG3(0417)	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSI SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFGSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ TYSTPLTFGG GTKVEIK
46	HVR-H1 важкого ланцюга, aLAG3(0416)	DYAMS
47	HVR-H2 важкого ланцюга, aLAG3(0416)	GIDNSGYITY YTDSVKG
48	HVR-H3 важкого ланцюга, aLAG3(0416)	THSGLIVNDA FDI
49	HVR-L1 легкого ланцюга, aLAG3(0416)	RASQSISSYL N
50	HVR-L2 легкого ланцюга, aLAG3(0416)	DASSLES
51	HVR-L3 легкого ланцюга, aLAG3(0416)	QQSYSTPLT
52	варіабельний домен важкого ланцюга VH, aLAG3(0416)	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL ACAASGFTFS DYAMSWVRQA PGKGLEWVSG IDNSGYITYY TDSVKGRFTI SRDDVKNTLY LQMNSLRAED TAVYLCTKTH SGLIVNDAFD IWGQGTMTV SS
53	варіабельний домен легкого ланцюга VL, aLAG3(0416)	DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSI SYLNWYQQKP GKAPKLLIYD ASSLESVPS RFGSGSGSGTD ATLTISLQP EDFATYYCQQ SYSTPLTFGG GTKVEIK
54	варіабельний домен важкого ланцюга VH, BMS-986016 (WO2014/008218 i	QVQLQWAGG LLKPSETLSL TCAVYGGSF DYYWNWIRQP PGKGLEWIGE INHRGSTNSN PSLKSRTLS LDTSKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCAFGYS DYEYNWFDPW GQGTTLTVSS

Таблиця С (послідовності):

	Назва	Послідовність
	US2016/0326248)	
55	варіабельний домен легкого ланцюга VL BMS-986016 (WO2014/008218 і US2016/0326248)	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG SYLAWYQQKP GQAPRLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ GTNLEIK
56	HVR-H1 важкого ланцюга, MDX25F7(25F7)	DYYWN
57	HVR-H2 важкого ланцюга, MDX25F7(25F7)	EINHNGNTNSNPSLKS
58	HVR-H3 важкого ланцюга, MDX25F7(25F7)	GYSDYEYNWF
59	HVR-L1 легкого ланцюга, MDX25F7(25F7)	RASQSISSYLA
60	HVR-L2 легкого ланцюга, MDX25F7(25F7)	DASNRAT
61	HVR-L3 легкого ланцюга, MDX25F7(25F7)	QQRSNWPLT
62	варіабельний домен важкого ланцюга VH, MDX25F7 (25F7) (US2011/0150892 і WO2014/008218)	QVQLQWGGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF DYYWNWIRQP PGKGLEWIGE INHNGNTNSN PSLKSRTLS LDTSKNQFSL KLRVTAADT AVYYCAFGYS DYEYNWFDPW GQGLTLTVSS
63	варіабельний домен легкого ланцюга VL, MDX25F7 (25F7) (US2011/0150892 і WO2014/008218)	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIG SYLAWYQQKP GQAPRLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ GTNLEIK
64	варіабельний домен важкого ланцюга VH, гуманізоване BAP050 (LAG525) (US2015/0259420)	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGFTLT NYGMNWVRQT PGKGLKWMGW INTDTGEPTY ADDFKGRFAF SLETSASTAS LQINNLIKAD TATYFCARNP PYYGTNNAE AMDYWGQGT VTVSS
65	варіабельний домен легкого ланцюга VL, гуманізоване BAP050 (LAG525) (US2015/0259420)	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCSSQDIS NYLMWYQQKP DGTVKVLIYY TSTLHLGVPS RFGSGSGTD YSLTISNLEL EDIATYYCQQ YYNLPWTFGQ GTKVEIK
66	варіабельний домен важкого ланцюга VH, MDX26H10 (26H10) (US 2011/0150892)	QVQLVESGGG VVQPGSRSLR SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAD TAVYYCAREW AVASWDYGMD VWGQGTTTVV SS
67	варіабельний домен легкого ланцюга MDX26H10 (26H10) (US 2011/0150892)	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPFTFG PGTKVDIK
68	константна область легкого каппа-ланцюга людини	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTSLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC
69	константна область легкого каппа-ланцюга людини	QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA GVETTTPSKQ SNNKYAASSY LSLTPEQWKS HRSYSCQVTH EGSTVEKTVA PTECS
70	константна область важкого ланцюга	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT

Таблиця С (послідовності):

	Назва	Послідовність
	людини, отримана з IgG1	VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCTVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
71	константна область важкого ланцюга людини, отримана з IgG1, з мутаціями L234A, L235A і P329G	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAAGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCTVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LGAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
72	константна область важкого ланцюга людини, отримана з IgG4	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGKT YTCNVNHNKPS NTKVDKRVES KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
73	Типова людська послідовність LAG3 (без сигнальної послідовності)	VPVWVAQEGA PAQLPCSP TI PLQDLSLLRR AGVTWQHQP DSGPPAAAPGH PLAPGPHPA PSSWGPRPRR YTVLSVGP GG LRSGLRPLQP RVQLDERGRQ RGDFSLWLRP ARRADAGEYR AAVHLRDRAL SCRLRLRLGQ ASMTASPPGS LRASDWVILN CSFSRPDRPA SVHWFRNRGQ GRVPVRES PHHLAESFLFL PQVSPMDSGP WGCILTYRDG FNVSIMYNLT VLGLEPPTPL TVYAGAGSRV GLPCRLPAGV GTRSFLTAKW TPPGGGPDLL VTGDNGDFTL RLEDVSQAQA GTYTCHILQ EQQLNATVTL AIITVTPKSF GSPGSLGKLL CEVTPVSGQE RFVWSSLDTP SQRSFSGPWL EAQEAQLLSQ PWQCQLYQGE RLLGAAVYFT ELSSPGAQRS GRAPGALPAG HLLLFILGV LSLLLVLTGA FGFHLWRRQW RPRRFSALEQ GIHPQAQSK IEELEQEPEP EPEPEPEPEP EPEPEQL
74	Позаклітинний домен LAG3 людини (ECD)	VPVWVAQEGA PAQLPCSP TI PLQDLSLLRR AGVTWQHQP DSGPPAAAPGH PLAPGPHPA PSSWGPRPRR YTVLSVGP GG LRSGLRPLQP RVQLDERGRQ RGDFSLWLRP ARRADAGEYR AAVHLRDRAL SCRLRLRLGQ ASMTASPPGS LRASDWVILN CSFSRPDRPA SVHWFRNRGQ GRVPVRES PHHLAESFLFL PQVSPMDSGP WGCILTYRDG FNVSIMYNLT VLGLEPPTPL TVYAGAGSRV GLPCRLPAGV GTRSFLTAKW TPPGGGPDLL VTGDNGDFTL RLEDVSQAQA GTYTCHILQ EQQLNATVTL AIITVTPKSF GSPGSLGKLL CEVTPVSGQE RFVWSSLDTP SQRSFSGPWL EAQEAQLLSQ PWQCQLYQGE RLLGAAVYFT ELSSPGAQRS

Таблиця С (послідовності):

	Назва	Послідовність
		GRAPGALPAG HL
75	KIEELE (частина внутрішньоклітинного домену LAG3)	KIEELE
76	праймер rbHC.up	aagcttgcca ccatggagac tgggctgcgc tggcttc
77	праймер rbHCf.do	ccattgggtga ggggtccccga g
78	праймер BcPCR_FHLC_leader.fw	atggacatga ggggtccccgc
79	праймер BcPCR_huCkappa.rev	gatttcaact gctcatcaga tggc
80	HVR-H1 важкого ланцюга, PD1-0098	<u>GYSITSDY</u>
81	HVR-H2 важкого ланцюга, PD1-0098	<u>YSG</u>
82	HVR-H3 важкого ланцюга, PD1-0098	<u>HGSAPWYFD</u>
83	HVR-L1 легкого ланцюга, PD1-0098	<u>SQNIVHSDGNTY</u>
84	HVR-L2 легкого ланцюга, PD1-0098	<u>KVS</u>
85	HVR-L3 легкого ланцюга, PD1-0098	<u>GSHFPL</u>
86	варіабельний домен важкого ланцюга VH, PD1-0098	DVQLQESGPGPLVKPSQSLSLTCTVT <u>GYSITSDY</u> AWNWIWIRQF PGDKLEWLGYIT <u>YSG</u> FTNYPNPSLKSRISSRDTSKNQFFLQL NSVATEDTATYYCARW <u>HGSAPWYFD</u> YWGRGTTTLTVSS
87	варіабельний домен легкого ланцюга VL, PD1-0098	DVLMQTPLSLPVLGQDQASISCRSS <u>SQNIVHSDGNTY</u> LEWY LQKPGQSPNLLIY <u>KVS</u> RRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYYCF <u>GSHFPL</u> TFGAGTKLELK
88	HVR-H1 важкого ланцюга, PD1-0069	<u>GYTFTDY</u>
89	HVR-H2 важкого ланцюга, PD1-0069	<u>YSG</u>
90	HVR-H3 важкого ланцюга, PD1-0069	<u>GITTGFA</u>
91	HVR-L1 легкого ланцюга, PD1-0069	<u>SKGVSTSSYSF</u>
92	HVR-L2 легкого ланцюга, PD1-0069	<u>YAS</u>
93	HVR-L3 легкого ланцюга, PD1-0069	<u>SREFPW</u>
94	варіабельний домен важкого ланцюга VH, PD1-0069	QVQLQQSGPELVRPGVSVKISCKG <u>GYTFTDY</u> AMHWVKQ SHARTLEWIGVIST <u>YSG</u> DTNYNQKFCDKATMTVDKSSSTAY LELARMTSEDSAIYYCARL <u>GITTGFA</u> YWGGGTLTVSA
95	варіабельний домен легкого ланцюга VL, PD1-0069	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS <u>SKGVSTSSYSF</u> FMHWYQ QKPRQPPKLLIK <u>YAS</u> YLESGVPAFSGSGSGTDFTLNHPV EEEDAATYYCH <u>SREFPW</u> TFGGGTKLEIK
96	важкий ланцюг 1 з 1+1 PD1/LAG3 0799 на основі PD1(0376)/aLAG3 (0416)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIHWYQ QKPGQSPKLLIYRSSTLESQVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKEIKSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLNISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSFFLYSKL

Таблиця С (послідовності):

	Назва	Послідовність
		TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
97	важкий ланцюг 2 з 1+1 PD1/LAG3 0799	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAASGFTFSDYAMSWVRQ APGKGLEWVSGIDNSGYTTYTDSVKGRFTISRDDVKNTLY LQMNSLRAEDTAVYLCTKTHSGLIVNDAFDIWGQGTMTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDEL KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
98	легкий ланцюг 1 з 1+1 PD1/LAG3 0799	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQ APGKGLEWVATISGGGRDIYPDSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGLTVTVSS ASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
99	легкий ланцюг 2 з 1+1 PD1/LAG3 0799	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDATLTISSLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKL KSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVT KSFNRGEC
100	важкий ланцюг 2 з 1+1 PD1/LAG3 0927 на основі PD1(0376)/aLAG3 (0414)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFDDYTMNWVRQA PGKGLEWVAVISWDGGGTYYTDSVKGRFTISRDDFKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGLTDTTLYGSDYWGGQGLTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDEL KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
101	легкий ланцюг 2 з 1+1 PD1/LAG3 0927	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQTYSSTPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKL KSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVT KSFNRGEC
102	важкий ланцюг 1 з 1+1 PD1/LAG3 0222 на основі PD1(0069)/ aLAG3(MDX25F7)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRAS SKGVSTSSYSFM HWYQ QKPRQPPKLLIK YAS YLESGVPAARFSGSGSGTDFTLNHPV EEEDAATYYCHH SREFPW TFGGGTKEIKSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
103	важкий ланцюг 2 з 1+1 PD1/LAG3 0222	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQ PPGKGLEWIGEINHNGNTNSNP SLKSRVTLSDTSKNQFSL KLRSVTAADTAVYYCAFGYSDEYNWFDPPWGGQGLTVTVSS

Таблиця С (послідовності):

	Назва	Послідовність
		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
104	легкий ланцюг 1 з 1+1 PD1/LAG3 0222	QVQLQSGPELVRPGVSVKISCKGSGYTFTDYAMHWVKQ SHARTLEWIGVISTYSGDTNYNQKFKDKATMTVDKSSSTAY LELARMTSEDSAIYYCARLGITTFAYWGQGLTVTVSAASV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
105	легкий ланцюг 2 з 1+1 PD1/LAG3 0222	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPG QAPRLIIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDF AVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRK LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
106	важкий ланцюг 1 з 1+1 PD1/LAG3 0224 на основі PD1(0098)/ aLAG3(MDX25F7)	DVLTMTQTPSLPVSLSGDQASISCRSSQNIVHSDGNTYLEWY LQKPGQSPNLLIYKVSRRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYYCFQGSHFPLTFGAGTKLELKSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
107	легкий ланцюг 1 з 1+1 PD1/LAG3 0224	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSTITSDYAWNWIROF PGDKLEWLGYITYSGFTNYPNPSLKSRIISRDTSKNQFFLQL NSVATEDTATYYCARWHGSAFWYFDYWGRGTTTLTVSSAS VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
108	важкий ланцюг aLAG3(0156) (MDX25F7)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVAVYGGSFSDYYWNWIRO PPGKGLEWIGEINHNGNTNSNPGLKSRVTLSDTSKNQFSL KLRSVTAADTAVYYCAFGYSDYEYNWFDWPWGQGLTVTVSS GQPKAPSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVT WNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTC NVAHPATNTKVDKTVAPSTCCKPTCPPELGGPSVFIFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQDDPEVQFTWYINNEQVRT ARPPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKA LPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMI NGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLSDGSYFLYNKL SVPTSEWQQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK
109	легкий ланцюг aLAG3(0156) (MDX25F7)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPG QAPRLIIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDF AVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
110	важкий ланцюг aLAG3(0414)	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFIFDDYTMNWVRQA PGKGLEWVAVISWDGGGTYTDSVKGRFTISRDDFKNTLY

Таблиця С (послідовності):

	Назва	Послідовність
		LQMNSLRAEDTAVYYCAKGLTDTTLYGSDYWGGQTLVTVS SGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVT WNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTC NVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRT ARPPLEQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKA LPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMI NGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGGSYFLYNKL SVPTSEWQQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK
111	легкий ланцюг aLAG3(0414)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQTYSPLTFGGGTKEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
112	важкий ланцюг aLAG3(0416)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAASGFTFSDYAMSWVRQ APGKGLEWVSGIDNSGYTYTDSVKGRFTISRDDVKNTLY LQMNSLRAEDTAVYLCTKTHSGLIVNDAFDIWGGQTMVTVS SGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVT WNSGTLTNGVRTFPSVRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTC NVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRT ARPPLEQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKA LPAPIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMI NGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGGSYFLYNKL SVPTSEWQQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK
113	легкий ланцюг aLAG3(0416)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDATLTISLQPEDF ATYYCQQSYSTPLTFGGGTKEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
114	важкий ланцюг з 2+2 PD1/LAG3 8970 на основі PD1(0376)/aLAG3 (0414)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFIFDDYTMNWVRQA PGKGLEWVAVISWDGGGTYYTDSVKGRFTISRDDFKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGLTDTTLYGSDYWGGQTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDL DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGFSFSSYTMWVRQAPGKGLEWVATISG GGRDIYYPDVSKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVLLTGRVYFALDSWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVT KSFNRGEC
115	легкий ланцюг 1 з 2+2 PD1/LAG3 8970	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIHWYQ QKPGQSPKLLIYRSTLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKEIKSSASTKGPSVF LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSC
116	важкий ланцюг з 2 +2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAASGFTFSDYAMSWVRQ

Таблиця С (послідовності):

	Назва	Послідовність
	PD1/LAG3 8984 на основі PD1(0376)/aLAG3 (0416)	APGKGLEWVSGIDNSGYTYTDSVKGRFTISRDDVKNTLY LQMNSLRAEDTAVYLCTKTHSGLIVNDAFDIWGQGTMTVVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFSFSSYTMWVRQAPGKGLEWVATISG GGRDIIYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVLLTGRVYFALDSWGQGTTLTVSSASVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGEC
117	важкий ланцюг з 2 +2 PD1/LAG3 9010 на основі PD1(0376)/ aLAG3(MDX25F7)	QVQLQQWAGALLKPSETLSLTCVYGGSFSDYYWNWIRQ PPGKGLEWIGEINHNGNTNSNP SLKSRVTLSDTSKNQFSL KLRSVTAADTAVYYCAFGYSDYEYNWFDWPWGQGTTLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFSFSSYTMWVRQAPGKGLEWVATISG GGRDIIYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCVLLTGRVYFALDSWGQGTTLTVSSASVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGEC
118	важкий ланцюг 1 з 2 +1 PD1/LAG3 8310 на основі aLAG3(0414)/PD1 (0376)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFI DDYTMNWVRQA PGKGLEWVAVISWDGGGTYTDSVKGRFTISRDDFKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGLTDTTLYGSDYWGGQGTTLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMWVRQAPGKGLEWVATIS GGGRDIIYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCVLLTGRVYFALDSWGQGTTLTVSSASVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNREGEC
119	важкий ланцюг 2 з 2+1 PD1/LAG3 8310	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFI DDYTMNWVRQA PGKGLEWVAVISWDGGGTYTDSVKGRFTISRDDFKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGLTDTTLYGSDYWGGQGTTLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS

Таблиця С (послідовності):

	Назва	Послідовність
		WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPISRDEL KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
120	важкий ланцюг 1 з 2 +1 PD1/LAG3 8311 на основі aLAG3(0416)/PD1 (0376)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAASGFTFSDYAMSWVRQ APGKGLEWVSGIDNSGYTYTDSVKGRFTISRDDVKNTLY LQMNSLRAEDTAVYLCTKTHSGLIVNDAFDIWGQGMVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES QPGGSLRLSACAASGFSFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVATIS GGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCVLLTGRVYFALDSWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
121	важкий ланцюг 2 з 2 +1 PD1/LAG3 8311	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAASGFTFSDYAMSWVRQ APGKGLEWVSGIDNSGYTYTDSVKGRFTISRDDVKNTLY LQMNSLRAEDTAVYLCTKTHSGLIVNDAFDIWGQGMVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPISRDEL KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
122	важкий ланцюг 1 з 2 +1 PD1/LAG3 1252 на основі aLAG3(25F7)/PD1 (0376)	QVQLQWAGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQ PPGKGLEWIGEINHNGNTNSNPSLKSRLTSLDTSKNQFSL KLRSVTAADTAVYYCAFGYSDYEYNWFDWPWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES QPGGSLRLSACAASGFSFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVATIS GGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCVLLTGRVYFALDSWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
123	важкий ланцюг 1 з 2 +1	EVQLLES QPGGSLRLSACAASGFI DDYTMNWVRQA

Таблиця С (послідовності):

	Назва	Послідовність
	PD1/LAG3 8312 на основі aLAG3(0414)/PD1 (0376)	PGKGLEWVAVISWDGGGTYTDSVKGRFTISRDDFKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGLTDTTLYGSDYWGGQGLTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDS LAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIHWYQQKPGQSPKLLI YRSSTLESQVGPDRFSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYCQ QNYDVPWTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSSWVRQAP GKGLEWVATISGGGRDIYYPDSSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDDKVEPKSC
124	важкий ланцюг 1 з 2 +1 PD1/LAG3 8313 на основі aLAG3(0416)/PD1 (0376)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAASGFTFSDYAMSWVRQ APGKGLEWVSGIDNSGYTYTDSVKGRFTISRDDVKNNTLY LQMNSLRAEDTAVYLCTKTHSGLIVNDAFDIWGGQGMVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDS LAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIHWYQQKPGQSPKLLI YRSSTLESQVGPDRFSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYCQ QNYDVPWTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSSWVRQAP GKGLEWVATISGGGRDIYYPDSSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDDKVEPKSC
125	важкий ланцюг 1 з 2 +1 PD1/LAG3 1088 на основі aLAG3(25F7)/PD1 (0376)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVAVYGGSFSDYYWNWIRQ PPGKGLEWIGEINHNGNTNSNPSLKSRTLSLDTSKNQFSL KLRSVTAADTAVYYCAFGYSDYEYNWFDWPWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD

Таблиця С (послідовності):

	Назва	Послідовність
		SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDS LAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIHWYQQKPGQSPKLLI YRSSTLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ QNYDVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMWSVRQAP GKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
126	важкий ланцюг 1 з 2 +1 PD1/LAG3 0918 на основі aLAG3(25F7)/PD1 (0376)	QVQLQQWAGALLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQ PPGKGLEWIGEINHNGNTNSNP SLKSRVTLSDTSKNQFSL KLRSVTAADTAVYYCAFGYSDYEYNWFDWPWGQGT LVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDEL KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGG LVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMWSVRQAPGKGLEWVA TISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LVTVSS
127	важкий ланцюг 2 з 2+1 PD1/LAG3 0918	QVQLQQWAGALLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQ PPGKGLEWIGEINHNGNTNSNP SLKSRVTLSDTSKNQFSL KLRSVTAADTAVYYCAFGYSDYEYNWFDWPWGQGT LVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDS LAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIHWYQQKPGQSPKLLI YRSSTLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ QNYDVPWTFGQGTKVEIK
128	PD1 людини	номер доступу UniProt Q15116 MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPTTFSPA LLVVTEDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWMYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFSPGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL
129	Пептидний лінкер G4S	GGGGG
130	Пептидний лінкер (G4S) ₂	GGGGSGGGG
131	Пептидний лінкер (SG4) ₂	SGGGGSGGGG

Таблиця С (послідовності):

	Назва	Послідовність
132	Пептидний лінкер (G4S)2G4	GGGGSGGGGSGGGG
133	Пептидний лінкер	GSPGSSSSGS
134	Пептидний лінкер (G4S) ₃	GGGGSGGGGSGGGGS
135	Пептидний лінкер (G4S) ₄	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
136	Пептидний лінкер	GS GSGSGS
137	Пептидний лінкер	GS GSGNGS
138	Пептидний лінкер	GS GSGSGG
139	Пептидний лінкер	GS GSGG
140	Пептидний лінкер	GS SG
141	Пептидний лінкер	GS GNGSG
142	Пептидний лінкер	GS NGSGG
143	Пептидний лінкер	GS NGSG
144	важкий ланцюг 2 з 1+1 PD1/LAG3 0725 (транс 1 +1) на основі LAG3(0414)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQ LLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFI FDDYTMNWVRQAPGK GLEWVAVISWDGGGTYYTDSVKGRFTISRDDFKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKGLTDTTLYGSDYWGGGTLTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
145	важкий ланцюг 2 з 2+1 PD1/LAG3 0750 (транс 2+1) на основі LAG3(0414)	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFI FDDYTMNWVRQA PGKGLEWVAVISWDGGGTYYTDSVKGRFTISRDDFKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGLTDTTLYGSDYWGGGTLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRL SCAASGFI FDDYTMNWVRQAPGKGLEWVAVISWDGGGT YTDSDVKGRFTISRDDFKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGL TDTTLYGSDYWGGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEP KSC
146	Легкий ланцюг "CEA _{2F1} " (CEA TCB)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAGVTYVAWYQQKPK GKAPKLLIYSAS YRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
147	Легкий ланцюг гуманізованого CD3 _{CH2527} (Crossfab, VL-CH1) (CEA TCB)	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGA QPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC
148	CEA _{CH1A1A 98/99} - гуманізоване CD3 _{CH2527}	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQ APGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFITDTSTSTA

Таблиця С (послідовності):

	Назва	Послідовність
	(Crossfab VH-Ск)- Fc(виступ) P329GLALA (CEA TCB)	Y MELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGT T V T VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQ LLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT L V T VSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC DKHTCPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
149	CEA _{CH1A1A 98/99} (VH-CH1)- Fc(отвір) P329GLALA (CEA TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQ APGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTA Y MELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGT T V T VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
150	CD3 VH-CL (CEACAM5 TCB)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQ APGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVT VSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
151	Гуманізоване CEA VH- CH1(EE)-Fc (отвір, P329G LALA) (CEACAM5 TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQ APGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTA Y MELSSLRSED TAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGT L V T SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPCPAPEAAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSP
152	гуманізоване CEA VH- CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (виступ, P329G LALA) (CEACAM5 TCB)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQ APGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTA Y MELSSLRSED TAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGT L V T SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDGGGGSGGGGSQAVV TQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQ AFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD

Таблиця С (послідовності):

	Назва	Послідовність
		KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
153	гуманізоване CEA VL- CL(RK) (CEACAM5 TCB)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQ QKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLE PEDFAVYYCQQTNEPYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
154	CEA-HCDR1	EFGMN
155	CEA-HCDR2	WINTKTGEATYVEEFGK
156	CEA-HCDR3	WDFAYYVEAMDY
157	CEA-LCDR1	KASAAVGTYVA
158	CEA-LCDR2	SASYRKR
159	CEA-LCDR3	HQYYTYPLFT
160	CEA VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNVWRQ APGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFGKRVTFITDTSTSTA YMERLSRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVT VSS
161	CEA VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQK GKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIK
162	CEA-HCDR1 (CEACAM5)	DTYMH
163	CEA-HCDR2 (CEACAM5)	RIDPANGNSKYVPKFQG
164	CEA-HCDR3 (CEACAM5)	FGYYVSDYAMAY
165	CEA-LCDR1 (CEACAM5)	RAGESVDIFGVGFLH
166	CEA-LCDR2 (CEACAM5)	RASNRAT
167	CEA-LCDR3 (CEACAM5)	QQTNEPYPY
168	CEA VH (CEACAM5)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHVWRQ APGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTA YMERSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLLTV SS
169	CEA VL (CEACAM5)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQ QKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLE PEDFAVYYCQQTNEPYPYTFGQGTKLEIK

Наступні пронумеровані абзаци (пункти) описують аспекти цього винаходу:

1. Біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з білком запрограмованої смерті клітин 1 (PD1), і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з геном активації лімфоцитів-3 (LAG3), причому
- 5 зазначений перший антигензв'язуючий домен, специфічно зв'язується з PD1, містить: домен VH, що містить:
 - (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 1,
 - (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 2, і
 - 10 (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 3; і домен VL, що містить:
 - (i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 4;
 - (ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 5, і
 - 15 (iii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6.
2. Біспецифічне антитіло за п. 1, яке відрізняється тим, що біспецифічне антитіло містить Fc-домен, який являє собою Fc-домен IgG, зокрема, Fc-домен IgG1 або Fc-домен IgG4, і при цьому Fc-домен містить одну або більше амінокислотних замінів, які зменшують зв'язування з Fc-рецептором, зокрема, з Fcγ-рецептором.
3. Біспецифічне антитіло за п. 1 або 2, який відрізняється тим, що другий антигензв'язуючий

амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37, або

(d) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 44, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 45, або

5 (e) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53.

6. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-4, яке відрізняється тим, що другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, містить:

(a) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 54, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 55, або

10 (b) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 62, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 63, або

(c) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 64, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 65, або

15 (d) домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 66, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 67.

7. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-5, яке відрізняється тим, що

перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10,

20 другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 20, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21, або домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 52, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 53.

8. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-5, яке відрізняється тим, що

25 перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10,

другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 20, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21.

9. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-4 або 6, яке відрізняється тим, що

перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10,

35 другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, містить домен VH, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 56, і домен VL, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 57.

10. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-5, яке відрізняється тим, що біспецифічне антитіло являє собою гуманізоване або химерне антитіло.

40 11. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-10, яке відрізняється тим, що біспецифічне антитіло містить Fc-домен підкласу IgG1 людини з амінокислотними мутаціями L234A, L235A і P329G (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

12. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-11, яке відрізняється тим, що біспецифічне антитіло містить Fc-домен, що містить модифікацію, яка сприяє асоціації першої та другої субодиниць Fc-домену.

45 13. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-12, яке відрізняється тим, що перша субодиниця Fc-домену містить виступи, а друга субодиниця Fc-домену містить отвори відповідно до способів "виступи-в-отвори".

14. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-13, яке відрізняється тим, що перша субодиниця Fc-домену містить амінокислотні заміни S354C і T366W (нумерація EU), а друга субодиниця Fc-домену містить амінокислотні заміни Y349C, T366S і Y407V (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

50 15. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-14, яке відрізняється тим, що біспецифічне антитіло містить Fc-домен, перший Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, і другий Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3.

16. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-15, яке відрізняється тим, що в одному з Fab-фрагментів варіабельні домени VL і VH замінені один на одного, так що домен VH є частиною легкого ланцюга, а домен VL є частиною важкого ланцюга.

60 17. Біспецифічне антитіло за пп. 15 або 16, який відрізняється тим, що в першому Fab-

фрагменті, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, варіабельні домени VL і VH замінені один на одного.

18. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-17, яке відрізняється тим, що біспецифічне антитіло містить Fab-фрагмент, при цьому в константному домені CL амінокислота в положенні 124 незалежно заміщена лізином (K), аргініном (R) або гістидином (H) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом), а в константному домені CH1 амінокислоти в положеннях 147 і 213 незалежно заміщені глутаміною кислотою (E) або аспарагіною кислотою (D) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

19. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 15-18, яке відрізняється тим, що в другому Fab-фрагменті міститься антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, у константному домені CL амінокислота в положенні 124 незалежно заміщується лізином (K), аргініном (R) або гістидином (H) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом), а в константному домені CH1 амінокислоти в положеннях 147 і 213 незалежно заміщують глутаміною кислотою (E) або аспарагіною кислотою (D) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

20. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-19, що містить:

(а) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 96, перший легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 98,

20 (б) другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 97, і другий легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 99, або

25 (б) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 96, перший легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 98,

другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 100, і другий легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 101, або

30 (с) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 102, перший легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 104,

35 (д) другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 103, і другий легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 105, або

40 (д) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 106, перший легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 107,

45 (е) другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 103, і другий легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 105.

21. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-19, яке відрізняється тим, що біспецифічне антитіло містить третій Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3.

50 22. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-19 або 21, який відрізняється тим, що два Fab-фрагменти, кожен з яких містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, є ідентичними.

23. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-19 або 21, або 22, яке відрізняється тим, що Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, злитий через пептидний лінкер з С-кінцем одного з важких ланцюгів.

55 24. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-19 або 21-23, що містить:

(а) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 118, перший легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 115,

60 (б) другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 %

ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 119, і другий легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 101, або

(b) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 120, перший легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 115,

другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 121, і другий легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 99, або

(c) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 122, перший легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 115,

другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 103, і другий легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 105.

25. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-19 або 21-23, яке відрізняється тим, що біспецифічне антитіло містить четвертий Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1.

26. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-19 або 21-23, або 25, яке відрізняється тим, що два Fab-фрагменти, кожен з яких містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, є ідентичними.

27. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-19, або 21-23, або 25, або 26, який відрізняється тим, що кожний з двох Fab-фрагментів, містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, и при цьому кожен злитий через пептидний лінкер з С-кінцем одного з важких ланцюгів, відповідно.

28. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-19 або 21-23, або 25-27, що містить:

(a) два важкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 114, два перші легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 115, і два других легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 101, або

(b) два важкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 116, два перші легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 115, і два других легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 99, або

(c) два важкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 117, два перші легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 115, і два других легкі ланцюги, що містять амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 105.

29. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-14, яке відрізняється тим, що біспецифічне антитіло містить Fc-домен, два Fab-фрагменти, кожен з яких містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, і одноланцюговий Fab (scFab), що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1.

30. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-14 або 29, який відрізняється тим, що scFab, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, злитий через пептидний лінкер з С-кінцем одного з важких ланцюгів.

31. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-14, або 29, або 30, що містить:

(a) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 123, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 119, і два легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 101, або

(b) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 124, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну

послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 121, і два легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 99, або

(с) перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 125, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 103, і другий легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 105.

32. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-14, яке відрізняється тим, що біспецифічне антитіло містить Fc-домен, два Fab-фрагменти, кожен з яких містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, і домен VH і VL, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1.

33. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-14 або 32, яке відрізняється тим, що домен VH антигензв'язуючого домену, який специфічно зв'язується з PD1, злитий через пептидний лінкер з C-кінцем одного з важких ланцюгів, і домен VL антигензв'язуючого домену, який специфічно зв'язується з PD1, злитий через пептидний лінкер з C-кінцем іншого важкого ланцюга.

34. 1-14, або 32, або 33, що містить перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 126, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 127, і два легкі ланцюги, кожен з яких містить амінокислотну послідовність щонайменше з 95 % ідентичністю до послідовності SEQ ID NO: 109.

35. Полінуклеотид, що кодує біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-34.

36. Вектор, зокрема, вектор експресії, що містить полінуклеотид за п. 35.

37. Прокаріотична або еукаріотична клітина-хазяїн, що містить полінуклеотид за п. 35 або вектор за п. 36.

38. Спосіб отримання біспецифічного антитіла за пп. 1-34, що включає культивування клітини-хазяїна за п. 37 в умовах, які підходять для експресії біспецифічного антитіла, і виділення біспецифічного антитіла з культури.

39. Фармацевтична композиція, яка містить біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-34 і щонайменше один фармацевтично прийнятний наповнювач.

40. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-34 або фармацевтична композиція за п. 39 для застосування в якості лікарського засобу.

41. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-34 або фармацевтична композиція за п. 39 для застосування

i) при модуляції імунних відповідей, таких як відновлення активності Т-клітин,

ii) при стимуляції Т-клітинної відповіді,

iii) при лікуванні інфекцій,

iv) при лікуванні онкологічного захворювання,

v) для затримки прогресування онкологічного захворювання,

vi) в продовженні життя пацієнта, що страждає на онкологічне захворювання.

42. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-34 або фармацевтична композиція за п. 39 для застосування в профілактиці або лікуванні онкологічного захворювання.

43. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-34 або фармацевтична композиція за п. 39 для застосування в профілактиці або лікуванні хронічної вірусної інфекції.

44. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-34 або фармацевтична композиція за п. 39 для застосування в профілактиці або лікуванні онкологічного захворювання, які відрізняються тим, що біспецифічне антитіло вводять у комбінації з хіміотерапевтичним агентом, опроміненням та/або іншими агентами для застосування в імунотерапії онкологічного захворювання.

45. Спосіб інгібування росту пухлинних клітин у індивідуума, що включає введення індивідууму ефективної кількості біспецифічного антитіла за будь-яким із пп. 1-34 для пригнічення росту пухлинних клітин.

ПРИКЛАДИ

Нижче наведені приклади способів і композицій відповідно до винаходу. Зрозуміло, що різні інші варіанти здійснення можуть бути здійснені на практиці, враховуючи загальний опис, наведений вище.

Матеріали і загальні способи

Загальна інформація про нуклеотидні послідовності легких і важких ланцюгів імуноглобулінів людини наведена в: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed.,

Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Амінокислоти ланцюгів антитіл пронумеровані і позначені відповідно до системами нумерації за Кабатом (Kabat, EA, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)), як визначено вище.

5 Технології рекомбінантної ДНК

Для виконання маніпуляції з ДНК використовували стандартні методи, як описано в Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Молекулярно-біологічні реагенти використовували відповідно до інструкцій виробника.

10 Синтез генів

Необхідні сегменти генів отримували з олігонуклеотидів, отриманих за допомогою хімічного синтезу. Сегменти генів довжиною 600-1800 п. н., що були фланковані одиничними сайтами розщеплення ендонуклеази рестрикції, були зібрані шляхом відпалу і лігування олігонуклеотидів, включаючи ампліфікацію ПЛР, і пізніше клоновані через зазначені сайти рестрикції, наприклад, KpnI / SacI або AscI / PacI в клонуючий вектор pGA4 на основі pPCRScript (Stratagene). Послідовності ДНК субклонуваних фрагментів гена підтверджували за допомогою секвенування ДНК. Фрагменти для синтезу генів замовляли відповідно до наведених описів в Geneart (Регенсбург, Німеччина).

Визначення послідовності ДНК

20 Послідовності ДНК визначали шляхом секвенування дволанцюгової ДНК, що проводилось в MediGenomix GmbH (Мартінсрид, Німеччина) або Sequiserve GmbH (Фатерштеттен, Німеччина).

Аналіз послідовності ДНК і білка й управління даними послідовності

Пакет програмного забезпечення GCG (Genetics Computer Group, Медісон, штат Вісконсін) версії 10.2 і пакет Infomax Vector NT1 Advance suite версії 8.0 використовували для створення послідовностей, картування, аналізу, анотації та ілюстрації.

Вектори експресії

Для експресії описаних антитіл були застосовані варіанти плазмід експресії для транзійтної експресії (наприклад, в HEK293) в клітинах, заснованих або на організації кДНК з промотором ЦМВ-інтрон А чи без нього, або на геномній організації з промотором ЦМВ.

30 Крім касети експресії антитіл вектори містили:

- точку початку реплікації, яка забезпечує реплікацію цієї плазмід в *E. coli*, і

- ген β-лактамази, який надає стійкості до ампіциліну в *E. coli*.

Транскрипційна одиниця гена антитіла складалася з наступних елементів:

- 35 - унікальний (i) сайт (и) рестрикції на 5'-кінці

- негайно-ранній енхансер і промотор з цитомегаловірусу людини,

- з наступною послідовністю інтрону А в разі організації кДНК,

- 5'-нетрансльована область гена антитіла людини,

- сигнальна послідовність важкого ланцюга імуноглобуліну,

40 - ланцюг людського антитіла (дикого типу або з обміном доменів) або у вигляді кДНК, або у вигляді геномної організації з екзон-інтронною організацією імуноглобуліну

- 3'-нетрансльована область з сигнальною послідовністю поліаденілювання, і

- унікальний (i) сайт (и) рестрикції на 3'-кінці.

Злиті гени, що містять ланцюги антитіл, як описано нижче, генерували за допомогою ПЛР та/або синтезу генів і збирали відомими рекомбінантними способами і методиками шляхом з'єднання відповідних сегментів нуклеїнової кислоти, наприклад, використовуючи унікальні сайти рестрикції у відповідних векторах. Субклонувані послідовності нуклеїнових кислот були перевірені за допомогою секвенування ДНК. Для транзійтних трансфекцій великі кількості плазмід отримували шляхом виготовлення препаратів плазмід з трансформованих культур *E. coli* (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

50 Методи культивування клітин

Використовували стандартні методи культивування клітин використовували, як описано в Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

55 Мультиспецифічні антитіла експресували шляхом тимчасової транзійтної котрансфекції відповідних плазмід експресії в адгезивно зростаючих HEK293-EBNA або в клітинах HEK29-F, що ростуть в суспензії, як описано нижче.

Транзійтні трансфекції в системі HEK293

60 Усі антитіла і біспецифічні антитіла були отримані шляхом транзійтної трансфекції клітин 293F з використанням системи Freestyle (ThermoFisher). У ній клітини 293F культивували в середовищі F17, трансфікували 293Free (Novagene) і через 4 години підживлювали 4 мМ VPA і

компонентом Feed 7 і 0,6 % глюкозою через 16 годин. Крім того, був використаний набір для системи експресії Expi293F™ Expression System Kit (ThermoFisher). У ній клітини Expi293F™ культивували в середовищі для експресії Expi293™ і трансфікували з використанням набору для трансфекції ExpiFectamine™ 293 відповідно до інструкцій виробника. Через покращену стабільність і чистоту та зменшену тенденцію до агрегації біспецифічних антитіл CrossMab^{vh-vl} з додатково введеними зарядженими парами амінокислот на поверхні взаємодії CH1/CL (див. положення у відповідних послідовностях для отримання додаткової інформації) ніяких змін співвідношення плазмід не застосовували. Тому відносне співвідношення плазмід 1:1:1:1 для 1+1 CrossMab або 1:1:1 для 2+2 CrossMab використовували для спільної трансфекції плазмід з LC, HC, кросоверним LC і кросоверним HC. Клітинні супернатанти збирали через 7 діб та очищали за допомогою стандартних способів.

Визначення білка

Концентрацію білка в очищених антитілах і похідних визначали шляхом визначення оптичної щільності (ОЩ) за 280 нм, використовуючи молярний коефіцієнт екстинкції, розрахований на основі амінокислотної послідовності відповідно до Pace, et al., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423.

Визначення концентрації антитіл в супернатантах

Концентрацію антитіл і похідних у супернатантах клітинних культур оцінювали за допомогою імунопреципітації з використанням гранул агарози з білком А (Roche). 60 мкл агарозних гранул з білком А промивають тричі в TBS-NP40 (50 мМ Трис, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 1 % Нонідет-Р40). Потім 1-15 мл супернатанту клітинної культури наносять на агарозні гранули з білком А, попередньо врівноважені в TBS-NP40. Після інкубації протягом 1 год за кімнатної температури гранули промивають на фільтраційній колонці Ultrafree-MC (Amicon) один раз 0,5 мл TBS-NP40, двічі 0,5 мл 2х фосфатно-сольового буфера (2×ФСБ, Roche) та короткочасно чотири рази 0,5 мл 100 мМ Na-цитратом pH 5,0. Зв'язане антитіло елюють додаванням 35 мкл буфера для зразків NuPAGE® LDS (Invitrogen). Половину зразка об'єднують з відновлюючим агентом для зразка NuPAGE® або залишають невідновленим, відповідно, і нагрівають протягом 10 хв. за 70 °C. Потім 5-30 мкл наносять на 4-12 % Біс-Трис ДСН-ПААГ NuPAGE® (Invitrogen) (з буфером MOPS для електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію (ДСН-ПААГ) у невідновлювальних умовах із буфером MES з антиоксидантною добавкою для рухомого буфера NuPAGE® (Invitrogen) для ДСН-ПААГ-електрофорезу у відновлювальних умовах) і забарвлюють Кумасі синім.

Концентрацію антитіл і похідних у супернатантах клітинних культур кількісно вимірювали за допомогою афінної ВЕРХ хроматографії. Коротко, супернатанти клітинних культур, що містять антитіла і похідні, які зв'язуються з білком А, наносили на колонку Applied Biosystems Poros A/20 в 200 мМ КН₂РO₄, 100 мМ цитрату натрію, pH 7,4 і елюювали з матриці з використанням 200 мМ NaCl, 100 мМ лимонної кислоти, pH 2,5 в системі Agilent HPLC 1100. Елюований білок визначали кількісно за поглинанням в УФ-спектрі та інтеграції площ піків. Очищене стандартне IgG1-антитіло слугувало стандартом.

Альтернативно, концентрацію антитіл і похідних у супернатантах клітинної культури вимірювали за допомогою сендвіч-IgG-ІФА. Коротко, 96-лункові мікротитраційні планшети StreptaWell з високим зв'язуванням стрептавідину А (Roche) покривають 100 мкл/лунка біотинільованою молекулою для захоплення F(ab')₂<h-Fcγ> BI (Dianova) проти IgG людини у концентрації 0,1 мкг/мл протягом 1 години за кімнатної температури або, альтернативно, протягом ночі за 4 °C, і потім тричі промивають 200 мкл/лунку ФСБ, 0,05 % твіном (PBST, Sigma). 100 мкл/лунка серійних розведень у ФСБ (Sigma) відповідних супернатантів клітинних культур, що містять антитіло, додавали в лунки і інкубували протягом 1-2 годин на шейкері для мікротитраційних планшетів за кімнатної температури. Лунки промивали три рази 200 мкл/лунка PBST, і зв'язане антитіло детектували за допомогою 100 мкл F(ab')₂<h-Fcγ>POD (Dianova) в концентрації 0,1 мкг/мл як антитіла для виявлення протягом 1-2 годин на шейкері для мікротитраційних планшетів за кімнатної температури. Незв'язане детектуюче антитіло тричі промивали за допомогою 200 мкл/лунка PBST, і зв'язане детектуюче антитіло детектували шляхом додавання 100 мкл ABTS/лунка. Визначення поглинання здійснювали на спектрометрі Tecan Fluor при довжині хвилі вимірювання 405 нм (еталонна довжина хвилі 492 нм).

Очищення білка

Білки очищали від фільтрованих супернатантів клітинних культур у відповідності зі стандартними протоколами. Коротко, антитіла наносили на колонку з білком А-сефарозою (GE Healthcare) і промивали ФСБ. Елювання антитіл виконували за pH 2,8 з наступною негайною нейтралізацією зразка. Агрегований білок відокремлювали від мономерних антитіл за допомогою ексклюзійної хроматографії (Superdex 200, GE Healthcare) у ФСБ або в 20 мМ

гістидину, 150 мМ NaCl, pH 6,0. Фракції мономерних антитіл об'єднували, концентрували (якщо необхідно), наприклад, з використанням відцентрового концентратора MILLIPORE Amicon Ultra (Номмо (номінальне відсікання за молекулярною масою) 30), заморожували і зберігали при -20 °C або -80 °C. Частину зразків забезпечували для подальшого аналізу білка і аналітичного визначення характеристик, наприклад, за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу, ексклюзійної хроматографії (ЕХ) або мас-спектрометрії.

ДСН-ПААГ-електрофорез

Гелеву систему NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) використовували відповідно до інструкції виробника. Зокрема, використовували 10 % або 4-12 % гелі NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (pH 6,4) і NuPAGE® MES (відновлені гелі з антиоксидантною добавкою для рухомого буфера NuPAGE®) або рухомий буфер MOPS (невідновлені гелі).

Аналітична ексклюзійна хроматографія

Ексклюзійну хроматографію (ЕХ) для визначення агрегації і олігомерного стану антитіл проводили методом ВЕРХ хроматографії. Коротко, антитіла, очищені білком А, наносили на колонку Tosoh TSKgel G3000SW в 300 мМ NaCl, 50 мМ $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,5 на системі Agilent HPLC 1100 або на колонку Superdex 200 (GE Healthcare) в 2×ФСБ на системі Dionex HPLC. Елюйований білок визначали кількісно по поглинанню в УФ-спектрі і інтеграції площ піків. Стандарт для гель-фільтрації BioRad 151-1901 слугував в стандарті.

Мас-спектрометрія

У цьому розділі описується характеристика мультиспецифічних антитіл з обміном VH/VL (VH/VL CrossMab) з акцентом на їхню правильну збірку. Очікувані первинні структури були проаналізовані за допомогою мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням (IEP-МС) деглікозильованих інтактних CrossMab і деглікозильованих / розщеплених плазміном або альтернативно деглікозильованих / обмежено розщеплених LysC CrossMab.

VH/VL CrossMab піддавали деглікозильованню N-глюкозидазою F у фосфатному буфері або трис-буфері за 37 °C протягом до 17 годин за концентрації білка 1 мг/мл. Розщеплення плазміном або обмежене розщеплення LysC (Roche) проводили з використанням 100 мкг деглікозильованих VH/VL CrossMab у трис-буфері, pH 8, за кімнатної температури протягом 120 годин і за 37 °C протягом 40 хвилин, відповідно. Перед мас-спектрометрією зразки знесолювали за допомогою ВЕРХ на колонці з сефадексом G25 (GE Healthcare). Загальна маса була визначена за допомогою IEP-МС на системі MS MAXIS 4G UHR-QTOF (Bruker Daltonik), обладнаною джерелом TriVersa NanoMate (Advion).

Визначення зв'язування і афінності зв'язування мультиспецифічних антитіл з відповідними антигенами з використанням поверхневого плазмонного резонансу (ППР) (BIAcore)

Зв'язування отриманих антитіл з відповідними антигенами досліджують за допомогою поверхневого плазмонного резонансу з використанням приладу BIAcore (GE Healthcare Biosciences AB, Упсала, Швеція). Відповідне програмне забезпечення BIAcore Evaluation Software використовується для аналізу сенсограм і для розрахунку даних афінності.

Приклад 1

Отримання анти-PD-1 антитіл

Імунізація мишей

Мишей NMRI імунізували генетично, використовуючи вектор експресії плазмиди, що кодує повнорозмірний людський PD-1, шляхом внутрішньошкірного введення 100 мкг векторної ДНК (plasmid15300_hPD1-fl) з подальшою електропорацією (2 квадратних імпульси по 1000 В/см, тривалість 0,1 мс, інтервал 0,125 с, за яким слідує 4 квадратних імпульси 287,5 В/см, тривалість 10 мс, інтервал 0,125 с. Миші отримували по 6 послідовних імунізацій на 0, 14, 28, 42, 56, 70 і 84 добу. Кров відбирали на 36, 78 і 92 добу і отримували сироватку, яку використовували для визначення титру за допомогою ІФА (див. нижче). Тварин з найвищими титрами відбирали для повторної імунізації на 96 добу шляхом внутрішньовенної ін'єкції 50 мкг рекомбінантної химери людський PD1 - людський Fc, і через 3 доби після повторної імунізації виділяли моноклональні антитіла за технологією гібридоми шляхом злиття спленоцитів клітинної лінії мієломи.

Визначення сироваткових титрів (ІФА)

Химеру людського рекомбінантного PD1 з Fc людини іммобілізували на 96-лунковому планшеті NUNC Maxisorp в концентрації 0,3 мкг/мл, 100 мкл/лунка у ФСБ з подальшим: блокуванням планшета 2 % кротейну С у ФСБ, 200 мкл/лунка; застосуванням серійних розведень антисироваток у двох повторностях, у 0,5 % кротейну С у ФСБ, 100 мкл/лунка; виявленням за допомогою HRP-кон'югованого козячого антимишачого антитіла (Jackson ImmunoResearch/Dianova 115-036-071; 1/16000). Для всіх етапів планшети інкубували протягом 1 год за 37 °C. Між усіма етапами планшети промивали 3 рази 0,05 % Твіна 20 у ФСБ. Сигнал

посилювали шляхом додавання розчинного субстрату BM Blue POD (Roche), 100 мкл/лунка; і зупиняли додаванням 1 М HCl, 100 мкл/лунка. Оптичну щільність зчитували за 450 нм проти еталону 690 нм. Титр визначали як розведення антисироватки, що приводить до напівмаксимального сигналу.

5 Приклад 2

Характеристика анти-PD1 антитіл/ в'язування анти-PD1 антитіл з людським PD1

ІФА для hu PD1

Покриті стрептавідином планшети Nunc maxisorp (MicroCoat, № 11974998001), покривали 25 мкл/лунка біотинільованого PD1-ECD-AviHis і інкубували за 4 °C протягом ночі. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл зразків анти-PD1 або еталонних антитіл (людські анти-PD1; Roche/мишачі анти-PD1; Biolegend; кат.: 329912) і інкубували протягом 1 год. за кімнатної температури. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка козячого антилюдського H + L-POD (JIR, JIR109-036-088) / овечого антимишачого-POD (GE Healthcare; NA9310) у розведенні 1:2000/1:1000 і інкубували за кімнатної температури протягом 1 години на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка субстрату TMB (Roche, кат. № 11835033001) та інкубували до досягнення ОЩ 2–3. Вимірювання проводили за 370/492 нм.

Результати ІФА наведені у вигляді значень EC_{50} [нг/мл] у зведених Таблицях 1 і 2 нижче.

Клітинний ІФА для PD1

Адгезивну клітинну лінію CHO-K1, стабільно трансфіковану плазмідом 15311_hPD1-fl_pUC_Neo, що кодує повнорозмірний людський PD1, і селекцію з G418 (маркер стійкості до неоміцину в плазміді) висівали в концентрації $0,01 \times 10^6$ клітин/лунка в 384-лункові планшети з плоским дном і культивували протягом ночі.

На наступну добу додавали 25 мкл/лунка зразка PD1 або еталонного антитіла проти PD1 людини (Roche)/проти PD1 миші (Biolegend; кат.: 329 912) і інкубували протягом 2 годин за 4 °C (щоб уникнути інтерналізації). Після ретельного промивання (1×90 мкл/лунка PBST) клітини фіксували додаванням 30 мкл/лунка 0,05 % глутаральдегіду (Sigma, кат. №: G5882, 25 %), розведеного в буфері 1×ФСБ, і інкубували протягом 10 хвилин за кімнатної температури. Після промивання (3×90 мкл/лунка PBST) для виявлення додавали 25 мкл/лунка вторинного антитіла: козячого антилюдського H + L-POD (JIR, JIR109-036-088) / овечого антимишачого POD (GE NA9310) з подальшою 1-годинною інкубацією за кімнатної температури на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка PBST) додавали 25 мкл/лунка розчину субстрату TMB (Roche 11835033001) та інкубували до досягнення ОП 1,0-2,0. Вимірювання в планшетах проводили за 370/492 нм.

Результати клітинного ІФА наведені у вигляді значень " EC_{50} CHO-PD1" [нг/мл] в Таблиці 2 нижче.

ІФА для PD1 яванського макака (суно)

Покриті стрептавідином планшети Nunc maxisorp (MicroCoat, № 11974998001), покривали 25 мкл/лунка біотинільованого PD1-ECD-AviHis і інкубували за 4 °C протягом ночі. Після промивання (3×90 мкл/лунка буфером PBST) додавали 25 мкл зразків анти-PD1 або еталонних антитіл (людське анти-PD1; Roche) та інкубували 1 год за кімнатної температури на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка козячого антилюдського H + L-POD (JIR, JIR109-036-088) у розведенні 1:1000 та інкубували за кімнатної температури протягом 1 год. на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка субстрату TMB (Roche, 11835033001) та інкубували до досягнення ОП 2 - 3. Вимірювання проводили за 370/492 нм.

Результати ІФА наведені у вигляді значень EC_{50} [нг/мл] в зведених Таблицях 1 і 2.

Аналіз заміни ліганда PD-L1

Покриті стрептавідином планшети Nunc maxisorp (MicroCoat, № 11974998001), покривали 25 мкл/лунка біотинільованого PD1-ECD-AviHis і інкубували за 4 °C протягом ночі. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл зразків анти-PD1 або еталонних антитіл (людські анти-PD1; Roche/мишачі анти-PD1; Biolegend; кат.: 329912) і інкубували 1 год. за кімнатної температури на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка PD-L1 (рекомбінантна химера B7-H1/PD-L1 Fc-людини; 156-B7, R & D) та інкубували 1 год. за кімнатної температури на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка козячого антилюдського H + L-POD (JIR, 109-036-088) у розведенні 1:1000 та інкубували за кімнатної температури протягом 1 год. на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка субстрату TMB (Roche, 11835033001) та інкубували до досягнення ОП 2 - 3. Вимірювання проводили за 370/492 нм.

Результати ІФА наведені у вигляді значень IC_{50} [нг/мл] в зведеній Таблиці 1 нижче.

Аналіз заміни ліганда PD-L2

Покриті стрептавідином планшети Nunc maxisorp (MicroCoat, № 11974998001), покривали 25 мкл/лунка біотинільованого PD1-ECD-AviHis і інкубували за 4 °С протягом ночі. Після промивання (3×90 мкл/лунка буфером PBST) додавали 25 мкл зразків анти-PD1 або еталонних антитіл (мишаче анти-huPD1; Roche) та інкубували 1 год. за кімнатної температури на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка PD-L2 (рекомбінантна химера B7-DC/PD-L2 Fc-людини; 1224-PL-100, R & D) та інкубували 1 год. за кімнатної температури на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка козячого антилюдського H + L-POD (JIR, 109-036-088) у розведенні 1: 2000 та інкубували за кімнатної температури протягом 1 год. на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка субстрату TMB (Roche, №11835033001) та інкубували до ОЩ 2-3. Вимірювання проводили за 370/492 нм.

Результати ІФА наведені у вигляді значень IC_{50} [нг/мл] у зведеній Таблиці 1 нижче.

Картування епітопів за допомогою ІФА / конкурентного аналізу зв'язування

Планшети Nunc Maxisorp (Nunc № 464718) покривали 25 мкл/лунка захоплюючого антитіла (козячий антимишиний IgG; JIR; 115-006-071) і інкубували протягом 1 години за кімнатної температури на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) планшети блокували протягом 1 години 2 % -ним буфером ФСБ, що містить БСА за кімнатної температури на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка буфером PBST) додавали 25 мкл зразків мишачого анти-PD1 та інкубували 1 год. за кімнатної температури на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) захоплююче антитіло блокували за допомогою 30 мкл/лунка мишачого IgG (JIR; 015-000-003) протягом 1 години за кімнатної температури на шейкері. У той самий час біотинільоване PD1-ECD-AviHis попередньо інкубували з другим зразком антитіл протягом 1 години за кімнатної температури на шейкері. Після промивання планшета для аналізу (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) суміш антитіл до PD1 переносили на планшет для аналізу і інкубували за кімнатної температури протягом 1 години на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка стрептавідину-POD (Roche, № 11089153001) у розведенні 1: 4000 і інкубували за кімнатної температури протягом 1 години на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка субстрату TMB (Roche, № 11089153001) та інкубували до досягнення ОЩ 1,5-2,5. Вимірювання проводили за 370/492 нм. Епітопні групи визначали за допомогою ієрархічної кластеризації проти еталонних антитіл.

Таблиця 1

Зв'язування, інгібування PD-L1 і групи епітопних областей типових антитіл (ІФА)

Антитіло	ІФА huPD1 EC_{50} [нг/мл]	ІФА cyPD1 EC_{50} [нг/мл]	Інгібування PD-L1 ІФА IC_{50} [нг/мл]	Інгібування PD-L2 ІФА IC_{50} [нг/мл]	Група епітопних областей (за конкурентним аналізом)
PD1-0050	17,9	9,8	128	34	1
PD1-0069	45,7	22,7	225	89	6
PD1-0073	15,1	8,3	124	65	5
PD1-0078	26,3	22,4	x	86	2
PD1-0098	50,8	54,6	174	45	5
PD1-0102	34,2	52,7	> 35,5 мкг/мл	140	4
PD1-0103	33,7	36,9	182	51	5

Таблиця 2

Біохімічне та клітинне зв'язування гуманізованих антитіл до PD1,
отриманих з вихідного мишачого антитіла PD1-0103 (ІФА)

Гуманізоване антитіло	ІФА huPD1 EC_{50} [нг/мл]	ІФА cyPD1 EC_{50} [нг/мл]	ІФА CHO-PD1 EC_{50} [нг/мл]
PD1-103-0312	11	8,3	10,1
PD1-103-0313	15	11	10,8
PD1-103-0314	11	8,3	7,7

Таблиця 2

Біохімічне та клітинне зв'язування гуманізованих антитіл до PD1,
отриманих з вихідного мишачого антитіла PD1-0103 (ІФА)

Гуманізоване антитіло	ІФА huPD1 ЕК ₅₀ [нг/мл]	ІФА суPD1 ЕК ₅₀ [нг/мл]	ІФА CHO-PD1 ЕК ₅₀ [нг/мл]
PD1-103-0315	10	7,9	7,3

Характеристика гуманізованих анти-PD-1 антитіл за допомогою Biacore

Аналіз на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) використовували для визначення кінетичних параметрів зв'язування між декількома мишачими PD1-зв'язуючими речовинами, а також між комерційними стандартами, що зв'язують людський PD1. Отже, антилюдський IgG був іммобілізований шляхом приєднання аміну до поверхні сенсорного чипу CM5 (Biacore). Потім проводили захоплення зразків і зв'язування з ними hu PD1-ECD. Поверхню сенсорного чипу регенерували після кожного циклу аналізу. У результаті отримували константу рівноваги та кінетичні константи швидкості шляхом підгонки даних до моделі взаємодії Ленгмюра 1:1.

Близько 2000 одиниць відповіді (ОВ) 20 мкг/мл антилюдського IgG (GE Healthcare, № BR-1008-39) були зв'язані з проточними комітками 1 і 2 (альтернативно: 3 і 4) сенсорного чипу CM5 в приладі Biacore T200 за pH 5,0 з використанням набору для амінного сполучення, що поставляється GE Healthcare.

Зразок і рухомий буфер являли собою HBS-EP + (0,01 М ГЕПЕС, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЕДТА, 0,05 % об./об. ПАВ P20, pH 7,4). Температура проточної комітки була встановлена на 25 °С, а температура у відсіку для зразка - 12 °С. Система була заповнена рухомих буфером.

Зразки вводили протягом 20 секунд з концентрацією 10 нМ і зв'язували з другою проточною коміткою. Потім повний набір концентрацій людського PD1-ECD (144 нМ, 48 нМ, 16 нМ, 5,33 нМ, 1,78 нМ, 0,59 нМ, 0,20 нМ і 0 нМ) вводили в кожен зразок протягом 120 с, після чого час дисоціації становив 30/300 с і дві стадії регенерації по 20 секунд з 3 М MgCl₂, з яких на останній була "додаткова промивка після ін'єкції" з рухомих буфером.

У результаті дані подвійного контролю були апроксимовані до моделі взаємодії Ленгмюра 1:1 з використанням програмного забезпечення Biacore T200 Evaluation. Отримані значення K_D, k_a і k_d наведені в Таблиці 3.

Таблиця 3

Константи кінетичної швидкості і константи рівноваги для химерного PD1-0103 і гуманізованих антитіл до PD1, визначені за допомогою Biacore

Ліганд	k _a [M ⁻¹ s ⁻¹]	k _d [s ⁻¹]	K _D [нМ]
химерне PD1-0103	3,86E+05	3,07E-04	0,8
PD1-0103-0312	1,95E+05	3,45E-04	1,8
PD1-0103-0313	1,60E+05	3,67E-04	2,3
PD1-0103-0314	1,87E+05	2,79E-04	1,5
PD1-0103-0315	1,89E+05	2,91E-04	1,5

Як показано в Таблиці 3, всі гуманізовані версії химерного PD1-0103 (створення див. у прикладі 6) демонструють кінетичні властивості, схожі з вихідним антитілом (химерне PD1-0103).

Кінетика

Сенсор CM5 серії S був встановлений в систему Biacore 4000, і точки виявлення були гідродинамічно приведені у відповідність до інструкцій виробника.

Поліклональне кроляче IgG-антитіло <IgGFCyM> R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) іммобілізували при 10000 ОВ в точках виявлення 1 і 5 в проточних комітках 1, 2, 3 і 4. Зв'язування здійснювали за допомогою сполуки EDC/NHS відповідно до інструкцій виробника. Точки, які залишилися в проточних комітках слугували еталоном. Буфер для зразків являв собою системний буфер з додаванням 1 мг/мл карбоксиметилдекстрана.

В одному варіанті здійснення аналіз проводили за 25 °С. В іншому варіанті здійснення аналіз проводили за 37 °С. 50 нМ кожного мишачого моноклонального антитіла захоплювали на поверхні сенсора шляхом введення протягом 1 хв. за 10 мкл/хв. Потім відповідні антигени

вводили в серії концентрацій 100 нМ, 2×33 нМ, 11 нМ, 4 нМ, 1 нМ і системний буфер 0 нМ при 30 мкл/хв. протягом 4 хв. під час фази асоціації. Дисоціацію контролювали протягом ще 4 хв. Систему захоплення оновлювали, використовуючи 3-хвилинну ін'єкцію 10 мМ гліцину рН 1,5 при 30 мкл/хв. Відповідні кінетичні дані були розраховані з використанням програмного забезпечення Biacore evaluation відповідно до інструкцій виробника.

Картування епітопів

Прилад Biacore 4000 був обладнаний сенсором Biacore CAP і був підготовлений відповідно до рекомендацій виробника. Буфер для приладу являв собою HBS-ET (10 мМ ГЕПЕС, рН 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0,005 % мас./об. Твін 20). Прилад запускали при 25 °С.

Усі зразки розводили в системному буфері. Біотинільований антиген 35 кДа PD1-ECD-AviHis був захоплений при 200 ОВ на поверхні сенсора CAP шляхом 1-хвилинної ін'єкції зі швидкістю 30 мкл/хв. в проточних комірках 1, 2, 3 і 4 в точках 1 і 5. Точки 2, 3 і 4 слугували еталоном. В іншому варіанті здійснення біотинільований антиген PD1-ECD-AviHis 35 кДа був захоплений при 200 ОВ на сенсорі CAP подібним чином.

Потім первинне антитіло вводили при 100 нМ протягом 3 хвилин зі швидкістю 30 мкл/хв. з подальшим введенням вторинного антитіла при 100 нМ протягом 3 хвилин при швидкості 30 мкл/хв. Первинне антитіло вводили до повного насичення поверхні представленого антигена. В кінці фаз звіту про первинне і вторинне введення антитіл були встановлені точки "пізнього зв'язування" (BL) для моніторингу реакції зв'язування відповідних антитіл. Молярне співвідношення розраховували як відношення між відповіддю зв'язування вторинного антитіла "BL2" і відповіддю первинного антитіла "BL1". Молярне відношення використовували як індикатор доступності антигена вторинного антитіла, коли антиген вже утворював комплекс з первинним антитілом.

Комплекси повністю видаляли з поверхні сенсора шляхом введення протягом 2 хв. за 30 мкл/хв. буфера для регенерації 2М гуанідин-HCL 250 мМ NaOH, як рекомендовано виробником, з подальшим введенням протягом 1 хв. при 30 мкл/хв. системного буфера.

Приклад 3

Вплив різних анти-PD-1 антитіл на продукцію цитокінів в реакції змішаної культури лімфоцитів (РЗКЛ)

3А) Реакція змішаної культури лімфоцитів (РЗКЛ) являє собою аналіз імунних клітин, який вимірює активацію лімфоцитів від одного індивідуума (донора X) щодо лімфоцитів від іншого індивідуума (донора Y). Реакцію змішаної культури лімфоцитів використовували для демонстрації ефекту блокування шляху PD1 до ефекторних клітин лімфоцитів. Т-клітини в аналізі тестували на активацію і секрецію ІФН γ в присутності або у відсутності анти-PD1 мкАт.

Для виконання алогенної РЗКЛ мононуклеарні клітини периферичної крові (МКПК) щонайменше від чотирьох здорових донорів невідомого типу HLA були виділені центрифугуванням в градієнті щільності з використанням пробірки Leukoser (Greiner Bio One, 227288). Коротко, зразки гепаринізованої крові розбавляли триразовим об'ємом ФСБ, і аліквоти по 25 мл розведеної крові нашаровували в пробірки Leukoser об'ємом 50 мл. Після центрифугування при 800 g протягом 15 хвилин за кімнатної температури (без перерви) фракції, що містять лімфоцити, збирали, промивали у ФСБ і використовували безпосередньо в функціональному аналізі або ресуспендували в заморожувачому середовищі (10 % ДМСО, 90 % фетальна бичача сироватка (ФБС)) при 1.0E+07 клітин/мл і зберігали в рідкому азоті. Окремі двофакторні РЗКЛ були організовані шляхом змішування МКПК від двох різних донорів зі співвідношенням клітин 1:1 стимулятор/респондер, і спільні культури аналізували щонайменше в двох повторностях в плоскодонних 96-лункових планшетах протягом 6 діб за 37 °С, 5 % CO $_2$ у присутності різного діапазону концентрацій очищених анти-PD1 моноклональних антитіл PD1-0050, PD1-0069, PD1-0073, PD1-0078, PD1-0098, PD1-0102, PD1-0103 або без них. Як еталонні анти-PD1 антитіла були синтезовані антитіла, що містять домени VH і VL або ніволумабу (також відомого як MDX-5C4 або MDX-1106), або пембролізумабу (також відомого як MK-3475 або Org 1.09A), і клоновані з основними ланцюгами людського IgG1 (з мутаціями L234A, L235A і P329G (індекс EU за Кабатом)). В якості негативного контролю не використовували ні антитіло, ні антитіло ізотипічного контролю, а в якості позитивного контролю використовували рекомбінантний ІЛ-2 людини (20 ЕО/мл (ЕО-експериментальні одиниці)). Через 6 діб з кожної культури відбирали 100 мкл середовища для вимірювання цитокінів. Рівні ІФН-гамма вимірювали з використанням набору ELISA OptEIA (BD Biosciences).

Результати наведені в Таблиці 4 (секреція/вивільнення ІФН γ). Анти-PD1 моноклональні антитіла стимулювали активацію Т-клітин і секрецію ІФН γ залежним від концентрації чином. Значення збільшення секреції ІФН- γ у % розраховували по відношенню до продукції ІФН- γ в РЗКЛ без додавання будь-яких блокуючих мкАт (значення ІФН- γ , індуковане базальною

алогенною стимуляцією, як Е-с) і РЗКЛ з додаванням 20 ЕО/мл рекомбінантного рекомбінантного ІЛ-2 людини (позитивний контроль = 100 % значення ІФН-гамма як Е + с) і розраховували за формулою: Відносна стимуляція [%] = ((Приклад - Е-с) / (Е + с - Е-с) * 100

Таблиця 4

Відсоток секреції ІФН-гамма після алогенної стимуляції і обробки анти-PD-1 антитілом в порівнянні з ефектом обробки рекомбінантним людським ІЛ-2 (20 ЕО/мл) (= 100 % збільшення) в якості позитивного контролю

	Концентрація (мкг/мл)	1:12	1:120	1:1200	Ефект в РЗКЛ
PD1-0050	44	136	96	33	+++
PD1-0069	60	76	71	55	+++
PD1-0073	43	103	63	38	++
PD1-0078	64	99	72	21	++

5

Деякі блокуючі антитіла до PD1 PD1-0050, PD1-0069, PD1-0073, PD1-0078, PD1-0098, PD1-0102, PD1-0103 проявляли сильну імуномодулюючу активність за рахунок посилення секреції інтерферону-гамма (ІФН-γ) (для всіх антитіл дані не наведено).

3В) У наступному експерименті оцінювали химерний PD1-0103 (ізотип людського IgG1 з мутаціями L234A, L235A і P329G (індекс EU за Кабатом)). Блокування PD1 за допомогою химерного PD1-0103 сильно посилює секрецію ІФН-гамма через алогенні стимулировані первинні Т-клітини людини. Химерне PD1-0103 було сильнішим, ніж еталонні анти-PD1 антитіла. Для порівняння були синтезовані і клоновані еталонні анти-PD1 антитіла, що містять домени VH і VL або ніволумаба (також відомого як MDX5C4 або MDX-1106), і пембролізумаба (також відомого як МК-3475 або Org 1.09A), і клоновані з основними ланцюгами людського IgG1 (з мутаціями L234A, L235A і P329G (індекс EU за Кабатом)).

3С) У додаткових експериментах імуномодулюючу активність гуманізованих варіантів анти-PD-1 антитіл PD1-0103 (гуманізовані антитіла PD1-0103-0312, PD1-0103-0314, на Фіг. 2 і 3, див. також в прикладі 9 нижче) а) вивільнення ІФНγ (секреція); б) вивільнення ФНП-альфа (секреція) оцінювали в РЗКЛ, як описано вище. Ефект химерного антитіла PD1-0103 і його гуманізованих варіантів порівнювали з еталонними анти-PD1 антитілами, що містять домени VH і VL або ніволумабу (також відомого як MDX5C4 або MDX-1106), або пембролізумабу (також відомого як МК-3475 або Org 1.09A) з основними ланцюгами людського IgG1 (з мутаціями L234A, L235A і P329G (індекс EU за Кабатом)). Після 6 діб культивування із РЗКЛ відбирали 50 мкл супернатанту і вимірювали кілька цитокінів в одній культурі, використовуючи аналіз Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Th1/Th2 Assay (Bio-Rad Laboratories Inc.). (дані наведені не для всіх цитокінів). Химерне антитіло PD1-0103 і його гуманізовані варіанти (PD1-0103_0312 і PD1-0103_0314) були більш ефективними в порівнянні з еталонними анти-PD1 антитілами в посиленні активації Т-клітин і секреції ІФН-гамма. Крім того, химерне антитіло PD1-0103 і його гуманізовані варіанти підсилюють секрецію фактора некрозу пухлини альфа (ФНП-альфа) та ІЛ-12 антигенпрезентуючими клітинами і збільшують здатність моноцитів/макрофагів або антигенпрезентуючих клітин стимулювати Т-клітини.

Приклад 4

Вплив блокування анти-PD-1 антитіл на цитотоксичне вивільнення гранзиму В і секрецію ІФН-γ CD4 Т-клітинами людини, що спільно культивувалися з алогенними зрілими дендритними клітинами

Для подальшого вивчення ефекту обробки анти-PD-1 в алогенних умовах ми розробили аналіз, в якому свіжі очищені CD4 Т-клітини спільно культивують протягом 5 діб в присутності алогенних зрілих дендритних клітин, отриманих з моноцитів, (зДК). Моноцити були виділені зі свіжих МКПК за один тиждень до цього шляхом адгезії до пластику з подальшим видаленням неприкріплених клітин. Потім ми отримували незрілі ДК з моноцитів шляхом культивування їх протягом 5 діб в середовищі, що містить ГМ-КСФ (50 нг/мл) та ІЛ-4 (100 нг/мл). Щоб викликати дозрівання незрілих ДК, ми додавали ФНО-α, ІЛ-1β і ІЛ-6 (по 50 нг/мл кожен) в середовище для культивування протягом 2 додаткових діб. Потім ми оцінили дозрівання ДК, вимірявши на їхній поверхні експресію головного комплексу гістосумісності класу II (ГКГС II), CD80, CD83 і CD86 за допомогою проточної цитометрії (LSRFortessa, BD Biosciences).

У день мінімальної реакції змішаної культури лімфоцитів (мРЗКЛ) CD4 Т-клітини збагачували за допомогою набору з мікрогранулами (Miltenyi Biotec) з 10⁸ МКПК, отриманих від

неспорідненого донора. Перед культивуванням CD4 Т-клітини мітили 5 мкМ карбокси-флуоресцеїн-сукцинімідоловим складним естером (CFSE). 10⁵ CD4 Т-клітин потім висівали в 96-лунковий планшет разом зі зрілими алло-ДК (5: 1) в присутності або у відсутності блокуючого анти-PD1 антитіла (або PD1-0103, химерного PD1-0103, або гуманізованих антитіл PD1-0103. - 0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314, PD1-0103-0315, скорочено 0312, 0313, 0314, 0315), в концентрації 10 μг/мл, якщо не вказано інше на фігурах.

Через п'ять діб супернатант клітинних культур збирали і використовували для вимірювання рівнів ІФН-γ за допомогою ІФА (R&D systems). Клітини залишали за 37 °С на додаткові 5 діб в присутності Golgi Plug (Брефельдін А) і Golgi Stop (Монензин). Потім клітини промивали, забарвлювали на поверхні антитілом проти CD4 людини і м фіксуючим барвником Aqua (Invitrogen) для прижиттєвого забарвлення/забарвлення мертвих клітин, після чого проводили попередньо з фіксацію/пермеабілізацію в буфері Fix/Perm Buffer (BD Bioscience). Внутрішньоклітинне забарвлення проводили для гранзиму В (BD Bioscience), ІФН-γ і ІЛ-2 (обидва від eBioscience).

Усі гуманізовані варіанти PD1-0103 (гуманізовані антитіла PD1-0103-0312, PD1-0103-0313, PD1-0103-0314, PD1-0103-0315, скорочено 0312, 0313, 0314, 0315) виявилися однаково ефективними для підвищення рівня гранзиму В і гамма-інтерферону (дані не наведено).

Приклад 5

Химерні похідні антитіла до PD1

Химерні антитіла до PD1 були отримані шляхом ампліфікації варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів мишачих анти-PD1 антитіл PD1-0098, PD1-0103 за допомогою ПЛР та клонування їх у вектори експресії важких ланцюгів у вигляді злитих білків з основними ланцюгами людського IgG1/людського CH1-шарнір -CH2-CH3 з мутаціями L234A, L235A і P329G (індекс EU за Кабатом)) (лейцин 234 для аланіну, лейцин 235 для аланіну, пролін 329 для гліцину), які блокують ефекторні функції і вектори експресії легких ланцюгів у вигляді злитих білків з людською константною областю каппа-ланцюга (C-каппа). Потім плазміді LC і HC спільно трансфікували в HEK293 і очищали через 7 діб з супернатанту стандартними способами очищення антитіл. Химерні анти-PD1 антитіла були перейменовані в химерні chiPD1-0098 (chiPD1-0098) і химерні PD1-0103 (chiPD1-0103). Для порівняння були синтезовані і клоновані еталонні анти-PD1 антитіла, що містять домени VH і VL або ніволумаба (також відомого як MDX-5C4 або MDX-1106), і пембролізумаба (також відомого як MK-3475 або Org 1.09A), і клоновані з основними ланцюгами людського IgG1 (з мутаціями L234A, L235A і P329G (індекс EU за Кабатом)).

Приклад 6

Отримання, експресія та очистка гуманізованих варіантів анти-PD1 антитіла PD-0103 (huMab PD-0103) і їхня характеристика

Гуманізація доменів VH і VL мишачого анти-PD1 антитіла 0103

На основі амінокислотної послідовності мишачих доменів VH і VL мишачого анти-PD1 антитіла PD1-0103 (SEQ ID NO: 7 і 8) були отримані варіанти гуманізованих анти-PD1 антитіл.

Гуманізований VH-варіант заснований на зародковій лінії людини IMGT_hVH_3_23 у комбінації з J-елементом зародкової лінії людиниIGHJ5-01 з декількома мутаціями. (що покладено в основу SEQ ID NO: 9).

Гуманізовані варіанти VL засновані на людських зародкових лініях IMGT_hVK_4_1, IMGT_hVK_2_30, IMGT_hVK_3_11 і IMGT_hVK_1_39 у комбінації з J-елементом зародкової лінії людини IGKJ1-01. Різні мутації призводили до гуманізованих варіантів від SEQ ID NO: 10 до SEQ ID NO: 13.

Гуманізовані амінокислотні послідовності для варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів PD1-0103 були назад трансльовані в ДНК, в результаті були отримані cNDA (GenArt) і потім клоновані у вектори експресії важкого ланцюга у вигляді злитих білків з людськими основними ланцюгами IgG1/людським CH1-шарнір -CH2 -CH3 з мутаціями LALA і PG (лейцин 234 з аланіном, лейцин 235 з аланіном, пролін 329 з гліцином), скасовуючи ефекторні функції, або вектори експресії легких ланцюгів у вигляді білків злиття з людською константною областю каппа-ланцюга (C-каппа). Потім плазміді LC і HC спільно трансфікували в HEK293 і очищали через 7 діб з супернатанту стандартними способами очищення антитіл. Отримані гуманізовані антитіла до PD1 названі таким чином:

Таблиця 5

Послідовності VH і VL гуманізованих варіантів антитіл PD1-0103

Гуманізовані антитіла PD1-0103	гуманізований варіант VH/SEQ ID NO:	гуманізований варіант VL/SEQ ID NO:
PD1-0103-0312	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
PD1-0103-0313	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 11
PD1-0103-0314	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 12
PD1-0103-0315	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 13

Варіанти гуманізованих антитіл PD1-0103 і вихідне химерне PD1-0103 були охарактеризовані як описано вище. Результати наведені в Таблиці 6.

5

Таблиця 6

Короткий опис результатів для варіантів гуманізованих антитіл PD1-0103 і вихідного химерного PD1-0103

Аналіз	химерне PD1-0103	PD-0103-0312	PD-0103-0313	PD-0103-0314	PD-0103-0315
Афінність K_D 37 °C [нМ]	2,0/0,8	1,5/1,8	1,9/2,3	1,6/1,5	1,7/1,5
ІФА EK_{50} [нМ]	0,2	0,1	0,07	0,07	0,06
CHO-PD1 EK_{50}	+	+	+	+	+
IC_{50} PD-L1, 2 [нМ]	1,35	не визн.	не визн.	не визн.	не визн.
Реакція змішаної культури лімфоцитів	+++	+++	+++	++++	++
Перехресна реактивність яванського макака (EK_{50} [нМ])	+	0,08	0,06	0,05	0,04

Гуманізований варіант PD-0103-0312 далі позначається як клон антитіла aPD1 PD1-0376.

Приклад 7

Отримання анти-LAG3 антитіл

10

Імунізація кролів

Запатентовані трансгенні кролі Roche, що експресують репертуар гуманізованих антитіл, були імунізовані плазмідною ДНК, яка експресує LAG3.

15

Групу з 3 кролів імунізували генетично, використовуючи вектор експресії плазмиди, що кодує повнорозмірний LAG3 людини (15352_plIntronA_fl-hLag3_DNA-IMS), шляхом внутрішньошкірного введення 400 мкг векторної ДНК з наступною електропорацією (5 квадратних імпульсів за 750 В/см), тривалість 10 мс, інтервал 1 с). Кролі отримали 7 послідовних імунізацій на 0, 14, 28, 49, 70, 98 і 126 добу. Кров (10 % від загального об'єму крові) відбирали на 35-у, 77-у, 105-у і 133-у добу. Готували сироватку, яку використовували для визначення титру за допомогою ІФА (див. нижче), і виділяли периферичні мононуклеарні клітини, які використовували як джерела антигенспецифічних В-клітин у процесі клонування В-клітин, описаному нижче.

20

Визначення сироваткових титрів (ІФА)

25

Людський рекомбінантний білок LAG3 іммобілізували на 96-лунковому планшеті NUNC Maxisorp в концентрації 2 мкг/мл, 100 мкл/лунка в ФСБ з подальшим: блокуванням планшета 2 % -ним кротейном С в ФСБ, 200 мкл/лунка; застосуванням серійних розведень антисироваток в двох повторностях, в 0,5 % кротейні С в ФСБ, 100 мкл/лунка; виявленням або з (1) HRP-кон'югованим осячлим антитілом проти IgG кролика (Jackson ImmunoResearch/Dianova 711-036-152; 1/16000), або (2) HRP-кон'югованим кролячим антитілом проти IgG людини (Pierce/Thermo Scientific 31423; 1/5000) або з (3) біотинільованим козячим антитілом проти людського каппа-антитіла (Southern Biotech/Biozol 2063-08, 1/5000) і стрептавідином-HRP; кожен розводиться в 30 0,5 % кротейні С в ФСБ, 100 мкл/лунка. Для всіх етапів планшети інкубували протягом 1 год за 37

°C. Між усіма етапами планшети промивали 3 рази 0,05 % Твіном 20 у ФСБ. Сигнал посилювали шляхом додавання розчинного субстрату BM Blue POD (Roche), 100 мкл/лунка; і зупиняли додаванням 1 М HCl, 100 мкл/лунка. Оптичну щільність зчитували за 450 нм проти 690 нм як еталон. Титр визначали як розведення антисироватки, що приводить до напівмаксимального сигналу.

Виділення моноклеарних клітин периферичної крові кроля (МКПК)

Були відібрані зразки крові імунізованих трансгенних кролів. Цільну кров, що містить ЕДТА, розбавляли вдвічі 1×ФСБ (РАА, Пашинг, Австрія) перед центрифугуванням в градієнті щільності із використанням середовища для виділення лімфоцитів Lympholyte-Mammal (Cedarlane Laboratories, Берлінгтон, Онтаріо, Канада) відповідно до інструкцій виробника. МКПК двічі промивали 1×ФСБ.

Середовище EL-4 B5

RPMI 1640 (Pan Biotech, Айденбах, Німеччина) з додаванням 10 % ФБС (Hyclone, Logan, Юта, США), 2 мМ глутаміну, 1 % розчину пеніциліну/стрептоміцину (РАА, Пашинг, Австрія), 2 мМ пірувата натрію, 10 мМ ГЕПЕС (PAN Biotech, Айденбах, Німеччина) і 0,05 мМ b-меркаптоетанолу (Gibco, Пейслі, Шотландія).

Покриття планшетів білковим антигеном

6-лункові планшети для стерильних клітинних культур покривали ECD людського LAG3, кон'югованого з частиною Fc людини (2 мкг/мл) в карбонатному буфері (0,1 М бікарбонат натрію, 34 мМ дінатрійгидрокарбонат, pH 9,55) протягом ночі за 4 °C.

Планшети тричі промивали в стерильному ФСБ перед використанням.

Виснаження клітин (а) Стерильні 6-лункові планшети (зі ступенем чистоти для культури клітин), покриті злитим моношаром клітин CHO, використовували для виснаження макрофагів/моноцитів за допомогою неспецифічної адгезії, а також неспецифічних лімфоцитів, що зв'язуються.

(b) Порожні стерильні 6-лункові планшети (зі ступенем чистоти для культури клітин) використовували для виснаження макрофагів і моноцитів та інших клітин за допомогою неспецифічної адгезії.

Половина зразка МКПК була використана для (а), і половина для (b).

Кожну лунку заповнювали максимально 4 мл середовища і до 6×10^6 МКПК від імунізованого кроля і залишали для зв'язування протягом 1 години за 37 °C в інкубаторі. Клітини в супернатанті (лімфоцити периферичної крові (PBL)) використовували для стадії пенінгу антигеном.

Збагачення В-клітин на антигені LAG3

Білковий антиген: У покриті білком 6-лункові планшети для культури тканини LAG3-ECD-huFc, висівали до 6×10^6 PBL на 4 мл середовища із стадії виснаження з використанням порожнього 6-лункового планшета і залишали для зв'язування протягом 1 години за 37 °C в інкубаторі. Не прикріплені клітини видаляли шляхом обережного промивання лунок 1-2 рази 1×ФСБ. Залишок клітин, що прикріпилися, відокремлювали трипсином протягом 10 хв. за 37 °C в інкубаторі. Обробку трипсином припиняли за допомогою середовища EL-4 B5. Клітини зберігали на льоду до імунофлуоресцентного забарвлення.

Антиген клітинної поверхні: У 6-лункові планшети для культур тканин, покриті моношаром людських LAG3-позитивних клітин CHO, висівали до 6×10^6 PBL на 4 мл середовища із стадій виснаження з використанням покритого CHO 6-лункового планшета і залишали зв'язуватися протягом 1 години за 37 °C в інкубаторі. Не прикріплені клітини видаляли шляхом обережного промивання лунок 1-2 рази 1×ФСБ. Залишок клітин, що прикріпилися, відокремлювали трипсином протягом 10 хв. при 37 °C в інкубаторі. Обробку трипсином припиняли за допомогою середовища EL-4 B5. Клітини зберігали на льоду до імунофлуоресцентного забарвлення.

Імунофлуоресцентне забарвлення і проточна цитометрія

Анти-IgG ФІТЦ (AbD Serotec, Дюссельдорф, Німеччина) і анти-huCk ФЕ (Dianova, Гамбург, Німеччина) використовували для сортування окремих клітин. Для забарвлення поверхні клітини зі стадії виснаження і збагачення інкубували з анти-IgG ФІТЦ і анти-huCk-ФЕ антитілом у ФСБ і інкубували протягом 45 хвилин в темряві за 4 °C. Після забарвлення МКПК двічі промивали холодним ФСБ. Наприкінці, МКПК ресуспендували в холодному ФСБ і негайно піддавали аналізу за допомогою проточної цитометрії. Йодид пропідію в концентрації 5 мкг/мл (BD Pharmingen, Сан-Дієго, Каліфорнія, США) додавали до аналізу за допомогою проточної цитометрії, щоб розрізнити мертві і живі клітини. Becton Dickinson FACSAria, обладнаний комп'ютером і програмним забезпеченням FACSDiva (BD Biosciences, США), використовували для сортування окремих клітин.

Культивування В-клітин

Культивування В-клітин кроля проводили способом, описаним Seeber et al. (S Seeber et al. PLoS One 9 (2), e86184. 2014 Feb 04). Коротко, поодинокі відсортовані В-клітини кроля інкубували в 96-лункових планшетах з 200 мкл/лунка середовища EL-4 B5, що містить клітини Pansorbin (1: 100000) (Calbiochem (Merck), Дармштадт, Німеччина), 5 % супернатанта тимоцитів кроля (MicroCoat, Бернрід, Німеччина) і гамма-опромінені мишачі клітини Тімом EL-4 B5 (5 × 10⁵ клітин/лунка) протягом 7 діб при 37 °C в інкубаторі. Супернатанти культури В-клітин видаляли для скринінгу, а залишки клітини збирали негайно і заморожували при -80 °C в 100 мкл буфера RLT (Qiagen, Гільден, Німеччина).

Виділення V-доменів антитіл до LAG3 ПЛР-ампліфікація V-доменів

ПЛР-ампліфікація V-доменів

Загальну РНК отримували з лізату В-клітин (ресуспендували в буфері RLT - Qiagen - кат. № 79216), використовуючи набір РНК NucleoSpin 8/96 (Macherey & Nagel; 740709.4, 740698) відповідно до протоколу виробника. РНК елюювали з використанням 60 мкл РНКаз без води. 6 мкл РНК використовували для генерації кДНК за допомогою реакції зворотної транскриптази з використанням SuperMix для синтезу першого ланцюга Superscript III (Invitrogen 18080-400) і оліго- dT-праймера відповідно до інструкцій виробника. Усі етапи виконували в системі Hamilton ML Star. 4 мкл кДНК використовували для ампліфікації варіабельних областей важкого і легкого ланцюгів імунoglobulinу (VH і VL) за допомогою AccuPrime Supermix (Invitrogen 12344-040) в кінцевому об'ємі 50 мкл з використанням праймерів rbHC.up і rbHC.do для важкого ланцюга і BcPCR_FHLC_leader.fw і BcPCR_huCkappa.rev для легкого ланцюга (Таблиця 7). Усі прямі праймери були специфічними для сигнального пептиду (відповідно VH і VL), тоді як зворотні праймери були специфічними для константних областей (відповідно VH і VL). Умови ПЛР для HuVL були наступними: Гарячий старт при 94 °C протягом 5 хв.; 35 циклів по 20 с при 94 °C, 20 с при 70 °C, 45 с при 68 °C і кінцева елонгація при 68 °C протягом 7 хв. Умови ПЛР для RbVH були наступними: Гарячий старт при 94 °C протягом 5 хв.; 40 циклів по 20 с при 94 °C, 20 с при 52 °C, 45 с при 68 °C і кінцева елонгація при 68 °C протягом 7 хв.

Таблиця 7

SEQ ID NO: 76 rbHC.up	AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTC
SEQ ID NO: 77 rbHCf.do	CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG
SEQ ID NO: 78 BcPCR_FHLC_leader.fw	ATGGACATGAGGGTCCCCGC
SEQ ID NO: 79 BcPCR_huCkappa.rev	GATTTCAACTGCTCATCAGATGGC

8 мкл з 50 мкл розчину для ПЛР завантажували в 48 E-Gel 2 % (Invitrogen G8008-02). Позитивні реакції ПЛР очищали з використанням набору NucleoSpin Extract II (Macherey & Nagel; 740609250) відповідно до протоколу виробника і елюювали в 50 мкл буфера для елюювання. Усі етапи виконували в системі Hamilton ML Starlet.

Рекомбінантна експресія кролячих моноклональних двовалентних антитіл

Для рекомбінантної експресії кролячих моноклональних двовалентних антитіл продукти ПЛР, що кодують VH або VL, клонували у вигляді кДНК у вектори експресії за допомогою методу клонування липких кінців (RS Haun et al., Biotechniques (1992) 13, 515-518; MZ Li et al., Nature Methods (2007) 4, 251-256). Вектори експресії містили касету експресії, що складалася з 5'-промотора ЦМВ, включаючи інтрон А, і послідовність поліаденілювання 3' BGH. На додаток до касети експресії плазмиди містили точку початку реплікації, отриману з pUC18, і ген бета-лактамази, що забезпечує стійкість до ампіциліну, для ампліфікації плазмиди в E. coli. Використовували три варіанти базової плазмиди: одну плазмиду, що містить константну область кролячого IgG, призначену для прийому областей VH, у той самий час маючи константну область LC каппа людини для прийому областей VL. Лінеаризовані плазмиди експресії, що кодують константну область каппа або гамма і вставки VL/VH, ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням перекриваючих праймерів. Очищені продукти ПЛР інкубували з ДНК-полімеразою T4, яка генерувала односторонні липкі кінці. Реакцію зупиняли додаванням дЦТФ.

На наступному етапі плазмиду і вставку об'єднували і інкубували з гесА, який індукував сайт-специфічну рекомбінацію. Рекомбіновані плазмиди були трансформовані в E. coli. Наступного дня вирощені колонії відбирали і тестували на правильну рекомбіновану плазмиду з використанням плазмідного препарату, рестрикційного аналізу і секвенування ДНК.

Для експресії антитіл виділені плазмиди HC і LC транзійтно трансфікували в клітини HEK293, і супернатант збирали через 1 тиждень.

Приклад 8
Характеристика анти-LAG3 антитіл

Таблиця 8

Короткий опис характеристик різних анти-LAG3 антитіл

анти-Lag3 антитіла	aLAG3 (0403)	aLAG3 (411)	aLAG3 (414)	aLAG3 (416)	aLAG3 (417)	MDX-25F7 (25F7)	BMS-986016	MDX-26H10 (26H10)	Гуманізоване BAP 050 (LAG525)
K _D [M] моновалентне Бівалентне	не визн. не визн.	не визн. не визн.	4.63 E-10 не визн.	2.82 E-11 не визн.	не визн. не визн.	не визн. не визн.	не визн. не визн.	не визн. не визн.	не визн. не визн.
kd [1/с]	5,00 E-06	3,87 E-05	1,95 E-04	2,21 E-04	9,48 E-05	3,86 E-04		3,99 E-04	
Епітопна група	E3	E3	E3	E2b	E3	E5 (D1-петля)	E5	E4	E2c
ГКГС II/ IФА IC ₅₀ [нМ]	0,9	0,8	0,9	0,9	0,9	0,8/0,6	/0,4	0,9/0,6	/1,0
Інфлексна точка IФА клітин CHO [нг/мл]	30,9	41,3	48,1	37,2	27,8	75			

5 IФА для Lag3 людини

Планшети Nunc Maxisorp (Nunc 464718) покривали 25 мкл/лунка рекомбінантного химерного білка людського LAG-3 Fc (R&D Systems, 2319-L3) при концентрації білка 800 нг/мл і інкубували за 4 °C протягом ночі або протягом 1 год. за кімнатної температури. Після промивання (3×90 мкл/лунка буфером PBST) кожну лунку інкубували з 90 мкл блокуючого буфера (ФСБ + 2 % БСА + 0,05 % Твін-20) протягом 1 години за кімнатної температури. Після промивання (3×90 мкл/лунка буфером PBST) додавали 25 мкл зразків анти-Lag3 в концентрації 1-9 мкг/мл (розведення 1: 3 в буфері OSEP) і інкубували 1 год. за кімнатної температури. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка кон'югату HRP з козячим антитілом проти к-ланцюга людського Ig (Milipore, AP502P) у розведенні 1: 2000 і інкубували за кімнатної температури протягом 1 години. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка субстрату TMB (Roche, 11835033001) та інкубували протягом 2-10 хв. Вимірювання проводили на приладі Tecan Safire 2 за 370/492 нм.

IФА для зв'язування Lag3 на клітинній поверхні

25 мкл/лунка Lag3 клітин (рекомбінантні клітини CHO, які експресують Lag3, 10000 клітин/лунка) висівали в 384-лункові планшети, призначені для культури тканини, (Corning, 3701) і інкубували за 37 °C протягом однієї або двох діб. На наступну добу після видалення середовища додавали 25 мкл зразків анти-Lag3 (розведення 1: 3 в буфері OSEP, починаючи з концентрації 6-40 нМ) і інкубували протягом 2 годин за 4 °C. Після промивання (1×90 мкл в PBST) клітини фіксували додаванням 30 мкл/лунка глутаральдегіду до кінцевої концентрації 0,05 % (Sigma, кат. №: G5882), протягом 10 хвилин за кімнатної температури. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка кон'югату HRP з козячим антитілом проти к-ланцюга людського Ig (Milipore, AP502P) у розведенні 1: 1000 і інкубували за кімнатної температури протягом 1 години. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка субстрату TMB (Roche, 11835033001) та інкубували протягом 6-10 хв. Вимірювання проводили на приладі Tecan Safire 2 за 370/492 нм.

Характеристика анти-LAG3 антитіл за допомогою ППР (Biacore)

Аналіз на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) використовували для

визначення кінетичних параметрів зв'язування між анти-Lag3 антитілами в двовалентному форматі або у вигляді моновалентних Fab-фрагментів і позаклітинних доменів (ECD), мічених людським Fc Lag3 людини, за 25 °C.

Тому дві проточні комірки біосенсорного чопа C1 були приготовлені в Biacore T200 шляхом іммобілізації нейтравідіна, розведеного до 25 мкг/мл в ацетатному буфері pH 4,5, для використання "майстра іммобілізації". Це призвело до рівня іммобілізації близько 1900 ОВ. Потім кон'югат CaptureSelect™ Biotin Anti-IgG-Fc (людський) зв'язували з нейтравідіном, використовуючи розведення 20 мкг/мл у рухомому буфері (HBS-EP+, GE Healthcare).

Сам спосіб складався з чотирьох команд за цикл. Перша команда: захоплення ~ 46 ОВ huLag3-Fc (20 с, 10 мкл/хв.). Друга команда: введення проби протягом 120 секунд з наступною дисоціацією протягом 1200 с при швидкості потоку 30 мкл/хв. Третя і четверта команда: оновлення шляхом введення гліцину-HCl pH 1,5 протягом 30 секунд. Ряд розведень (3,13 нМ - 200 нМ, дворазові розведення у рухомому буфері) кожного Fab-фрагмента антитіла і додаткові холості цикли потім вимірювали з використанням раніше описаного способу. Потім використовували програмне забезпечення Biacore T200 Evaluation для отримання кінетичних значень шляхом застосування апроксимації з використанням рівняння Ленгмюра 1: 1 з параметром апроксимації Rmax, встановленим в "local", оскільки рівні захоплення не були повністю відтворені. Результати (значення K_D і значення k_d) наведені в Таблиці 8.

Картування епітопів

Епітоп-специфічне сортування проводили з використанням аналізу на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР). Тому агенти, що зв'язують aLag3, були зв'язані з huLag3 на приладі Biacore T200. Потім оцінювали доступність інших речовин, що зв'язують до раніше сформованого комплексу aLag3 - huLag3, який зв'язує.

Для проведення цього аналізу використовували набір SA CAP (GE Healthcare). Якщо не вказано інше, аналіз проводили відповідно до інструкції набору SA CAP. Прогін включав тільки один тип циклу. Після гібридизації розведення в 10 нМ біотинільованого huFc-міченого huLag3 дозволяло зв'язуватися зі стрептавідином на сенсорному чопі протягом 20 с при швидкості потоку 10 мкл/хв. Потім перший 200 нМ зразок, розведений у рухомому буфері, впорскували протягом 180 с при швидкості потоку 30 мкл/хв, після чого відразу ж слідував другий зразок у тих самих умовах. Потім поверхню регенерували.

Потім зразки були розподілені по різним епітопним групам з подібними патернами конкуренції. Була проведена перша груба категоризація, заснована на відносній відповіді другої ін'єкції з використанням порогового значення 6,1 ОВ, яке було трохи вище найвищого значення, що спостерігається при введенні зв'язуючої речовини в якості першого та другого зразка. Усі значення та висновки були остаточно підтверджені візуальним оглядом сенсограм.

Результати наведені в Таблиці 8. Були ідентифіковані три основні структури епітопа (E1, E2 і E3). Оскільки aLag3-0416 і гуманізоване BAP 050 спільно використовують одну і ту ж групу, але не повністю пригнічують один одного, вони були віднесені до підгруп E2b і E2c.

Зв'язування анти-Lag3 антитіл від трансгенних (tg) кроликів з рекомбінантними супо Lag3-позитивними клітинами НЕК

На додаток до аналізу зв'язування з використанням клітин НЕК, рекомбінантно експресуючих людський Lag3 на поверхні, також оцінювали зв'язування з супо Lag3-позитивними клітинами НЕК. Для цього експерименту заморожені клітини HEK293F, раніше транзійтно трансфіковані LAG-3 яванського макака, відтаювали, центрифугували та повторно додавали у ФСБ/2 % ФБС. $1,5 \times 10^5$ клітин/лунка висівали в 96-лункові планшети. Анти-Lag3 антитіла додавали до кінцевої нормованої концентрації 10 мкг/мл. Для стандартів і в якості контролів, аутофлуоресценції та позитивного контролю (Medarex 25F7), а також контролю ізо типу (huIgG1 від Sigma, кат. № I5154, дані не показані) антитіла були отримані та виміряні в експерименті. Клітини НЕК інкубували із зазначеними антитілами протягом 45 хвилин на льоду, двічі промивали 200 мкл охолодженого на льоду буфера ФСБ, що містить 2 % ФБС, перед вторинним антитілом (міченим АФЦ козячим антитілом проти каппа IgG людини, Invitrogen, кат. № MH10515) додавали (1:50 розбавляли в FACS-Puffer/лунка) і додатково інкубували протягом 30 хвилин на льоду. Клітини знову двічі промивали 200 мкл охолодженого на льоду буфера ФСБ/2 % ФБС, після чого зразки нарешті ресуспендували в 150 мкл буфера для проточної цитометрії і вимірювали зв'язування на модулі HTS FACS CANTO-II.

Результати: У наведеній нижче таблиці показано зв'язування і перехресна реактивність різних анти-Lag3 антитіл з клітинами HEK293, експресуючими супоLAG3, зв'язування або дано у вигляді % позитивних клітин, або у вигляді геометричної середньої інтенсивності сигналу.

Таблиця 9

Зв'язування різних анти-LAG3 антитіл з рекомбінантними супо Lag3-позитивними клітинами НЕК

Антитіло до LAG3	% позитивних	Геометричне середнє
Еталонне антитіло до LAG3 MDX25F7	41,2	3062
aLAG3(0411)	88,6	11007
aLAG3(0414)	81,6	9169
aLAG3(0416)	67,9	4221
aLAG3(0417)	75,9	7115
aLAG3(0403)	82,0	7457

Зв'язування анти-Lag3 антитіл від tg кроликів з (активованими) МКПК/Т-клітинами, експресуючими Lag3, яванського макака

Після зв'язування з рекомбінантним білком Lag3 і Lag3, що експресується рекомбінантно на клітинах ссавців, також оцінювали зв'язування з Lag3, що експресується на активованих Т-клітинах яванського макака.

Характеристики зв'язування новостворених анти-Lag3 антитіл (отриманих від трансгенних кролів Roche) з Lag3, які експресуються на клітинній поверхні Т-клітин або МКПК яванського макака, були підтверджені за допомогою проточної цитометрії. Хоча Lag3 не експресується на наївних Т-клітинах, він активується при активації та/або на виснажених Т-клітинах. Таким чином, моноклеарні клітини периферичної крові (МКПК) яванського макака отримували зі свіжої крові яванського макака і потім активували шляхом попередньої обробки CD3/CD28 (1 мкг/мл) протягом 2-3 діб. Активовані клітини були згодом проаналізовані на експресію Lag3: Якщо коротко, $1-3 \times 10^5$ активованих клітин забарвлювали протягом 30-60 хвилин на льоду зазначеними анти-Lag3 антитілами та відповідними контрольними антитілами в кінцевій концентрації 10 мкг/мл. Зв'язані анти-Lag3 антитіла виявляли за допомогою кон'югованих з флуорохромом вторинних антитіл проти IgG людини або вторинних антитіл проти IgG кролика. Після забарвлення клітини двічі промивали ФБС/2 % ФБС і аналізували на FACS Fortessa (BD).

Результати: У наступній таблиці наведений відсоток Lag3-позитивних клітин в активованих МКПК яванського макака.

Таблиця 10

Зв'язування різних анти-LAG3 антитіл з (активованими) МКПК Т-клітинами яванського макака, що експресують Lag3

Анти-Lag3/контрольні антитіла	% позитивних клітин (PBL) яванського макака після активації CD3/CD28
тільки 2-е Ат (людина)	7,62
DP47 (людський ізотип)	9,19
Еталонне антитіло до LAG3 (MDX25F7)	22,1
Еталонне антитіло до LAG3 BMS-986016	18,6
Еталонне антитіло до LAG3 (гуманізоване BAP050 (LAG525))	50,7
тільки 2-е Ат (крізь)	5,26
aLAG3(0403)	44,2
aLAG3(0411)	46,6
aLAG3(0414)	43,0
aLAG3(0416)	38,9
aLAG3(0417)	35,3

На активованих Т-клітинах яванського макака всі кролячі анти-Lag3 антитіла продемонстрували значне зв'язування з Lag3⁺ клітинами. Таким чином, усі новостворені антитіла демонструють підвищений відсоток позитивних клітин у порівнянні з людськими анти-Lag3 еталонними антитілами (наприклад, такими як MDX25F7, BMS-986016).

Інгібування зв'язування LAG-3 з ГКГС-II, який експресується на пухлинних клітинах A375

людини (за допомогою ІФА)

25 мкл/лунка клітин A375 (10000 клітин/лунка) висівали в 384-лункові планшети, призначені для культури тканини, (Corning, 3701) і інкубували за 37 °C протягом ночі. Анти-Lag3 антитіла попередньо інкубували протягом 1 години з біотинільованим Lag3 (250 нг/мл) в середовищі для культивування клітин в розведеннях 1: 3, починаючи з концентрації антитіла 3 мкг/мл. Після видалення середовища з лунок з засіяними клітинами 25 мкл попередньо інкубованих сумішей антитіло-Lag3 переносили в лунки та інкубували протягом 2 год. за 4 °C. Після промивання (1×90 мкл в PBST) клітини фіксували додаванням 30 мкл/лунка глутаральдегіду до кінцевої концентрації 0,05 % (Sigma, кат. №: G5882), протягом 10 хвилин за кімнатної температури. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка полі-HRP40-стрептавідину (Fitzgerald, 65R-S104PHRPx) у розведенні 1: 2000 або 1: 8000 і інкубували за кімнатної температури протягом 1 години. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка субстрату TMB (Roche, 11835033001) та інкубували протягом 2-10 хв. Вимірювання проводили на приладі Tecan Safire 2 за 370/492 нм.

Інгібування зв'язування LAG-3 з ГКГС-II, який експресується на пухлинних клітинах A375 людини (за допомогою проточної цитометрії)

Принцип аналізу: Для вивчення антагоністичної функції анти-Lag3 антитіл було проведено конкурентний аналіз ГКГС-II: Lag3. ГКГС-II+ людські клітини A375 забарвлювали біотинільованим злитим білком Lag3: Fc власного виробництва з попередньої інкубацією або без попередньої інкубації з анти-Lag3 антитілами. Цей аналіз був вивчений в конкурентному експерименті з використанням проточної цитометрії: Клітини A375 (ATCC, № CRL-1619) культивували протягом 2-3 пересівів у середовищі EM Ігла, доповненому солями Ерла (EBSS) (PAN, кат. № P04-00509), 10 % ФБС, 2 мМ L-глутаміну, 1х NEAA і 1х пірувату натрію. Усі антитіла розводили в буфері для проточної цитометрії до кінцевої концентрації 20 мкг/мл в 25 мкл (в 96-лункових планшетах з U-подібним дном). 25 мкл біотинільованого рекомбінантного злитого білка LAG-3: Fc власного виробництва додавали до кінцевої концентрації 10 мкг/мл або до середовища, або до анти-Lag3 антитіл або контролів і попередньо інкубували протягом 30 хв. за кімнатної температури. Клітини A375 промивали ФБС і доводили до 3×10⁶ клітин/мл у ФБС. 100 мкл висівали на лунку в 96-лунковий V-подібний планшет. Планшети центрифугували і супернатант видаляли. Потім до клітин додавали попередньо інкубовану суміш злитого білка LAG-3: Fc/антитіла (50 мкл/лунка) та інкубували протягом 1 години за кімнатної температури. Після цього клітини промивали 200 мкл буфера для проточної цитометрії. Для виявлення біотинільованого білка Lag3: Fc, зв'язаного з клітинним ГКГС-II, використовували козяче анти-біотинове антитіло, яке кон'юговане з АФК, в концентрації 3 мкл/зразок (Miltenyi Biotec, кат. № 130-090-856) і інкубували протягом додаткових 10-15 хвилин. Після забарвлення клітини знову промивали і потім переносили в 150 мкл буфера для проточної цитометрії (ФБС/2 % ФБС) в U-подібний планшет і аналізували на FACS Canto-II з використанням модуля HTS.

Два анти-Lag3 антитіла (клони 25F7 і 26H10; Medarex) слугували в якості позитивного контролю та IgG1 людини (Sigma, кат. № I5154) в якості відповідного ізотипічного контролю. Усі антитіла використовували в кінцевій концентрації 10 мкг/мл.

Результати: У наведеній нижче таблиці показаний результат аналізу методом проточної цитометрії, що демонструє відсоток інгібування зв'язування білка Lag3 з ГКГС-II на клітинах (розрахований як знижений сигнал зв'язування по відношенню до максимального значення у відсутності блокуючого антитіла).

Таблиця 11

Зв'язування різних анти-LAG3 антитіл з (активованими) МКПК / Т-клітинами яванського макака, що експресують Lag3

Антитіло до aLAG3	% інгібування
aLAG3(0403)	34,9
aLAG3(0414)	67,3
aLAG3(0411)	45,6
aLAG3(0416)	68,6
aLAG3(0417)	59,1
Еталонне MDX25F7	70,0
Еталонне MDX26H10	71,7
Ізотипічний контроль	-2,9
Без мкАт	0,0

Ці дані підтверджують функціональну взаємодію з Lag3 і блокування клітинної взаємодії всіх тестованих антитіл.

Нейтралізуюча активність нових анти-Lag3 антитіл в стандартному біоаналізі блокування LAG3 Blockade Bio/репортерному аналізі

5 Щоб перевірити нейтралізуючу активність нових анти-Lag3 антитіл у відновленні пригніченої Т-клітинної відповіді *in vitro*, використовували комерційно доступну репортерну систему. Ця система складається з ефекторних клітин Lag3⁺ NFAT Jurkat (Promega, кат. № CS194801), ГКГС-II⁺ клітин Raji (ATCC, № CLL-86) і суперантигена. Коротше кажучи, система репортерів заснована на трьох етапах: (1) суперантиген-індукована активація клітин NFAT, (2) інгібування активуючого сигналу, опосередкованого інгібуючою взаємодією між ГКГС-II (клітинами Raji) та ефекторними клітинами Lag3⁺ NFAT Jurkat, і (3) відновлення сигналу активації NFAT Lag3-антагоністами/нейтралізуючими злитими конструктами aVH-Fc.

15 Для цього експерименту культивували ефекторні Т-клітини Raji і Lag-3⁺ Jurkat/NFAT-luc2, як описано в інструкції постачальника. Серійні розведення (40 пг/мл-50 мкг/мл) декількох анти-Lag3 і еталонних антитіл готували в середовищі для аналізу (RPMI 1640 (PAN Biotech, кат. № P04-18047), 1 % ФБС) у 96-лункових культуральних планшетах з плоским, білим дном (Costar, кат. № 3917). 1×10⁵ клітин Lag3⁺ NFAT-Jurkat/лунка) додають до розчину антитіла. Після цього етапу в суміш клітин Jurkat/антитіл додавали 2,5×10⁴ клітин Raji/лунка, а також суперантигена SED в кінцевій концентрації 50 нг/мл (Toxin technology, кат. № DT303). Після інкубації протягом шести годин за 37 °C і 5 % CO₂ субстрат Bio-Glo (Promega, № G7940) нагрівали до кімнатної температури і додавали 75 мкл на лунку, інкубували протягом 5-10 хвилин, після чого вимірювали загальну люмінесценцію було виміряно на рідері Tecan Infinite відповідно до рекомендацій виробника набору.

25 У таблиці показано відновлення ГКГС-II / Lag3-опосередкованого пригнічення сигналу NFAT-люциферази різними анти-Lag3 антитілами при стимуляції SED (дано у вигляді значень EK₅₀):

Таблиця 12

Результати з різними анти-LAG3 антитілами в стандартному біоаналізі блокування LAG3 Blockade Bio/репортерному аналізі

Анти-LAG3	EK ₅₀ [нМ] в Jurkat LAG3+SED+Raji		
	1-й аналіз	2-й аналіз	3-й аналіз
Еталонне MDX25F7	7,8/5,9	8,6	н. т.
Еталонне BMS-986016	н. т.	9,6	н. т.
Еталонне гуманізоване BAP050 (LAG525)	н. т.	22,6	н. т.
Lag3 IgG-Fc	н. т.	без ефекту	н. т.
aLAG3(0411)	1,1	1,0	н. т.
aLAG3(0414)	1,1	1,0	1,8
aLAG3(0416)	3,1	2,5	3,5
aLAG3(0417)	1,0	н. т.	н. т.

н. т. молекули являють собою молекули, які не тестували цьому експерименті

Приклад 9

Функціональна характеристика анти-LAG3 антитіл

30 У Таблиці 13 узагальнені біологічна активність і ефекти різноманітних анти-LAG3 антитіл (окремо або в комбінації з анти-PD1 антитілами) в різних аналізах, як описано в цьому документі.

Таблиця 13

Короткий опис біологічної активності різних анти-LAG3 антитіл
(окремо або в комбінації з анти-PD1 антитілами)

Тип аналізу	Анти-Lag3 aLAG3 (0403)	Анти-Lag3 aLAG3 (0411)	Анти-Lag3 aLAG3 (0414)	Анти-Lag3 aLAG3 (0416)	Анти-Lag3 aLAG3 (0417)	Еталонне 1 BMS 986016	Еталонне 2 гуманізоване BAP050 (LAG525)
мРЗКЛ (Гранзим В)	+	-	+++	++	+	-	++
мРЗКЛ (ІЛ-2)	-	-	+	+	++	+	++
CD4+ARH77			+++	+++		+	+
Трег пригнічення (Гранзим В)			+++	+		-	+
Трег пригнічення (ІФН-γ)			+++	++		+	+
МКПК пацієнтів меланомою			+++				

Вплив блокування PD-1 і LAG-3 на цитотоксичне вивільнення гранзиму В і секрецію ІЛ-2 CD4 Т-клітинами людини, спільно культивованими з алогенними зрілими дендритними клітинами

Для скринінгу анти-LAG-3 блокуючих антитіл у комбінації з анти-PD-1 в алогенних умовах був розроблений аналіз, в якому свіжоочищені CD4 Т-клітини спільно культують протягом 5 діб в присутності алогенних зрілих дендритних клітин, отриманих з моноцитів, (зДК). Моноцити були виділені зі свіжих МКПК за один тиждень до цього шляхом адгезії до пластику з подальшим видаленням неприкріплених клітин. Потім з моноцитів отримували незрілі ДК шляхом культивування їх протягом 5 діб в середовищі, що містить ГМ-КСФ (50 нг/мл) та ІЛ-4 (100 нг/мл). Щоб викликати дозрівання незрілих ДК, ми додавали ФНО-альфа, ІЛ-16 та ІЛ-6 (по 50 нг/мл кожен) в середовище для культивування протягом 2 додаткових діб. Потім оцінювали дозрівання ДК шляхом вимірювання на їх поверхні експресії головного комплексу гістосумісності класу II (ГКГС II), CD80, CD83 і CD86 за допомогою проточної цитометрії (LSRFortessa, BD Biosciences).

У день мінімальної реакції змішаних культур лімфоцитів (мРЗКЛ) CD4 Т-клітини збагачували за допомогою набору з мікрогранулами (Miltenyi Biotec) з 10^8 МКПК, отриманих від неспорідненого донора. Перед культивуванням CD4 Т-клітини мітили 5 мкМ карбокси-флуоресцеїн-сукцинімідоловим складним естером (CFSE). 10^5 CD4 Т-клітин потім висівали в 96-лунковий планшет разом зі зрілими алло-ДК (5: 1) у присутності або у відсутності блокуючого анти-PD-1 антитіла aPD1 (0376) (= PD1-0103-0312, як описано в цьому документі раніше або в заявці РСТ РСТ/EP2016/073248) окремо або в комбінації з химерними анти-LAG-3 антитілами (aLAG3 (0403) до aLAG (0418)) або еталонними антитілами (гуманізоване BAP050 (LAG525) і BMS 986016) в концентрації 10 мкг/мл. DP47 являє собою людський IgG, який не зв'язується, з мутацією LALA в Fc-частині, щоб уникнути розпізнавання FcγR, і його використовували в якості негативного контролю.

Через п'ять діб супернатанти клітинних культур збирали і використовували для вимірювання рівнів ІЛ-2 за допомогою ІФА (R&D systems), і клітини залишали за 37 °C протягом додаткових 5 годин у присутності Golgi Plug (Брефельдін А) і Golgi Stop (Монензин). Потім клітини промивали, забарвлювали на поверхні антитілом проти CD4 людини і фіксуючим барвником Aqua (Invitrogen) для прижиттєвого забарвлення/забарвлення мертвих клітин, після чого проводили фіксацію/пермеабілізацію в буфері Fix/Perm Buffer (BD Bioscience). Ми провели внутрішньоклітинне забарвлення на гранзим В (BD Bioscience) та ІФН-γ (eBioscience). Результати наведені на Фіг. 2А і 2В.

Вплив блокування PD-1 і LAG-3 на цитотоксичне вивільнення гранзиму В CD4 Т-клітинами людини, спільно культивованими з лімфобластною В-клітинною лінією (ARH77).

У функціональних дослідженнях CD4 Т-клітини спільно культивували з лінією пухлинних клітин ARH77, лімфобластною В-клітинною лінією, яка експресує більш низькі рівні PDL-1, ніж зДК, щоб краще охарактеризувати внесок антагонізму LAG-3 в блокування PD-1. Інша частина

експериментальної установки і показання залишалися незмінними від мРЗКЛ. Анти-LAG-3 антитіла (aLAG3 (0414) і aLAG3 (0416), вибрані на основі їх здатності спільно секретувати ІЛ-2 та гранзим В в мРЗКЛ) в комбінації з анти-PD-1 антитілом, викликали більш значуще збільшення секреції гранзиму В CD4 Т-клітинами у порівнянні з еталонними анти-LAG-3 антитілами (гуманізоване BAP050 (LAG525) і BMS 986016) ($P < 0,05$) і одним анти-PD-1 ($P < 0,01$), як продемонстровано на Фіг. 3.

Вплив блокування PD-1 і LAG-3 на Трег пригнічення вивільнення гранзиму В та ІФН- γ CD4 Т-клітинами людини, спільно культивованими з опроміненими алогенними МКПК.

У функціональних дослідженнях, що включають аналізи пригнічення регуляторними Т-клітинами (Трег), МКПК від одного і того ж донора були розділені на дві проби: одна була збагачена CD4 Т-клітинами, а інша - Трег, визначеними як CD4⁺CD25^{high} CD127^{low} Т-клітини, за допомогою набору мікрогранул (Miltenyi Biotec). Після очищення двох популяцій CD4 Т-клітини мітили 5 мкМ карбокси-флуоресцеїн-сукцинімідилового складного ефіру (CFSE), а Трег мітили 5 мкМ Cell-Trace-Violet (CTV), щоб потім можна було розрізнити їх за допомогою проточної цитометрії.

Потім і CD4 Т-клітини (10^5), і Трег (10^5) спільно культивували в 96-лунковому планшеті в співвідношенні 1: 1 разом з опроміненими CD4-виснаженими МКПК (10^5) від неспорідненого донора в присутності або у відсутності анти-LAG-3 антитіла (aLAG3 (0414) і aLAG3 (0416) або еталонних анти-LAG-3 антитіл (гуманізовані BAP050 (LAG525) і BMS 986016) у комбінації з анти-PD-1 антитілом aPD1 (0376) в концентрації 10 мкг/мл. В якості контролю для оцінки величини пригнічення ефекторних функцій CD4 Т-клітин за допомогою Трег, CD4 Т-клітини (10^5) також спільно культивували з опроміненими МКПК (10^5) у відсутності Трег.

Через п'ять діб супернатанти клітинних культур збирали і використовували для вимірювання рівнів ІФН- γ за допомогою ІФА (R&D systems), і клітини залишали за 37 °C протягом додаткових 5 годин у присутності Golgi Plug (Брефельдін А) і Golgi Stop (Монензин). Потім клітини промивали, забарвлювали на поверхні антитілом проти CD4 людини і барвником Aqua (Invitrogen) для прижиттєвого забарвлення/забарвлення мертвих клітин після чого проводили фіксацію/пермеабілізацію в буфері Fix/Perm Buffer (BD Bioscience). Внутрішньоклітинне забарвлення проводили на гранзим В (BD Bioscience) і ІФН- γ (eBioscience). Результати представлені на Фіг. 4А і 4В.

Анти-LAG-3 антитіла (aLAG3 (0414) і aLAG3 (0416), у комбінації з анти-PD-1 антитілом aPD1 (0376) (= PD1-0103-0312, із заявки РСТ РСТ/EP2016/073248) викликали вихід Ттип з жорсткого контролю регуляторними Т-клітинами, про що свідчить секреція значно більш високої кількості гранзиму В, ніж Ттип, в присутності тільки анти-PD-1 ($P < 0,05$) або у відсутності інгібіторів контрольної точки ($P < 0,001$). Еталонні анти-LAG-3 антитіла (гуманізовані BAP050 (LAG525) і BMS 986016) у комбінації з анти-PD-1 не суттєво зберігали ефекторні функції Ттип від Трег пригнічення. Аналогічні результати були отримані для ІФН- γ , навіть якщо різниця не досягла статистичної значущості лише з 4 донорами.

Вплив блокування PD-1 і LAG-3 на секрецію гранзиму В і ІФН- γ CD4 Т-клітинами з МКПК пацієнтів з меланою після вторинної імунної відповіді за допомогою імуногенних пептидних пулів меланома-антиген.

Раніше було описано, що МКПК пацієнтів з меланою містять вимірювану частоту неоантиген-специфічних Т-клітин. Таким чином, для цілей перевірки концепції ми протестували анти-LAG-3 антитіло (0414) з анти-PD-1 в порівнянні з одним анти-PD-1 на МКПК пацієнтів з меланою, повторно стимульованих протягом ночі імуногенними пептидними пулами асоційованих з меланою антигенів.

10^5 - 10^6 МКПК від пацієнтів з меланою, яких інкубували за кімнатної температури в присутності або у відсутності насичуючих концентрацій (10 мкг/мл) з одним анти-PD-1 (0376), у комбінації з анти-LAG-3 антитілом (aLAG3 (0414) = (0414), 10 мкг/мл). Потім Т-клітини повторно стимулювали протягом ночі імуногенним пулом пухлинних антигенів, таких як MAGEA1, MAGEA3, MAGEA4, Melan-A/MART-1, NYESO-1, білок меланоцитів Pmel 17 gp100, тирозиназа, тирозиназа-залежний білок 2 в присутності інгібіторів транспорту білка Golgi Plug (Брефельдін А) і Golgi Stop (Монензин).

Потім клітини промивали, забарвлювали на поверхні антитілом проти CD4 людини і фіксуючим барвником Aqua (Invitrogen) для прижиттєвого забарвлення/забарвлення мертвих клітин, після чого проводили фіксацію/пермеабілізацію в буфері Fix/Perm Buffer (BD Bioscience). Внутрішньоклітинне забарвлення проводили на гранзим В (BD Bioscience) і ІФН- γ (eBioscience).

Комбінація анти-LAG-3 і анти-PD-1 антитіл ($P < 0,01$ і $P < 0,001$) значно ($P < 0,01$ і $P < 0,0001$) посилювала специфічні для пухлинного антигена ефекторні функції Т-клітин (тобто секрецію гранзиму В і ІФН- γ), в той час як тільки блокування PD-1 не продемонстрував жодного ефекту

(дані не показані).

Приклад 10

Генерація та отримання біспецифічних анти-PD1/анти-LAG3 антитіл

10.1. Отримання та експресія біспецифічних антитіл, які зв'язуються з PD1 і LAG3 з обміном/заміною доменів VH/VL (CrossMAb^{Vh-VL}) в одному зв'язуючому плечі та з одиночними зарядженими амінокислотними замінами на поверхні взаємодії CH1/CL

Мультиспецифічні антитіла, які зв'язуються з людським PD1 і людським LAG3, були отримані за допомогою класичних методик молекулярної біології, що описані в розділі загальних способів і транзійтно експресовані в 293F з клітин Expi293F, як описано вище. Мультиспецифічні антитіла 1+1 CrossMAb^{Vh-VL} також описані у WO 2009/080252. Мультиспецифічні антитіла були експресовані з використанням плазмід експресії, що містять нуклеїнові кислоти, які кодують амінокислотні послідовності, наведені в Таблиці 14. Схематична структура біспецифічних антитіл 1+1 CrossMAb^{Vh-VL} продемонстрована на Фіг. 1A.

Таблиця 14

Амінокислотні послідовності легких ланцюгів (LC) і важких ланцюгів (HC) з обміном/заміною доменів VH/VL (1+1 CrossMAb^{Vh-VL})

Антитіло 1+1	HC1	HC2	LC1	LC2
PD1/LAG3 0799 PD1(0376)/ aLAG3(0416)	SEQ ID NO:96	SEQ ID NO:97	SEQ ID NO:98	SEQ ID NO:99
PD1/LAG3 0927 PD1(0376)/ aLAG3(0414)	SEQ ID NO:96	SEQ ID NO:100	SEQ ID NO:98	SEQ ID NO:101
PD1/LAG3 0222 PD1(0069)/ aLAG3(25F7)	SEQ ID NO:102	SEQ ID NO:103	SEQ ID NO:104	SEQ ID NO:105
PD1/LAG3 0224 PD1(0098)/ aLAG3(25F7)	SEQ ID NO:106	SEQ ID NO:103	SEQ ID NO:107	SEQ ID NO:105

Для всіх конструктів "виступи-в-отвори" була використана технологія гетеродимеризації з типовою заміною виступу (T366W) в першому домені CH3 і відповідними замінами отворів (T366S, L368A і Y410V) у другому домені CH3 (а також двома додатковими введеними залишками цистеїну S354C/Y349'C) (міститься у відповідних зв'язаних послідовностях важкого ланцюга (HC), які зображені вище).

10.2. Отримання й експресія мультиспецифічних антитіл, які зв'язуються з PD1 і LAG3, з обміном/заміною доменів CH1/Ck (2+2 CrossMAb^{CH1/Ck}) в двох зв'язуючих плечах і з замінами заряджених амінокислот на поверхнях взаємодії CH1/CL інших

У цьому прикладі мультиспецифічні антитіла, які зв'язуються з людським PD1 і людським TIM3, були отримані за допомогою класичних методик молекулярної біології, що описані в розділі загальних способів, і транзійтно експресовані в 293F з клітин Expi293F, як описано вище. Мультиспецифічні антитіла 2+2 CrossMAb^{CH1/Ck} також описані у WO 2010/145792. Мультиспецифічні антитіла були експресовані з використанням плазмід експресії, що містять нуклеїнові кислоти, які кодують амінокислотні послідовності, наведені в Таблиці 15. Схематична структура біспецифічних антитіл 2+2 CrossMAb^{CH1/Ck} продемонстрована на Фіг. 1A.

Таблиця 15

Амінокислотні послідовності легких ланцюгів (LC) і важких ланцюгів (HC) з обміном/заміною доменів VH/VL (2+2 CrossMAb^{CH1/Ck})

Антитіло 2+2	2x HC	2x LC1	2x LC2
PD1/LAG3 8970 PD1(0376)/ aLAG3(0414)	SEQ ID NO:114	SEQ ID NO:115	SEQ ID NO:101
PD1/LAG3 8984 PD1(0376)/ aLAG3(0416)	SEQ ID NO:116	SEQ ID NO:115	SEQ ID NO:99
PD1/LAG3 9010	SEQ ID NO:117	SEQ ID NO:115	SEQ ID NO:105

Таблиця 15

Амінокислотні послідовності легких ланцюгів (LC) і важких ланцюгів (HC) з обміном/заміною доменів VH/VL (2+2 CrossMAb^{CH1/Ck})

Антитіло 2+2	2x HC	2x LC1	2x LC2
PD1(0376)/ aLAG3(25F7)			

10.3. Отримання й експресія мультиспецифічних антитіл, які зв'язуються з PD1 і LAG3, з обміном/заміною доменів CH1/Ck (2+1 CrossMAb^{CH1/Ck}) в одному зв'язуючому плечі (PD1 crossFab, яке злите з С-кінцем важкого ланцюга виступу Fc), і з зарядженими амінокислотними замінами на поверхнях взаємодії CH1/CL інших

У цьому прикладі мультиспецифічні антитіла, які зв'язуються з людським PD1 і людським TIM3, були отримані за допомогою класичних методик молекулярної біології, що описані в розділі загальних способів, і транзійтно експресовані в 293F з клітин Expi293F, як описано вище. Мультиспецифічні антитіла 2+1 CrossMAb^{CH1/Ck} також описані у WO2013/026831. Мультиспецифічні антитіла були експресовані з використанням плазмід експресії, що містять нуклеїнові кислоти, які кодують амінокислотні послідовності, наведені в Таблиці 16. Схематична структура біспецифічних антитіл 2+1 CrossMAb^{CH1/Ck} продемонстрована на Фіг. 1B.

Таблиця 16

Амінокислотні послідовності легких ланцюгів (LC) і важких ланцюгів (HC) з обміном/заміною доменів H1/Ck (2+1 CrossMAb^{CH1/Ck})

Антитіло 2+1	HC1	HC2	LC1	2x LC2
PD1/LAG3 8310 aLAG3(0414)/ PD1(0376)	SEQ ID NO:118	SEQ ID NO:119	SEQ ID NO:115	SEQ ID NO:101
PD1/LAG3 8311 aLAG3(0416)/ PD1(0376)	SEQ ID NO:120	SEQ ID NO:121	SEQ ID NO:115	SEQ ID NO:99
PD1/LAG3 1252 aLAG3(25F7)/ PD1(0376)	SEQ ID NO:122	SEQ ID NO:103	SEQ ID NO:115	SEQ ID NO:105

Альтернативно, PD1 crossFab, яке злите з С-кінцем важкого ланцюга з виступом Fc, може бути замінено одноланцюговим Fab (scFab). Такі мультиспецифічні 2+1 антитіла, що містять scFab, описані також в WO2010/136172 і можуть бути експресовані з використанням плазмід експресії, що містять нуклеїнові кислоти, які кодують амінокислотні послідовності, наведені в Таблиці 17. Схематична структура біспецифічних антитіл 2+1 з scFab, злитим на С-кінці важкого ланцюга з виступом Fc, продемонстрована на Фіг. 1C.

Таблиця 17

Амінокислотні послідовності легких ланцюгів (LC) і важких ланцюгів (HC), з PD1 scFab

Антитіло 2+1	HC1	HC2	2x LC
PD1/LAG3 8312 aLAG3(0414)/ PD1(0376)	SEQ ID NO:123	SEQ ID NO:119	SEQ ID NO:101
PD1/LAG3 8313 aLAG3(0416)/ PD1(0376)	SEQ ID NO:124	SEQ ID NO:121	SEQ ID NO:99
PD1/LAG3 1088 aLAG3(25F7)/ PD1(0376)	SEQ ID NO:125	SEQ ID NO:103	SEQ ID NO:105

10.4. Отримання й експресія мультиспецифічних антитіл, які зв'язуються з PD1 і LAG3 з VH/VL, кожен з яких злитий на С-кінці важких ланцюгів (формат 2+1 PRIT)

У цьому прикладі мультиспецифічні антитіла, які зв'язуються з людським PD1 і людським TIM3, були отримані за допомогою класичних методик молекулярної біології, що описані в розділі загальних способів, і транзійтно експресовані в 293F з клітин Expi293F, як описано вище. Цей тип мультиспецифічних 2+1 антитіл також описаний в WO 2010/115589.

- 5 Мультиспецифічні антитіла були експресовані з використанням плазмід експресії, що містять нуклеїнові кислоти, які кодують амінокислотні послідовності, наведені в Таблиці 18. Схематична структура біспецифічних антитіл типу 2+1 PRIT продемонстрована на Фіг. 1D.

Таблиця 18

Амінокислотні послідовності легких ланцюгів (LC) і важких ланцюгів (HC), з доменами VH і VL, злитими з С-кінцями важких ланцюгів

Антитіло 2+1	HC1	HC2	2x LC
PD1/LAG3 0918 aLAG3(25F7)/ aPD1(0376)	SEQ ID NO:126	SEQ ID NO:127	SEQ ID NO:109

- 10 10.5. Отримання й експресія мультиспецифічних антитіл, які зв'язуються з PD1 і LAG3 з обміном/заміною доменів VH/VL (формат 1+1 CrossMab^{VH/VL} транс) в одному зв'язуючому плечі і з замінами заряджених амінокислот на поверхнях взаємодії CH1/CL LAG3 Fab, злитого з С-кінцем важкого ланцюга з Fc-отвором

- 15 Були отримані мультиспецифічні антитіла, які моновалентно зв'язуються як з людським PD1, так і з людським LAG3, причому Fab LAG3 злитий через свій варіабельний домен важкого ланцюга з С-кінцем одного з важких ланцюгів, переважно важкого ланцюга з Fc-отвором. Молекули, були отримані за допомогою класичних методик молекулярної біології, що описані в розділі загальних способів, і транзійтно експресовані в 293F з клітин Expi293F, як описано вище. Мультиспецифічні антитіла були експресовані з використанням плазмід експресії, що
- 20 містять нуклеїнові кислоти, які кодують амінокислотні послідовності, наведені в Таблиці 19. Схематична структура біспецифічних антитіл 1+1 CrossMab^{VH/VL} транс продемонстрована на Фіг. 1H.

Таблиця 19

Амінокислотні послідовності легких ланцюгів (LC) і важких ланцюгів (HC), з aLAG3 Fab, злитим з С-кінцями важких ланцюгів

Антитіло 1+1	HC1	HC2	LC1	LC2
PD1/LAG3 0725 aLAG3(0414)/ aPD1(0376)	SEQ ID NO:96	SEQ ID NO:144	SEQ ID NO:98	SEQ ID NO:101

- 25 10.6. Отримання та експресія мультиспецифічних антитіл, які зв'язуються з PD1 і LAG3 з обміном/заміною доменів VH/VL (формат 2+1 CrossMab^{VH/VL} транс) в одному зв'язуючому плечі і з замінами заряджених амінокислот на поверхнях взаємодії CH1/CL двох LAG3 Fab, один з яких злитий з С-кінцем важкого ланцюга з Fc-отвором

- 30 Були отримані мультиспецифічні антитіла, які моновалентно зв'язуються з людським PD1 і двовалентно зв'язуються з людським LAG3, причому Fab LAG3 злитий через свій варіабельний домен важкого ланцюга з С-кінцем одного з важких ланцюгів, переважно важкого ланцюга з Fc-отвором. Молекули були отримані за допомогою класичних методик молекулярної біології, що описані в розділі загальних способів, і транзійтно експресовані в 293F з клітин Expi293F, як описано вище. Мультиспецифічні антитіла були експресовані з використанням плазмід експресії, що містять нуклеїнові кислоти, які кодують амінокислотні послідовності, наведені в Таблиці 20. Схематична структура біспецифічних антитіл 2+1 CrossMab^{VH/VL} транс
- 35 продемонстрована на Фіг. 1I.

Амінокислотні послідовності легких ланцюгів (LC) і важких ланцюгів (HC), причому один з aLAG3 Fab злите з C-кінцями важких ланцюгів

Антитіло 1+1	HC1	HC2	LC1	2 x LC2
PD1/LAG3 0750 aLAG3(0414)/ aPD1(0376)	SEQ ID NO:96	SEQ ID NO:145	SEQ ID NO:98	SEQ ID NO:101

10.7 Очищення та характеристика мультиспецифічних антитіл, які зв'язуються з PD1 і TIM3

Експресовані раніше мультиспецифічні антитіла очищали від супернатанту за допомогою комбінації афінної хроматографії з білком А і ексклюзійної хроматографії. Усі мультиспецифічні антитіла можуть бути отримані з достатніми виходами і є стабільними. Отримані продукти були охарактеризовані по відношенню до ідентичності з використанням мас-спектрометрії та аналітичних властивостей, таких як чистота за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу, вміст мономерів і стабільність.

Мас-спектрометрія

Очікувані первинні структури були проаналізовані за допомогою мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням (IEP-MS) деглікозильованих інтактних CrossMab і деглікозильованих/розщеплених плазмінном або альтернативно деглікозильованих/обмежено розщеплених LysC CrossMab.

CH1/Ck CrossMab піддавали деглікозильованню за допомогою N-глюкозидази F у фосфатному буфері або трис-буфері за 37 °C протягом 17 годин при концентрації білка 1 мг/мл. Розщеплення плазмінном або обмежене розщеплення LysC (Roche) проводили з використанням 100 мкг деглікозильованих CH1/Ck CrossMab в трис-буфері, pH 8, за кімнатної температури протягом 120 годин і за 37 °C протягом 40 хвилин, відповідно. Перед мас-спектрометриєю зразки знесолювали за допомогою BEPX на колонці з сефадексом G25 (GE Healthcare). Загальна маса була визначена за допомогою IEP-MS на системі MS MAXIS 4G UHR-QTOF (Bruker Daltonik), обладнаною джерелом TriVersa NanoMate (Advion).

Стабільність мультиспецифічних антитіл

Щоб оцінити стабільність конструкторів антитіл, термічну стабільність, а також температури початку агрегації оцінюють у відповідності з наступною процедурою. Зразки зазначених антитіл готують в концентрації 1 мг/мл в 20 mM гістидин/гістидинхлорид, 140 mM NaCl, pH 6,0, переносять в 10 мкл мікрокувету, і реєструють дані статичного розсіювання світла, а також дані флуоресценції при збудженні лазером з довжиною хвилі 266 нм за допомогою приладу Optim1000 (Avacta Inc.), в той час як зразки нагрівають зі швидкістю 0,1 °C/хв. від 25 °C до 90 °C.

Температура початку агрегації (T_{agg}) визначається як температура, за якої інтенсивність розсіювання світла починає збільшуватися. Температура плавлення (T_m) визначається як інфлексна точка на графіку залежності інтенсивності флуоресценції від довжини хвилі.

Приклад 11

Характеристика біспецифічних анти-PD1/анти-LAG3 антитіл

11.1 Аналіз зв'язування за допомогою ІФА

ІФА для hu PD1

Покриті стрептавідином планшети Nunc maxisorp (MicroCoat, № 11974998001), покривали 25 мкл/лунка біотинільованого PD1-ECD-AviHis в концентрації 500 нг/мл і інкубували за 4 °C протягом ночі. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл зразків анти-PD1 антитіл в зростаючих концентраціях і інкубували протягом 1 години за кімнатної температури. Після промивання (3×90 мкл/лунка буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка козячого антилюдського H+L-POD (JIR, JIR109-036-098) у розведенні 1: 5000 та інкубували за кімнатної температури протягом 1 год. на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка субстрату TMB (Roche, 11835033001) та інкубували до досягнення ОП 2-3. Вимірювання проводили за 370/492 нм.

Клітинний ІФА для PD1 людини

Адгезивну клітинну лінію CHO-K1, стабільно трансфіковану плазмідом 15311_hPD1-fl_pUC_Neo, що кодує повнорозмірний людський PD1, і селекцію G418 (маркер стійкості до неоміцину в плазміді) висівали в концентрації $0,01 \times 10^6$ клітин/лунка в 384-лункові планшети з плоским дном і культивували протягом ночі.

На наступну добу додавали 25 мкл/лунка зразка PD1 або еталонного антитіла проти PD1

людини (Roche)/проти PD1 миші (Biolegend; кат.: 329 912) і інкубували протягом 2 годин за 4 °C (щоб уникнути інтерналізації). Після ретельного промивання (1×90 мкл/лунка PBST) клітини фіксували, додаючи 30 мкл/лунка 0,05 % глутаральдегіду (Sigma, кат. №: G5882, 25 %), розведеного в буфері 1x ФСБ, і інкубували протягом 10 хвилин за кімнатної температури. Після промивання (3×90 мкл/лунка PBST) для виявлення додавали 25 мкл/лунка вторинного антитіла: козячого антилюдського H+L-POD (JIR, JIR109-036-088)/овечого антимишачого POD (GE NA9310) з подальшою 1-годинною інкубацією за кімнатної температури на шейкері. Після промивання (3×90 мкл/лунка PBST) додавали 25 мкл/лунка розчину субстрату TMB (Roche 11835033001) та інкубували до досягнення ОП 1,0-2,0. Вимірювання в планшетах проводили за 370/492 нм.

Результати клітинного ІФА наведені у вигляді значень "ЕК₅₀ CHO-PD1" [нМ] в Таблиці 21 нижче.

ІФА для Lag3 людини

Планшети Nunc Maxisorp (Nunc 464718) покривали 25 мкл/лунка рекомбінантного химерного білка людського LAG-3 Fc (R&D Systems, 2319-L3) при концентрації білка 800 нг/мл і інкубували за 4 °C протягом ночі або протягом 1 год. за кімнатної температури. Після промивання (3×90 мкл/лунка буфером PBST) кожну лунку інкубували з 90 мкл блокуючого буфера (ФСБ + 2 % БСА + 0,05 % Твін-20) протягом 1 години за кімнатної температури. Після промивання (3×90 мкл/лунка буфером PBST) додавали 25 мкл зразків анти-Lag3 в концентрації 1-9 мкг/мл (розведення 1: 3 в буфері OSEP) і інкубували 1 год. за кімнатної температури. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка кон'югату HRP з козячим антитілом проти к-ланцюга людського Ig (Milipore, AP502P) у розведенні 1: 2000 і інкубували за кімнатної температури протягом 1 години. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка субстрату TMB (Roche, 11835033001) та інкубували протягом 2-10 хв. Вимірювання проводили на приладі Tecan Safire 2 за 370/492 нм.

ІФА для зв'язування Lag3 на клітинній поверхні

25 мкл/лунка Lag3 клітин (рекомбінантні клітини CHO, які експресують Lag3, 10000 клітин/лунка) висівали в 384-лункові планшети, призначені для культури тканини, (Corning, 3701) і інкубували за 37 °C протягом однієї або двох діб. На наступну добу після видалення середовища додавали 25 мкл зразків анти-Lag3 (розведення 1: 3 в буфері OSEP, починаючи з концентрації 6-40 нМ) і інкубували протягом 2 годин за 4 °C. Після промивання (1×90 мкл в PBST) клітини фіксували додаванням 30 мкл/лунка глутаральдегіду до кінцевої концентрації 0,05 % (Sigma, кат. №: G5882), протягом 10 хвилин за кімнатної температури. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка кон'югату HRP з козячим антитілом проти к-ланцюга людського Ig (Milipore, AP502P) у розведенні 1: 1000 і інкубували за кімнатної температури протягом 1 години. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка субстрату TMB (Roche, 11835033001) та інкубували протягом 6-10 хв. Вимірювання проводили на приладі Tecan Safire 2 за 370/492 нм. Результати клітинного ІФА наведені у вигляді значень "ЕК₅₀ CHO-LAG3" [нМ] в Таблиці 21 нижче.

Інгібування зв'язування LAG-3 з ГКГС-II, який експресується на пухлинних клітинах A375 людини (за допомогою ІФА)

25 мкл/лунка клітин A375 (10000 клітин/лунка) висівали в 384-лункові планшети, призначені для культури тканини, (Corning, 3701) і інкубували за 37 °C протягом ночі. Анти-Lag3 антитіла попередньо інкубували протягом 1 години з біотинільованим Lag3 (250 нг/мл) в середовищі для культивування клітин в розведеннях 1: 3, починаючи з концентрації антитіла 3 мкг/мл. Після видалення середовища з лунок з засіяними клітинами 25 мкл попередньо інкубованих сумішей антитіло-Lag3 переносили в лунки та інкубували протягом 2 год. за 4 °C. Після промивання (1×90 мкл в PBST) клітини фіксували додаванням 30 мкл/лунка глутаральдегіду до кінцевої концентрації 0,05 % (Sigma кат. №: G5882), протягом 10 хвилин за кімнатної температури. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка полі-HRP40-стрептавідину (Fitzgerald, 65R-S104PHRPx) у розведенні 1: 2000 або 1: 8000 і інкубували за кімнатної температури протягом 1 години. Після промивання (3×90 мкл/лунка з буфером PBST) додавали 25 мкл/лунка субстрату TMB (Roche, 11835033001) та інкубували протягом 2-10 хв. Вимірювання проводили на приладі Tecan Safire 2 за 370/492 нм. Результати аналізу інгібування за допомогою ІФА наведені у вигляді значень "ЕК₅₀ ГКГС II / ІФА" [нМ] в Таблиці 21 нижче.

Таблиця 21

Короткий опис зв'язування різних біспецифічних анти-PD1/анти-LAG3 антитіл

Біспецифічне антитіло	ІФА huPD1 E _{K50} [нМ]	ІФА huLAG3 E _{K50} [нМ]	E _{K50} CHO-PD1 E _{K50} [нМ]	E _{K50} CHO-LAG3 E _{K50} [нМ]	ГКГС-II/ІФА IC ₅₀ [нМ]
PD1/LAG3 0927 (PD1-0376/LAG3-0414) (1+1)	0,07	0,18	0,1	0,23	1,11
PD1/LAG3 0799 (PD1-0376/LAG3-0416) (1+1)	0,06	0,07	0,07	0,20	0,72
PD1/LAG3 0222 (PD1-0069/ LAG3 25F7) (1+1)	0,16	1,14	0,28	0,72	0,77
PD1/LAG3 0224 (PD1-0098/ LAG3 25F7) (1+1)	0,04	0,86	0,06	0,86	0,79
PD1/LAG3 8310 (PD1-0376/LAG3-0414) (1+2)	0,06	0,06	0,34	0,20	0,47
PD1/LAG3 8311 (PD1-0376/LAG3-0416) (1+2)	0,05	0,06	0,32	0,17	0,39
PD1/LAG3 1252 (PD1-0376/LAG3 25F7) (1+2)	0,03	0,02	0,31	0,64	0,47
PD1/LAG3 8970 (PD1-0376/LAG3-0414) (2+2)	0,05	0,04	0,46	0,20	0,45
PD1/LAG3 8984 (PD1-0376/LAG3-0416) (2+2)	0,05	0,05	0,54	0,17	0,44
PD1/LAG3 9010 (PD1-0376/LAG3-25F7) (2+2)	0,04	0,05	0,36	0,48	0,52

11.2 Зв'язування за допомогою Biacore

Антигензв'язуючі властивості мультиспецифічних антитіл, які зв'язуються з PD1 і LAG3

- 5 Зв'язування мультиспецифічних антитіл з їх відповідними цільовими антигенами, тобто PD1 і TIM3, оцінювали за допомогою Biacore®.

Зв'язування PD1 може бути оцінене у відповідності з наступною процедурою:

- 10 Антилюдський Fc IgG був іммобілізований шляхом приєднання аміну до поверхні сенсорного чипу CM5 (Biacore). Потім проводили захоплення зразків і зв'язування з ними hu PD1-ECD. Поверхню сенсорного чипу регенерували після кожного циклу аналізу. В результаті отримували константу рівноваги та кінетичні константи швидкості шляхом підгонки даних до моделі взаємодії Ленгмюра 1:1.

- 15 Близько 10000 одиниць відповіді (ОВ) 20 мкг/мл антилюдського IgG (GE Healthcare № BR-1008-39) були зв'язані з усіма проточними комітками сенсорного чипу CM5 в Biacore T200 з використанням набору для амінного сполучення, що поставляється GE Healthcare. Зразок і рухомий буфер являли собою HBS-EP + (0,01 М ГЕПЕС, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЕДТА, 0,05 % об./об. ПАР P20, pH 7,4). Температура проточної комірки була встановлена на 25 °C, а температура у відсіку для зразка - 12 °C. Система була заповнена рухомих буфером.

- 20 Різні зразки вводили протягом 15 секунд з концентрацією 10 нМ і послідовно зв'язували з проточними комітками 2, 3 і 4. Потім повний набір концентрацій людського PD1-ECD (300 нМ, 100 нМ, 2×33,3 нМ, 11,1 нМ, 3,7 нМ, 1,2 нМ і 2×0 нМ) вводили в кожен зразок протягом 300 с, після чого час дисоціації становив 10/600 с і дві стадії регенерації по 30 секунд з 3 М MgCl₂, з яких на останній була "додаткова промивка після ін'єкції" з рухомих буфером. В результаті дані подвійного контролю були апроксимовані до моделі взаємодії Ленгмюра 1: 1 з використанням програмного забезпечення Biacore T200 Evaluation.

Зв'язування LAG3 оцінювали відповідно до такої процедури:

Для виконання цього аналізу використовували набір Biacore SA CAP, який поставляється GE Healthcare. Значення кінетичних параметрів були отримані за 25 °C в буфері HBS-EP + (Ge Healthcare).

- 30 Чип SA CAP був закріплений в Biacore T200, як визначено в інструкції до набору CAP. Метод прогону містить чотири команди. Спочатку реагент CAP вводили протягом 300 с при швидкості потоку 10 мкл/хв. для гібридизації іммобілізованих одноланцюгових ДНК з використанням команди "General". За цією командою іде 15-секундна ін'єкція розведення 1 мкг/мл позаклітинного домену, міченого біотинільованим людським Fc Lag3 людини, у рухомих

буфері. Це призводить до рівня захоплення близько 50 ОВ. Одноциклову команду використовували для введення п'яти різних концентрацій зразка (100 нМ - 6,25 нМ, 2-кратне розбавлення) з наступною фазою дисоціації тривалістю 1200 секунд. Потім чип був регенерований, як визначено в інструкції до набору SA CAP.

Нарешті, отримані криві були оцінені з використанням програмного забезпечення Biacore T200 Evaluation версії 3.0.

Результати: Взаємодії не відповідали моделі зв'язування Ленгмюра 1:1, тому що всі зразки, крім 0799 і 0927, мають два Lag3-зв'язуючих фрагмента і, отже, демонструють авідність. Так як 0799 і 0927 містили невеликі помилки спарювання, наприклад, популяції бівалента, вони також демонстрували деяку авідність.

Тому сенсограми були ранжовані тільки відповідно до їх швидкості дисоціації. Це було зроблено шляхом візуального порівняння одноциклових кінетичних кривих. При цьому було показано, що комплекс 0416-Lag3 ECD більш стабільний, ніж будь-який інший в цьому наборі зразків. Моновалентний формат <Lag3> Crossmab (0799) як і раніше проявляє більш низьку швидкість дисоціації, ніж будь-який інший зразок в цьому експерименті.

Крім того, було видно, що афінний комплекс Lag3-0414/Lag3-0927-Lag3 ECD є найслабшим з тих, що спостерігаються в цьому експерименті. Афінно-зв'язуючі ділянки 0414 і 0416 можуть бути приблизно порівняні з афінними ділянками їх одновалентних відповідних ділянок 0927 і 0799 Crossmab. Результати наведені в Таблиці 22.

Таблиця 22

Якість зв'язування біспецифічних антитіл PD1-LAG3, яке визначається вимірюванням ППР

Зразок	Якість зв'язування
aLAG3(0414)	++
aLAG3(0416)	+++
PD1/LAG3 0927 (1+1)	+
PD1/LAG3 0799 (1+1)	+++
aLAG3(25F7)	++
aLAG3(MDX26H10)	++
aLAG3(BMS986016)	++
aLAG3(BAP050)	+

Оцінка авідності форматів транс в порівнянні з 1+1 біспецифічними антитілами 0927 і 0799:

Константи дисоціації біспецифічних молекул (зразок) і їх окремих мішеней, а також комбінації PD1 і LAG3 (аналіт) були визначені для оцінки приросту авідності, що забезпечується зв'язуванням з усіма валентностями одночасно.

Перед вимірюванням на Biacore 8K був приготовлений сенсорний чип CM5 з використанням стандартного набору для амінного сполучення, що поставляється GE Healthcare. Отримане в результаті власного виробництва антитіло, спрямоване проти специфічної мутації в Fc-частині зразка (тобто Fc-частини, яка несе мутації PGLALA), яка називається в цьому документі анти-PGLALA антитілом (такі антитіла описані в WO 2017/072210), проте було розведено до концентрації 50 мкг/мл в ацетатному буфері pH 5,0. Воно було зв'язане усіма проточними комірками та каналами зі швидкістю потоку 8 мкл/хв протягом 1200 с, що призвело до відклику зв'язування близько 19000 ОВ.

Буфер HBS-EP⁺ (GE HC) використовували в якості рухомого буфера для підготовки сенсорного чипу, а також самого основного циклу. Аналіз починали після запуску, що складається з трьох 17-секундних ін'єкцій зразка з подальшим етапом регенерації з використанням 10 мМ розчину NaOH. На першому етапі різні зразки були захоплені анти-PGLALA антитілом на двох окремих каналних проточних комірках на поверхні сенсорного чипу шляхом ін'єкції його протягом 17 с при швидкості потоку 10 мкл/хв. По-друге, одну з трьох аналізованих речовин (PD1, LAG3-Fc, злиття 2+2 PD1/LAG3-Fc) і впорскували в обидві проточні комірки протягом 200 с при швидкості потоку 50 мкл/хв., за якою слідував проміжок 1000 с (600 з в разі LAG3-Fc) фази дисоціації. Нарешті, комплекс анти-PGLALA антитіло/зразок розчиняли двома послідовними ін'єкціями (тривалістю 30 с) 10 мМ NaOH. Кожне окреме кінетичне визначення складалося з чотирьох циклів з різними концентраціями аналіту (0 нМ, 5 нМ, 25 нМ і 100 нМ).

Отримані дані були оцінені з використанням програмного забезпечення Biacore 8K Evaluation Software. Була застосована відповідна дисоціація 1:1, і отримані значення k_d були

перетворені в комплекс періоду півжиття в хвилинали. Різниця між авідним зв'язуванням зв'язуючої молекули злитого антигена PD1/Lag3-Fc, і її основною конкретною частиною (або PD1, або Lag3) була розрахована і відсортована за однією з трьох категорій, що описують приріст стабільності при мультівалентному та біспецифічному зв'язуванні (Таблиця 23).

5

Таблиця 23

Збільшення стабільності комплексу, що забезпечується авідністю біспецифічних антитіл PD1-LAG3, яка визначається вимірюванням ППР

Зразок	Якість зв'язування
PD1/LAG3 0927 (1+1)	++
PD1/LAG3 0799 (1+1)	+++
PD1/LAG3 0725 (транс 1+1)	+
PD1/LAG3 0750 (транс 1+2)	++

11.3. Димеризація клітинного PD1 і LAG3 після одночасної взаємодії за допомогою анти-PD1/анти-LAG3 біспецифічних антитіл

10 Біспецифічні анти-PD1/анти-LAG3 антитіла отримували в різних форматах, як описано в Прикладі 10. Цей клітинний аналіз використовували для демонстрації димеризації або, нарешті, зв'язування/взаємодії двох різних рецепторів, які злиті в цитоплазмі з двома фрагментами ферменту, при лігуванні або перехресному зшиванні з біспецифічним антитілом проти обох мішеней. Таким чином, тільки один рецептор не проявляє ферментативну активність. Для цієї специфічної взаємодії цитозольні С-кінці обох рецепторів окремо були злиті з гетерологічними субодинами репортерного ферменту. Одна тільки субодина ферменту не проявляла репортерну активність. Однак очікувалося, що одночасне зв'язування конструкту біспецифічного анти-PD1/анти-LAG3 антитіла з обома рецепторами призведе до локального цитозольного накопичення обох рецепторів, комплементу двох субодина гетерологічного ферменту і, нарешті, до утворення специфічного і функціонального ферменту, який гідролізує субстрат, тим самим генеруючи хемілюмінесцентний сигнал.

15 Щоб проаналізувати ефект перехресного зв'язування біспецифічних анти-PD1/анти-LAG3 антитіл, 10000 PD1⁺LAG3⁺ людських клітин U2OS/лунка висівали в білі 96-лункові планшети з плоским дном (costar, кат. № 3917) і культивували протягом ночі в середовищі для аналізу. На наступний день клітинне середовище видаляли та заміняли свіжим середовищем. Готували розведення антитіл або лігандів і додавали титровані кількості зазначених (біспецифічних) антитіл і інкубували за 37 °C протягом 2 годин. Потім додавали суміш субстрат/буфер (наприклад, реагент для виявлення PathHunterFlash) і знову інкубували протягом 1 години. Для вимірювання хемілюмінесценції, індукованої при одночасному зв'язуванні та димеризації, використовували рідер для множинного зчитування Тесла.

30 Результати представлені на Фіг. 5A і 5B. На графіку показана хемілюмінесценція (виміряна в ОВ) в залежності від концентрації антитіла. Моноспецифічні (бівалентні) анти-LAG3 антитіла не здатні викликати хемілюмінесцентний сигнал, тоді як всі біспецифічні анти-PD1/анти-LAG3 антитіла індукують хемілюмінесцентний сигнал в залежності від концентрації.

35 Щоб продемонструвати специфічність одночасного зв'язування (та індукції сигналу люмінесценції), був проведений конкурентний експеримент: Як показано перед обробкою біспецифічним антитілом (1252), індукувався сигнал люмінесценції в залежності від дози (Фіг. 5C). Якщо одне і теж біспецифічне антитіло вносили в присутності або антитіла aLAG3 (0156, MDX25F7), або анти-PD1 антитіла (0376), сигнал був або майже інгібований (для конкуренції PD1), або щонайменше значно знижений (LAG3). Обидва вихідних антитіла являють собою ті ж зв'язуючі речовини, що і біспецифічні антитіла (1252, формат 2+1 LAG3/PD1). Кожне з конкуруючих антитіла вводили в постійній концентрації 20 мкг/мл.

40 Результати подальшого експерименту продемонстровані на Фіг. 5D. Подібно попередньому конкурентному експерименту, інкубація з вихідними антитілами aLAG3 (0156) або PD1 (0376; кожне постійно в концентрації 10 мкг/мл) впливала на властивості зв'язування біспецифічного антитіла (1 252, формат 2+1 біспецифічного aLAG3-0156 і PD1-0376) для PD1 клітин з подвійною експресією Lag3, виміряних за сигналом люмінесценції. Конкуренція з анти-PD1 антитілом (0376), а також з рекомбінантним білком LAG3: Fc (0160) практично усувала сигнал, тоді як присутність єдиної зв'язуючої речовини aLAG3 (0156) призводила тільки до часткового пригнічення. Два інших анти-LAG3 антитіла 0414 і 0416, які зв'язуються з епітопом, відмінним від 0156, не конкурували за зв'язування з біспецифічним антитілом, що містить зв'язуючу речовину

50

aLAG3 (0156), тому що вони не модулювали сигнал значно.

У наступному експерименті порівнювали одночасне зв'язування біспецифічних анти-LAG3/анти-PD1 антитіл, що містять різні зв'язуючі речовини aLAG3 (0414 проти 0416) та різні формати (1+1 у порівнянні з 2+1) (Фіг. 6A-6D). Як описано вище, було протестовано кілька анти-LAG3/анти-PD1 біспецифічних антитіл або у форматі 1+1 CrossMab (0799 і 0927), або у форматі 2+1 (два LAG3-зв'язуючі плеча і один злитий C-кінцевий PD1 crossFab-фрагмент: 8311 та 8310). На Фіг. 6A і 6B продемонстровані криві (поглинання в залежності від концентрації) для конструктів з речовиною aLAG3-0416, а на Фіг. 6C і 6D криві для відповідних конструктів зі з'єднанням aLAG4-0414. Усі протестовані конструкти були здатні зв'язуватися з клітинами і викликати хемолюмінесценцію. Розраховані значення E_{K50} для кривих зв'язування наведені в Таблиці 24 нижче.

Таблиця 24

Значення E_{K50} , які виміряні в димеризаційному аналізі зв'язування

Біспецифічне антитіло	Формат	Молекулярна маса [кДа]	E_{K50} [нМ]
0927 (PD1-0376/LAG3-0414)	1+1	145	41
0799 (PD1-0376/LAG3-0416)	1+1	145	76
8310 (PD1-0376/LAG3-0414)	1+2	193	28
8311 (PD1-0376/LAG3-0416)	1+2	193	119

В іншому експерименті порівнювали одночасне зв'язування біспецифічних анти-LAG3/анти-PD1 антитіл, що містять іншу зв'язуючу речовину aLAG3 (0414 в порівнянні з 0416) і різні формати (2+1 в порівнянні з 2+2) (Фіг. 7A-7D). Були протестовані біспецифічні анти-LAG3/анти-PD1 антитіла у форматі 2+1 (два LAG3-зв'язуючі плеча і один злитий з C-кінцем PD1 crossFab-фрагмент: 8311 і 8310) або у форматі 2+2 crossmab (два LAG3-зв'язуючі плеча і два злитих з C-кінцем PD1 crossFab-фрагмента: 8970 та 8984). На Фіг. 7A і 7B продемонстровані криві (поглинання в залежності від концентрації) для конструктів з речовиною aLAG3-0414, а на Фіг. 7C і 7D криві для відповідних конструктів зі з'єднанням aLAG4-0416. Усі протестовані конструкти були здатні зв'язуватися з клітинами і викликати хемолюмінесценцію. Розраховані значення E_{K50} для кривих зв'язування наведені в Таблиці 25 нижче.

Таблиця 25

Значення E_{K50} , які виміряні в димеризаційному аналізі зв'язування

Біспецифічне антитіло	Формат	Молекулярна маса [кДа]	E_{K50} [нМ]
8310 (PD1-0376/LAG3-0414)	2+1	193	114
8311 (PD1-0376/LAG3-0416)	2+1	193	124
8970 (PD1-376/LAG3-0414)	2+2	242	83
8984 (PD1-0376/LAG3-0416)	2+2	242	91

У наступному експерименті одночасне зв'язування біспецифічного анти-LAG3/анти-PD1 антитіла PD1/LAG3 0927 в класичному форматі 1+1 CrossMab^{Vh-VL} порівнювали з біспецифічними анти-LAG3/анти-PD1 антитілами у форматі транс 1+1 (PD1/LAG3 0725) і форматі транс 2+1 (PD1/LAG3 0750). Для цього експерименту були застосовані наступні зміни в способі. Щоб проаналізувати ефект перехресного зв'язування різних форматів анти-LAG3/анти-PD1 антитіл, 7500 PD1⁺LAG3⁺ клітин U2OS людини/пунка висівали в білі 96-лункові планшети з плоским дном разом з непослідовними розведеннями антитіл (остаточний варіант) концентрації від 0,29 до 5484 пМ) та інкубували протягом 20 год. за 37 °C в CO₂-інкубаторі. Потім планшети для аналізу доводили до кімнатної температури і додавали суміш субстрат/буфер (реагент для виявлення PathHunterFlash, Discoverx) і знову інкубували протягом 4 годин. Для вимірювання хемілюмінесценції, індукованої при одночасному зв'язуванні та димеризації, використовували планшет-рідер SpectraMax L (Molecular Devices).

На Фіг. 7E криві залежності доза-відповідь (люмінесценція від концентрації) антитіл PD1-LAG3 1+1 CrossMab (0927), 1+1 біспецифічних транс-CrossMab з N-кінцевим aPD1 і C-кінцевих aLAG3 (0725), а також 2+1 транс CrossMab з N-кінцевим aPD1 і N-плюс C-кінцевим aLAG3

(0750). У порівнянні з PD1/LAG3 0927 ефект перехресного зв'язування рецептора LAG3 PD1 у PD1/LAG3 0725 явно вище, тоді як ефект для PD1/LAG3 0750 трохи нижче.

11.4. Вимірювання біспецифічних варіантів анти-LAG3/анти-PD1 транс-CrossMab в комбінованому репортерному аналізі PD-1 і LAG-3

Щоб перевірити нейтралізуючу активність різних форматів анти-PD1-LAG3 антитіл при відновленні пригніченої Т-клітинної відповіді *in vitro*, використовували комерційно доступну репортерну систему. Комбінований біоаналіз PD1 і LAG3 складається з репортерних клітин, що експресують PD1-, LAG3- і Т-клітинний рецептор (ТКР), ГКГС-II- і PDL1-експресуючих пухлинних клітин і ТКР-активуючого антигена.

Ефекторними клітинами є Т-клітини Jurkat, які експресують людський PD1, людський LAG3, людський ТКР і репортер люциферази, який регулюється елементом відповіді NFAT (NFAT-RE). Цільовими клітинами є клітини A375, які експресують людський PD-L1. Коротше кажучи, система репортерів заснована на трьох етапах: (1) ТКР активованої антиген-індукованої активації NFAT-клітин, (2) інгібуванні активуючого сигналу, опосередкованого взаємодією між ГКГСII (клітини A375) і LAG3+ (клітини Jurkat), а також PD-L1 (клітини A375) і PD1 (клітини Jurkat) і (3) відновленні сигналу активації NFAT за допомогою PD1 і LAG3-антагоністичних/нейтралізуючих антитіл.

Для цього експерименту 1×10^4 цільових клітин A375 на лунку інкубували протягом ночі з активуючим ТКР антигеном (Promega) в 96-лункових планшетах для аналізу з плоским дном у CO₂-інкубаторі за 37 °С. Потім середовище з планшетів видаляли і додавали серійні розведення (кінцева концентрація для аналізу від 0,01 нМ до 857 нМ) анти-LAG3/анти-PD1 антитіл, а також 5×10^4 ефекторних клітин Jurkat на лунку. Після 6 години інкубації за 37 °С в CO₂-інкубаторі аналітичні планшети доводили до кімнатної температури і в кожен лунку додавали 80 мкл субстрату ONE-Glo Ex (Promega). Після 10 хв інкубації люмінесценцію вимірювали в планшет-рідері SpectraMax L (Molecular Devices). Очікувалося, що одночасне зв'язування конструкту біспецифічного анти-PD1/анти-LAG3 антитіла з обома рецепторами призведе до локального цитозольного накопичення обох рецепторів, комплементу двох гетерологічних субодиниць ферменту і, нарешті, до утворення специфічного і функціонального ферменту, який гідролізує субстрат, тим самим генеруючи хемілюмінесцентний сигнал. На Фіг. 7F зображені криві залежності доза-відповідь (люмінесценція в залежності від концентрації) біспецифічних анти-PD1/анти-LAG3 антитіл 1+1 CrossMab (0927), 1+1 транс-CrossMab з N-кінцевим aPD1 і C-кінцевим aLAG3 (0725), а також 2+1 транс CrossMab з N-кінцевим aPD1 і N-плюс C-кінцевим aLAG3 (0750). Здатність 0927 і 0725 відновлювати активацію репортерних клітин шляхом блокування взаємодії PD1 і LAG3 з їх відповідними лігандами можна порівняти, тоді як для 0750 вона вище. Це також продемонстровано значеннями EK₅₀, наведеними в Таблиці 26.

Таблиця 26:

Значення EK₅₀, які виміряні в комбінованому репортерному аналізі PD-1 і LAG-3

Біспецифічне антитіло	Формат	Молекулярна маса [кДа]	EK ₅₀ [нМ]
PD1/LAG3 0927	цис 1+1	145259	3,1
PD1/LAG3 0725	транс 1+1	145890	2,2
PD1/LAG3 0750	транс 2+1	192888	0,6

Приклад 12

Функціональна характеристика біспецифічних анти-PD1/анти-LAG3 антитіл

12.1. Зниження інтерналізації при зв'язуванні з поверхнею Т-клітин

Вимірювання інтерналізації рецепторів за допомогою проточної цитометрії

Інтерналізація рецепторів являє собою важливе поглинання для молекули, яка може розкладатися протягом декількох годин, в той час як цільові рецептори швидко повторно експресуються на поверхні клітини, готової пригнічувати ТКР-сигналінг. Тому ми оцінили інтерналізацію рецепторів при зв'язуванні наших конструктів за допомогою проточної цитометрії, де зразки, які забарвлені різними біспецифічними форматами за 4 °С, використовували як еталон для порівняння із зразками, які інкубували за 37 °С протягом 3 годин після забарвлення за 4 °С.

На третю добу поліклонально активовані CD4 Т-клітини, попередньо культивовані з 1 мкг/мл зв'язаного в планшеті анти-CD3 і 1 мкг/мл розчинних анти-CD28 антитіл, інкубували в присутності анти-LAG3 або біспецифічних анти-PD1/анти-LAG3 антитіл (у двох повторностях)

протягом 30 хвилин за 4 °C. Потім клітини відмивали, розділяли на дві групи, одну з яких інкубували протягом 3 додаткових годин за 37 °C, а іншу негайно забарвлювали міченим вторинним антитілом (eBioscience), після чого фіксували за допомогою BD Cell Fix. Після 3-годинної інкубації також другу групу клітин забарвлювали міченим вторинним антитілом після чого проводили фіксацію. Після забарвлення клітини двічі промивали ФСБ/2 % ФБС перед детекцією.

Клітини були отримані в LSRFortessa (BD Biosciences), і рівні експресії виявлюваного антитіла на клітинній поверхні порівнювали між двома групами. Результати представлені на Фіг. 8В. Ми спостерігали, що через 3 години всі біспецифічні формати, а також моноспецифічне двовалентне антитіло aLAG-3 були інтерналізовані, однак біспецифічні анти-PD1/анти-LAG3 у форматі 1+1 (PD1/LAG3 0799 і PD1 / LAG3 0927) були найменш інтерналізовані.

Візуалізація локалізації та інтерналізації антитіл за допомогою флуоресцентної конфокальної мікроскопії

Активовані CD4-позитивні клітини забарвлювали CMFDA (Invitrogen) і поміщали на круглі покривні скельця, які оброблені ретронектином (Takara Bio). Клітинам давали для адгезії 4 години за 37 °C перед міченням флуоресцентними антитілами (1 мкг/мл: a-LAG3 (1 256), 1+1 PD1/LAG3 біспецифічне (0927), PD1-LAG3 1+2 біспецифічне (8310) і PD1-LAG3 2+2 біспецифічне (8970), мічені Alexa 647), додавали безпосередньо в живильне середовище протягом різних періодів часу (15 хвилин, 1 година і 3 години). Холодний ФСБ (Lonza) використовували для гасіння реакції і вимивання незв'язаних антитіл. Потім клітини фіксували за допомогою Cytofix (BD) протягом 20 хвилин за 4 °C та двічі промивали ФСБ (Lonza). Потім покривні скельця переносили і монтували на предметні скельця з допомогою Fluoromount G (eBioscience) і витримували в темряві за 4 °C протягом ночі перед отриманням зображення. А) Флуоресцентні зображення продемонстровані на Фіг. 9А. Білий сигнал являє собою локалізацію міченого антитіла. В) Інтенсивність флуоресцентного сигналу від мембранної ROI (області, яка представляє інтерес) цільових клітин була розділена на інтенсивність флуоресцентного сигналу від ROI цитоплазми тих самих клітин, що призвело до співвідношення, яке відображається на діаграмах. Для порівняння зразків використовували однофакторний дисперсійний аналіз з критерієм найменшої значущої різниці Фішера) (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). Результати представлені на Фіг. 9В. Аналіз в часі демонструє більш високу мембранну локалізацію біспецифічних антитіл і антитіл до LAG3 у порівнянні з внутрішньоклітинною кластеризацією антитіл до TIM3 (використовується в якості контролю). Ми спостерігали, що через 3 години всі біспецифічні формати, а також моноспецифічне двовалентне антитіло aLAG-3 були інтерналізовані, за винятком тільки біспецифічного 1+1 PD1/LAG3 (0927) (Фіг. 9А).

Флуоресцентну конфокальну мікроскопію виконували на інвертованому LSM 700 Zeiss з олійно-іммерсійним об'єктивом при 60-кратному збільшенні. Зображення збирали з використанням програмного забезпечення Zen (Zeiss), підключеного до мікроскопа. Аналіз зображень проводили за допомогою програмного забезпечення Imaris (Bitplane; Oxford Instrument), а статистичний аналіз виконували за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism (Graphpad Software).

12.2. Зв'язування з типовими Т-клітинами в порівнянні з Трег

Бажана властивість цільових PD1-LAG3 біспецифічних антитіл полягає в здатності переважно зв'язуватися з типовими Т-клітинами, а не з Трег, оскільки LAG3 на Трег, мабуть, негативно регулює їх супресивну функцію. Тому націлювання LAG3 на Трег з блокуючими антитілами може бути негативним, збільшуючи їх переважну функцію і, у кінцевому підсумку, маскуючи позитивний блокуючий ефект щодо інших Т-клітин. Тому ми оцінили конкурентне зв'язування різних форматів біспецифічних анти-PD1/анти-LAG3 з активованими типовими та регуляторними Т-клітинами, що культивуються разом.

Регуляторні Т-клітини (Трег) і типові Т-клітини (Ттип) були відсортовані від здорових донорських МПКК (Miltenyi), мічених 5 мМ мембранними барвниками CellTraceViolet або CFSE, відповідно, і культивували разом в співвідношенні 1:1 протягом 3 діб з 1 мкг/мл зв'язаних на планшеті анти-CD3 і 1 мкг/л розчинних анти-CD28 антитіл. На 3-ю добу клітини інкубували протягом 30 хв. за 4 °C або з міченими безпосередньо анти-PD1, анти-LAG3 або біспецифічними антитілами, фіксували за допомогою BD Cell Fix, і сортували в LSRFortessa (BD Biosciences).

У той час як моноспецифічне вихідне анти-LAG3 антитіло однаково добре зв'язується з Трег і типовими Т-клітинами (Фіг. 10А), аналог анти-PD1 зв'язується переважно з типовими Т-клітинами через більш високі рівні експресії PD1 на ефекторних Т-клітинах, ніж на Трег (Фіг. 10В). Цікаво, що також формат 1+1 біспецифічного антитіла PD1/LAG3 (0927) зберігав здатність переважно зв'язуватися з типовими Т-клітинами, ніж з Трег (Фіг. 10С). Це найкраще зв'язування

з типовими Т-клітинами також можна візуалізувати, демонструючи різницю (дельта) сигналу на типових Т-клітинах у порівнянні з сигналом на Трег (Фіг. 10D). Формати 2+1 і 2+2 не виявляють селективності, яка обумовлена авідністю, для ефektorних Т-клітин і можуть бути порівняні за їх зв'язуванням з моноспецифічним анти-LAG3 антитілом.

5 12.3 Вплив блокування PD-1 і LAG-3 на Трег пригнічення вивільнення гранзиму В і ІФН-γ CD4 Т-клітинами людини, спільно культивованими з опроміненими алогенними МКПК

Далі було перевірено, чи будуть відмінності у властивостях зв'язування форматів біспецифічних антитіл забезпечувати якусь функціональну перевагу для Ттип в порівнянні з Трег. У функціональних дослідженнях, що включають аналізи пригнічення регуляторними Т-клітинами (Трег), МКПК від одного і того ж донора були розділені на дві проби: одна була збагачена CD4 Т-клітинами, а інша - Трег, визначеними як CD4⁺CD25^{high} CD127^{low} Т-клітини, за допомогою набору мікрогранул (Miltenyi Biotec). Після того як дві популяції були очищені, CD4 Т-клітини були помічені 5 мкМ карбокси-флуоресцеїн-сукцинімідиліловим складним естером (CFSE), в той час як Трег були помічені 5 мкМ барвником Cell-Trace-Violet (CTV), щоб мати можливість розрізняти їх пізніше за допомогою проточної цитометрії.

15 CD4 Т-клітини (10⁵) і Трег (10⁵) потім спільно культивували в 96-лунковому планшеті в співвідношенні 1:1 разом з опроміненими МКПК (10⁵) від неспорідненого донора в присутності або у відсутності наших анти-LAG3 антитіл (цільове 0414 і резервне 0416) або конкурентних анти-LAG3 антитіл (BMS-986016 і гуманізованого BAP050) у комбінації з нашим анти-PD1 антитілом в концентрації 10 мкг/мл. В якості контролю для оцінки величини пригнічення ефektorних функцій CD4 Т-клітин за допомогою Трег, CD4 Т-клітини (10⁵) також спільно культивували з опроміненими МКПК (10⁵) у відсутності Трег.

20 Через п'ять діб ми зібрали супернатанти клітинних культур, які пізніше використовували для вимірювання рівнів ІФН-γ за допомогою ІФА (R&D systems), і залишали клітини за 37 °C на додаткові 5 годин у присутності Golgi Plug (Брефельдін А) і Golgi Stop (Монензин). Потім клітини промивали, забарвлювали на поверхні антитілом проти CD4 людини і барвником Aqua (Invitrogen) для прижиттєвого забарвлення/забарвлення мертвих клітин після чого проводили фіксацію/пермеабілізацію в буфері Fix/Perm Buffer (BD Bioscience). Ми провели внутрішньоклітинне забарвлення на гранзим В (BD Bioscience) та ІФН-γ (eBioscience).

30 Результати представлені на Фіг. 11. Наше біспецифічне антитіло PD1/LAG-3 (0927) викликало вихід Ттип з жорсткого контролю регуляторними Т-клітинами, про що свідчить секреція значно більш високої кількості гранзиму В, ніж Ттип, в присутності вихідного анти-PD1 антитіла або одного пембролізумабу (P<0,05) або у відсутності інгібіторів контрольної точки (P<0,001). Конкурентне анти-LAG3 антитіло BMS-986016 у комбінації з ніволумабом істотно не зберігало ефektorні функції Ттип від пригнічення Трег.

12.4 Вплив біспецифічних антитіл до PD-1/LAG-3 на цитотоксичне вивільнення гранзиму В людськими CD4 Т-клітинами, які спільно культивуються з лімфобластною В-клітинною лінією (ARH77)

40 Ми оцінили здатність наших різних форматів біспецифічних антитіл індукувати секрецію гранзиму В CD4 Т-клітинами при спільному культивуванні з лінією пухлинних клітин ARH77 в порівнянні з комбінацією вихідних анти-PD1 і анти-LAG-3 і з анти-PD-1 антитілами, що використовуються в стандарті лікування.

45 Всього було протестовано 6 форматів, 3 з яких були отримані від комбінації анти-PD1 (0376) і анти-LAG3 (гуманізоване 1256, химерних 0414) і 3 додаткових формати від анти-PD1 (0376) і анти-LAG-3 (гуманізованих 1257, химерних 0416) антитіл.

50 Як видно на Фіг. 13, два біспецифічних формати, 1+1 (0927) і 2+2 (8970), отриманих з анти-LAG3 (гуманізованого 1256, анти-LAG3 0414 як IgG1 PGLALA) і анти-PD1 (0376), також як і комбінація вихідних антитіл, значно посилювала секрецію гранзиму В CD4 Т-клітинами у порівнянні з необробленими CD4 Т-клітинами (P=0,0005, P=0,01 і P=0,0001, відповідно). Відповідний формат 2+1 (8310) продемонстрував аналогічну тенденцію, однак він не досяг статистичної значущості (P=0,07).

55 Що стосується біспецифічних антитіл, отриманих комбінуванням анти-LAG-3 (гуманізоване 1257, анти-LAG3 0416 в якості IgG1 PGLALA) з анти-PD1 (0376), то формат 1+1 (0799) і 2+2 (8984) значно збільшував частоти гранзим-В-позитивних CD4 Т-клітин у порівнянні з необробленими CD4 клітинами (P=0,0032 і P=0,0064, відповідно).

60 Ні ніволумаб, ні пембролізумаб істотно не сприяли більш високій секреції гранзиму В CD4 Т-клітинами у порівнянні з клітинами, культивованими у відсутності інгібіторів контрольної точки. (Фіг. 13).

Вплив протестованих біспецифічних антитіл PD1-LAG3 на цитотоксичне вивільнення гранзиму В

Зразок	Вплив
PD1/LAG3 0927 (1+1)	+++
PD1/LAG3 8970 (2+2)	+
PD1/LAG3 8310 (1+2)	+/-
PD1/LAG3 0799 (1+1)	++
PD1/LAG3 8984 (2+2)	++
PD1/LAG3 8311 (1+2)	+/-
aLAG3(BMS986016)	++

12.5 Вплив блокування PD-1 і LAG-3 на секрецію гранзиму В і ІФН-γ CD4 Т-клітинами з МКПК пацієнтів з меланою після вторинної імунної відповіді за допомогою імуногенних пептидних пулів меланома-антиген

5 Раніше було описано, що МКПК пацієнтів з меланою містять вимірювану частоту неоантиген-специфічних Т-клітин. Отже, для підтвердження концептуальних цілей комбінація анти-LAG-3 антитіла (0414) плюс анти-PD-1 (0376) в порівнянні з похідним біспецифічного антитіла у форматі 1+1 (0927) або тільки анти-PD-1 була протестована на МКПК пацієнтів з меланою, повторно стимульованих протягом ночі пептидними пулами асоційованих з

10 меланою антигенів.
 10⁵-10⁶ МКПК від пацієнтів з меланою, інкубували за кімнатної температури в присутності або у відсутності насичуючих концентрацій (10 мкг/мл) тільки анти-PD-1 (0376) у комбінації з анти-LAG-3 (0414, 10 мкг/мл) антитілом або біспецифічним антитілом формату 1+1 (0927, 20 мкг/мл). Потім Т-клітини повторно стимулювали протягом ночі пулом імуногенних пухлинних

15 антигенів, таких як MAGEA1, MAGEA3, MAGEA4, Melan-A/MART-1, NYESO-1, білок меланоцитів Pmel 17 gp100, тирозиназа, тирозиназа-залежний білок 2 в присутності інгібіторів транспорту білка Golgi Plug (Брефельдін А) і Golgi Stop (Монензин).
 Потім клітини промивали, забарвлювали на поверхні антитілом проти CD4 людини і

20 прижиттєвим/мертвим фіксуючим барвником Aqua (Invitrogen), попередньо з фіксацією/пермеабілізацією в буфері Fix/Perm Buffer (BD Bioscience). Внутрішньоклітинне забарвлення проводили на гранзим В (BD Bioscience) і ІФН-γ (eBioscience).
 Обидві комбінації анти-LAG-3 і анти-PD-1 антитіл (P <0,01 і P <0,001), і біспецифічного антитіла (P <0,01 и P <0,0001) значно посилювали специфічні для пухлинного антигена

25 ефекторні функції Т-клітин (тобто секрецію гранзиму В і ІФН-γ), в той час як блокування PD-1 саме по собі не продемонструвало ніякого ефекту (Fig. 12).
 Приклад 13
 Потужний протипухлинний ефект при комбінованій терапії біспецифічними антитілами PD1/LAG3 і CD3 TCB CEACAM5 in vivo

30 Молекули TCB були отримані відповідно до способів, описаних у WO 2014/131712 A1 або WO 2016/079076 A1. Отримання анти-CEA/анти-CD3 біспецифічного антитіла (CEA CD3 TCB або CEA TCB), використаного в експериментах, описано в Прикладі 3 WO 2014/131712 A1. CEA CD3 TCB являє собою антитіло "2+1 IgG CrossFab" і складається з двох різних важких ланцюгів і двох різних легких ланцюгів. Точкові мутації в домені CH3 ("виступи-в-отвори") були введені для прискорення складання двох різних важких ланцюгів. Обмін доменів VH і VL в CD3-зв'язуючому Fab здійснювали для того, щоб сприяти правильній збірці двох різних легких ланцюгів. 2+1 означає, що молекула має два антигензв'язуючі домени, специфічних для CEA, і один антигензв'язуючий домен, специфічний для CD3. CEA CD3 TCB містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148 та SEQ ID NO: 149. CEACAM5 CD3 TCB має той самий формат, але містить іншу зв'язуючу речовину CEA і містить точкові мутації в доменах CH і CL зв'язуючої речовини CD3, щоб підтримувати правильне спарювання

40 легких ланцюгів. CEACAM5 CD TCB містить амінокислотні послідовності SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152 та SEQ ID NO: 153.
 а) Експериментальний матеріал і способи
 Біспецифічне антитіло PD1/LAG3 0927 тестували в концентрації 1,5 мг/кг або 3 мг/кг у комбінації з CD3 TCB людини CEACAM5 на моделі раку підшлункової залози людини ВХРС3. Клітини ВХРС3 прищеплювали підшкірно з клітинною лінією фібробластів миші (3Т3) гуманізованим NSG мишам.

Приготування лінії клітин ВХРС3: Клітини ВХРС3 (клітини раку підшлункової залози людини)

були спочатку отримані з ECACC (Європейська колекція клітинних культур) і після розмноження депоновані у внутрішньому банку клітин Glusart. Клітини ВХРС3 культивували в RPMI, що містить 10 % ФБС (РАА Laboratories, Австрія), 1 % Glutamax. Клітини культивували при 37 °C у водонасиченому середовищі при 5 % CO₂.

Підготовка повністю гуманізованих мишей: Самок мишей NSG у віці 4-5 тижнів на початку експерименту (лабораторія Джексона) розміщали в умовах відсутності специфічних патогенів з щоденними циклами 12 год. світла/12 год. темряви відповідно до встановлених рекомендацій (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол експериментального дослідження був розглянутий і схвалений місцевим урядом (Р 2011/128). Після прибуття тварин утримували протягом одного тижня, для звикання до нового середовища та спостереження. Безперервний моніторинг здоров'я проводили на регулярній основі. Мишам NSG вводили внутрішньочеревно 15 мг/кг бусульфана, а через добу внутрішньовенну ін'єкцію 1×10⁵ людських гемопоетичних стовбурових клітин, виділених з пуповинної крові. На 14-16 тижні після ін'єкції стовбурових клітин у мишей відбирали кров сублінгвально і аналізували кров методом проточної цитометрії по відношенню до успішної гуманізації. Ефективно щеплених мишей рандомізували відповідно до частоти їх Т-клітин в різних групах лікування.

Ефективність експерименту: Повністю гуманізованих мишей HSC-NSG підшкірно заражали 1×10⁶ клітин ВХРС3 (клітинна лінія карциноми підшлункової залози людини, що експресує SEACAM5) на 0 добу в присутності матригелю в співвідношенні 1:1. Пухлини вимірювали 2-3 рази в тиждень протягом усього експерименту за допомогою штангенциркуля. На 15 добу мишей рандомізували за розміром пухлини із середнім розміром пухлини 250 мм³ і починали щотижневу заплановану терапію (носії (гістидиновий буфер), анти-PD1 (0376), ніволумаб, пембролізумаб або анти-PD1-LAG3 0927), за допомогою внутрішньочеревної ін'єкції максимально 400 мкл. Ріст пухлини вимірювали 2-3 рази в тиждень з використанням штангенциркуля, а об'єм пухлини розраховували наступним чином:

$T_v: (W^2/2) \times L$ (W: ширина, L: довжина)

Дослідження було припинено на 47 добу.

b) Результати

Вимірювання об'ємів пухлин (мм³ +/- СПС) протягом 47 діб показані як середній об'єм у відповідній групі лікування мишей на Фіг. 14. Лікування SEACAM5-TCB демонструє тільки прогресування захворювання, ідентичне необробленій групі носія. Навпаки, ніволумаб і пембролізумаб зменшували ріст пухлини, однак, не досягаючи контролю росту пухлини. Несподівано було виявлено, що біспецифічне антитіло PD1/LAG3 0927 в концентрації 3 мг/кг повністю пригнічувало ріст пухлини у всіх тварин, які отримували лікування, демонструючи синергізм спільного блокування LAG-3 на додаток до PD-1.

На Фіг. 15A-15F показані вимірювання об'ємів пухлин (мм³ +/- СПС) протягом 47 діб для кожної окремої тварини, що демонструє однорідність протипухлинної відповіді в кожній групі.

Статистична значущість була розрахована з використанням критерію Даннета на підставі одноразової обробки SEACAM5 CD3 TCB. Для перевірки значних відмінностей в групових середніх для множинних порівнянь автоматично проводиться стандартний дисперсійний аналіз (ANOVA) з використанням критерію Даннета. Критерій Даннета перевіряє, чи відрізняються середні значення від контрольної групи.

Отримані значення TGI і TCR показані в Таблиці 28 (TGI означає інгібування росту пухлини, TGI > 100 означає регресію пухлини, а TGI=100 визначається як зупинка росту пухлини, TCR означає співвідношення лікування до контролю, TCR=1 означає відсутність ефекту і TCR=0 визначається як повна регресія).

Таблиця 28

Інгібування росту пухлини (TGI) і співвідношення лікування до контролю (TCR) на 46-у добу

Група (46 доба, еталонне SEACAM5-TCB)	TGI	TCR	p-значення
SEACAM5 CD3 TCB 2,5 мг/кг+анти-PD1/LAG3 0927 1,5 мг/кг	93,06119	0,207878	0,0056
SEACAM5 CD3 TCB 2,5 мг/кг + анти-PD1/LAG3 0927 3 мг/кг	79,22326	0,006863	0,005
SEACAM5 CD3 TCB 2,5 мг/кг + ніволумаб 1,5 мг/кг	32,9787	0,668563	0,513
SEACAM5 CD3 TCB 2,5 мг/кг + пембролізумаб 1,5 мг/кг	55,33328	0,437398	0,07

Порівняння з контролем далі показано у вигляді р-значень з використанням критерію Даннета.

Лікування за допомогою CEACAM5 CD3 TCB не може контролювати ріст пухлини в разі раку підшлункової залози. Однак його комбінація з біспецифічним антитілом анти-PD1/LAG3 0927 призводить до сильного впливу на контроль пухлини дозозалежним чином. Статистичний аналіз продемонстрував, що комбінація з анти-PD1/LAG3 0927, але не з анти-PD1 антитілами ніволумабом і пембролізумабом, в обох концентраціях призводила до статистично значущої відмінності в контролі росту пухлини в порівнянні з одноразовим введенням, що свідчить про перевагу біспецифічного анти-PD1/LAG3 антитіла в порівнянні з пригніченням тільки PD1, що призводить до зупинки росту пухлини.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

15 <110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Біспецифічні антитіла, які специфічно зв'язуються з PD1 і LAG3

20 <130> P34215-W0

<150> EP17165125.0

<151> 2017-04-05

<160> 169

25 <170> PatentIn версії 3.5

<210> 1

<211> 7

30 <212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> HVR-H1 важкого ланцюга, PD1-0103

35 <400> 1

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr

1 5

40 <210> 2

<211> 3

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

45 <220>

<223> HVR-H2 важкого ланцюга, PD1-0103

<400> 2

50 Gly Gly Arg

1

<210> 3

55 <211> 9

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> HVR-H3 важкого ланцюга, PD1-0103

<400> 3

5 Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp
1 5

<210> 4
<211> 11
10 <212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> HVR-L1 легкого ланцюга, PD1-0103

15 <400> 4

Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe
1 5 10

20 <210> 5
<211> 3
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

25 <220>
<223> HVR-L2 легкого ланцюга, PD1-0103

<400> 5

30 Arg Ser Ser
1

35 <210> 6
<211> 6
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
40 <223> HVR-L3 легкого ланцюга, PD1-0103

<400> 6

Asn Tyr Asp Val Pro Trp
1 5

45 <210> 7
<211> 120
<212> Білок
50 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, PD1-0103

55 <400> 7

Glu Val Ile Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

5 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Asp Trp Val
35 40 45

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

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

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

15 Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln
100 105 110

20 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 111
<212> Білок
25 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> варіабельний домен легкого ланцюга VL, PD1-0103

30 <400> 8

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

35 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

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

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
85 90 95

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

<210> 9
<211> 120
55 <212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> гуманізований варіант - варіабельний домен важкого ланцюга VH PD1-

0103_01

(PD1 0376)

<400> 9

5

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

10

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

15

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

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

20

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

25

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

30

<210> 10

<211> 111

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

35

<220>

<223> гуманізований варіант -варіабельний домен легкого ланцюга VL PD1-0103_01
(PD1 0376)

<400> 10

40

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

45

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

50

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

55

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

Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

	100	105	110
	<210> 11		
	<211> 111		
5	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
10	<223> гуманізований варіант -варіабельний домен легкого ланцюга VL PD1-0103_02		
	<400> 11		
15	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly		
	1 5 10 15		
	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser		
	20 25 30		
20	Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro		
	35 40 45		
	Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp		
25	50 55 60		
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser		
	65 70 75 80		
30	Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr		
	85 90 95		
	Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
	100 105 110		
35	<210> 12		
	<211> 111		
	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
40	<220>		
	<223> гуманізований варіант -варіабельний домен легкого ланцюга VL PD1-0103_03		
	<400> 12		
45	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	1 5 10 15		
	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser		
	20 25 30		
50	Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro		
	35 40 45		
	Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala		
55	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 Gln Asn Tyr
85 90 95

5 Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 13
<211> 111
<212> Білок
10 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> гуманізований варіант -варіабельний домен легкого ланцюга VL PD1-0103_04

15 <400> 13

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

20 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
20 25 30

Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

25 Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Ile 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

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

35 Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 14
<211> 5
40 <212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> HVR-H1 важкого ланцюга, aLAG3(0414)

45 <400> 14

Asp Tyr Thr Met Asn
1 5

50 <210> 15
<211> 17
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

55 <220>
<223> HVR-H2 важкого ланцюга, aLAG3(0414)

<400> 15

	Val	Ile	Ser	Trp	Asp	Gly	Gly	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val	Lys
	1				5					10					15	
5	Gly															
	<210> 16															
	<211> 12															
10	<212> Білок															
	<213> Штучна послідовність															
	<220>															
	<223> HVR-H3 важкого ланцюга, aLAG3(0414)															
15	<400> 16															
	Gly	Leu	Thr	Asp	Thr	Thr	Leu	Tyr	Gly	Ser	Asp	Tyr				
	1				5					10						
20	<210> 17															
	<211> 11															
	<212> Білок															
	<213> Штучна послідовність															
25	<220>															
	<223> HVR-L1 легкого ланцюга, aLAG3(0414)															
	<400> 17															
30	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	Leu	Asn					
	1				5					10						
	<210> 18															
35	<211> 7															
	<212> Білок															
	<213> Штучна послідовність															
	<220>															
40	<223> HVR-L2 легкого ланцюга, aLAG3(0414)															
	<400> 18															
45	Ala	Ala	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser									
	1				5											
	<210> 19															
	<211> 9															
	<212> Білок															
50	<213> Штучна послідовність															
	<220>															
	<223> HVR-L3 легкого ланцюга, aLAG3(0414)															
55	<400> 19															
	Gln	Gln	Thr	Tyr	Ser	Ser	Pro	Leu	Thr							
	1				5											

<210> 20
 <211> 121
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

5

<220>
 <223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, aLAG3(0414)

<400> 20

10

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

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

20

Ala Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

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

25

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

Ala Lys Gly Leu Thr Asp Thr Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

30

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

35

<210> 21
 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

40

<220>
 <223> варіабельний домен легкого ланцюга VL, aLAG3(0414)

<400> 21

45

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

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

50

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

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

55

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

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

5	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100						105		

	<210>	22
	<211>	5
	<212>	Білок
10	<213>	Штучна послідовність

	<220>	
	<223>	HVR-H1 важкого ланцюга, aLAG3(0403)

15	<400>	22
----	-------	----

	Asp	Tyr	Thr	Met	His
	1			5	

20	<210>	23
	<211>	17
	<212>	Білок
	<213>	Штучна послідовність

25	<220>	
	<223>	HVR-H2 важкого ланцюга, aLAG3(0403)

	<400>	23
--	-------	----

30	Leu	Val	Ser	Trp	Asp	Gly	Gly	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Asn	Ser	Val	Lys
	1				5					10					15	

	Gly
--	-----

35	<210>	24
	<211>	12
	<212>	Білок
	<213>	Штучна послідовність

40	<220>	
	<223>	HVR-H3 важкого ланцюга, aLAG3(0403)

	<400>	24
--	-------	----

45	Ala	Ile	Thr	Asp	Thr	Ser	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Asp	Tyr
	1				5				10			

	<210>	25
	<211>	11
	<212>	Білок
	<213>	Штучна послідовність

	<220>	
55	<223>	HVR-L1 легкого ланцюга, aLAG3(0403)

	<400>	25
--	-------	----

	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	Leu	Asn
--	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1	5	10
	<210> 26		
	<211> 7		
5	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
10	<223> HVR-L2 легкого ланцюга, aLAG3(0403)		
	<400> 26		
	Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser		
15	1	5	
	<210> 27		
	<211> 9		
	<212> Білок		
20	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> HVR-L3 легкого ланцюга, aLAG3(0403)		
	<400> 27		
25	Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr		
	1	5	
	<210> 28		
30	<211> 121		
	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
35	<223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, aLAG3(0403)		
	<400> 28		
40	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1	5	10 15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr		
		20	25 30
45	Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
		35	40 45
	Ser Leu Val Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asn Ser Val		
50		50	55 60
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
	65	70	75 80
55	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys		
		85	90 95
	Ala Lys Ala Ile Thr Asp Thr Ser Leu Tyr Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly		
		100	105 110

Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 29
<211> 107
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> варіабельний домен легкого ланцюга VL, aLAG3(0403)

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

35 <210> 30
<211> 5
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

40 <220>
<223> HVR-H1 важкого ланцюга, aLAG3(0411)

<400> 30

45 Asp Tyr Thr Met Asn
1 5

50 <210> 31
<211> 17
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

55 <220>
<223> HVR-H2 важкого ланцюга, aLAG3(0411)

<400> 31

Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5	<210>	32
	<211>	12
	<212>	Білок
	<213>	Штучна послідовність
10	<220>	
	<223>	HVR-H3 важкого ланцюга, aLAG3(0411)
	<400>	32
15	Gly Leu Thr Asp Asp Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr	
	1	5 10
	<210>	33
	<211>	11
20	<212>	Білок
	<213>	Штучна послідовність
	<220>	
	<223>	HVR-L1 легкого ланцюга, aLAG3(0411)
25	<400>	33
	Arg Ala Ser Gln Ser Ile Val Ser Tyr Leu Asn	
	1	5 10
30	<210>	34
	<211>	7
	<212>	Білок
	<213>	Штучна послідовність
35	<220>	
	<223>	HVR-L2 легкого ланцюга, aLAG3(0411)
	<400>	34
40	Ala Ser Ser Ser Leu Gln Ser	
	1	5
	<210>	35
45	<211>	9
	<212>	Білок
	<213>	Штучна послідовність
	<220>	
50	<223>	HVR-L3 легкого ланцюга, aLAG3(0411)
	<400>	35
55	Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr	
	1	5
	<210>	36
	<211>	121
	<212>	Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, aLAG3(0411)

5

<400> 36

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

10

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

15

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

Ser Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

20

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

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

25

Ala Lys Gly Leu Thr Asp Asp Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

30

<210> 37

<211> 107

<212> Білок

35

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> варіабельний домен легкого ланцюга VL, aLAG3(0411)

40

<400> 37

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

45

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

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

50

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

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

55

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

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

5 <210> 38
<211> 5
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

10 <220>
<223> HVR-H1 важкого ланцюга, aLAG3(0417)

<400> 38

15 Asp Tyr Ala Met Ser
1 5

20 <210> 39
<211> 17
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> HVR-H2 важкого ланцюга, aLAG3(0417)

25 <400> 39

Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

30 Gly

35 <210> 40
<211> 13
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

40 <220>
<223> HVR-H3 важкого ланцюга, aLAG3(0417)

<400> 40

45 Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

50 <210> 41
<211> 11
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> HVR-L1 легкого ланцюга, aLAG3(0417)

55 <400> 41

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 42

<211> 7
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

5

<220>
 <223> HVR-L2 легкого ланцюга, aLAG3(0417)

<400> 42

10

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 43
 <211> 9
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

15

<220>
 <223> HVR-L3 легкого ланцюга, aLAG3(0417)

20

<400> 43

Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

25

<210> 44
 <211> 122
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

30

<220>
 <223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, aLAG3(0417)

<400> 44

35

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

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

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

45

Ser Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

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

50

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

Thr Lys Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110

55

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 45
 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> варіабельний домен легкого ланцюга VL, aLAG3(0417)
 <400> 45
 10
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 15 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 20 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 25 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 30
 <210> 46
 <211> 5
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 35
 <220>
 <223> HVR-H1 важкого ланцюга, aLAG3(0416)
 <400> 46
 Asp Tyr Ala Met Ser
 1 5
 45
 <210> 47
 <211> 17
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 50
 <220>
 <223> HVR-H2 важкого ланцюга, aLAG3(0416)
 <400> 47
 55 Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

5 <210> 48
 <211> 13
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> HVR-H3 важкого ланцюга, aLAG3(0416)

 10 <400> 48

 Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

 15 <210> 49
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 20 <220>
 <223> HVR-L1 легкого ланцюга, aLAG3(0416)

 <400> 49

 25 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10

 30 <210> 50
 <211> 7
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> HVR-L2 легкого ланцюга, aLAG3(0416)
 35 <400> 50

 Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5
 40 <210> 51
 <211> 9
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> HVR-L3 легкого ланцюга, aLAG3(0416)

 <400> 51
 50 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
 1 5

 55 <210> 52
 <211> 122
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>

<223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, aLAG3(0416)

<400> 52

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

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

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

15 Ser Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Thr Lys Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

25 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53

30 <211> 107

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

35 <223> варіабельний домен легкого ланцюга VL, aLAG3(0416)

<400> 53

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 54
 <211> 120
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

5

<220>
 <223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, BMS-986016

<400> 54

10

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
 15 20 25 30

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

20

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Ser 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

25

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

30

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

35

<210> 55
 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

40

<220>
 <223> варіабельний домен легкого ланцюга VL BMS-986016

<400> 55

45

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

50

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

55

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

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

<210> 56
<211> 5
<212> Білок
10 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> HVR-H1 важкого ланцюга, MDX25F7 (25F7)

15 <400> 56

Asp Tyr Tyr Trp Asn
1 5

20 <210> 57
<211> 16
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

25 <220>
<223> HVR-H2 важкого ланцюга, MDX25F7 (25F7)

<400> 57

30 Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 58
<211> 10
35 <212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> HVR-H3 важкого ланцюга, MDX25F7 (25F7)

40 <400> 58

Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe
1 5 10

45 <210> 59
<211> 11
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

50 <220>
<223> HVR-L1 легкого ланцюга, MDX25F7 (25F7)

<400> 59

55 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 60

<211> 7
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

5

<220>
 <223> HVR-L2 легкого ланцюга, MDX25F7 (25F7)

<400> 60

10

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 61
 <211> 9
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

15

<220>
 <223> HVR-L3 легкого ланцюга, MDX25F7 (25F7)

20

<400> 61

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5

25

<210> 62
 <211> 120
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

30

<220>
 <223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, MDX25F7 (25F7)

<400> 62

35

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

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

50

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

55

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 63
 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 5
 <220>
 <223> варіабельний домен легкого ланцюга VL, MDX25F7 (25F7)
 <400> 63
 10
 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
 15 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
 25
 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
 30
 <210> 64
 <211> 125
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 35
 <220>
 <223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, гуманізоване BAP050 (LAG525)
 <400> 64
 40
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 50
 Gly Trp Ile Asn Thr Asp Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Ser
 65 70 75 80
 55
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Asn Pro Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Asn Asn Ala Glu Ala Met
100 105 110

5 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 65
<211> 107
<212> Білок
10 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> варіабельний домен легкого ланцюга VL, гуманізоване BAP050 (LAG525)

15 <400> 65

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

20 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ser Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Met Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Val Leu Ile
35 40 45

25 Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

30 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Leu
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Leu Pro Trp
85 90 95

35 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 66
<211> 122
40 <212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, MDX26H10 (26H10)

45 <400> 66

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

50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Trp Ala Val Ala Ser Trp Asp Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110
 10 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 67
 <211> 108
 15 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> варіабельний домен легкого ланцюга VL, MDX26H10 (26H10)
 20 <400> 67
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 25 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 30 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 35 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 40 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105
 <210> 68
 45 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 50 <223> константна область легкого каппа-ланцюга людини
 <400> 68
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 55 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 5 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 10 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105
 15
 <210> 69
 <211> 105
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 20
 <220>
 <223> константна область легкого лямбда-ланцюга людини
 <400> 69
 25
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30
 30 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45
 35 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80
 40 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 85 90 95
 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105
 45
 <210> 70
 <211> 329
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 50
 <220>
 <223> константна область важкого ланцюга людини, що отримана з IgG1
 55
 <400> 70
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
				20					25					30			
5	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
			35					40					45				
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
			50				55						60				
10	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
	65					70					75					80	
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
				85						90					95		
15	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
				100					105					110			
	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
20				115				120					125				
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
				130			135					140					
25	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
	145					150					155					160	
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
					165					170					175		
30	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
				180					185					190			
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
35			195					200					205				
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
			210				215					220					
40	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	
	225					230					235					240	
	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
					245					250					255		
45	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
				260					265					270			
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
50			275					280					285				
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
			290				295					300					
55	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
	305					310					315					320	
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly								
						325											

<210> 71
 <211> 329
 <212> Білок
 5 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> константна область важкого ланцюга людини, що отримана з IgG1 з мутаціями L234A, L235A і P329G
 10
 <400> 71

 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	
	260 265 270	
5	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
	275 280 285	
	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
	290 295 300	
10	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	
	305 310 315 320	
	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
15	325	
	<210> 72	
	<211> 326	
	<212> Білок	
20	<213> Штучна послідовність	
	<220>	
	<223> константна область важкого ланцюга людини, що отримана з IgG4	
25	<400> 72	
	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg	
	1 5 10 15	
30	Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	
	20 25 30	
	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
	35 40 45	
35	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
	50 55 60	
	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr	
40	65 70 75 80	
	Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	
	85 90 95	
45	Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro	
	100 105 110	
	Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
	115 120 125	
50	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
	130 135 140	
	Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
55	145 150 155 160	
	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe	
	165 170 175	

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 5 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 10 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 15 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 20 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 25 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 325
 30 <210> 73
 <211> 497
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 73
 Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys
 1 5 10 15
 40 Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly
 20 25 30
 Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro
 35 40 45
 Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp
 50 55 60
 50 Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly
 65 70 75 80
 Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu
 85 90 95
 55 Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg
 100 105 110
 Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg

	115		120		125												
	Ala	Leu	Ser	Cys	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Gly	Gln	Ala	Ser	Met	Thr	
	130						135					140					
5	Ala	Ser	Pro	Pro	Gly	Ser	Leu	Arg	Ala	Ser	Asp	Trp	Val	Ile	Leu	Asn	
	145					150					155					160	
	Cys	Ser	Phe	Ser	Arg	Pro	Asp	Arg	Pro	Ala	Ser	Val	His	Trp	Phe	Arg	
10					165					170					175		
	Asn	Arg	Gly	Gln	Gly	Arg	Val	Pro	Val	Arg	Glu	Ser	Pro	His	His	His	
				180					185					190			
15	Leu	Ala	Glu	Ser	Phe	Leu	Phe	Leu	Pro	Gln	Val	Ser	Pro	Met	Asp	Ser	
			195					200					205				
	Gly	Pro	Trp	Gly	Cys	Ile	Leu	Thr	Tyr	Arg	Asp	Gly	Phe	Asn	Val	Ser	
20							215					220					
	Ile	Met	Tyr	Asn	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Pro	Thr	Pro	Leu	
	225					230					235					240	
	Thr	Val	Tyr	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser	Arg	Val	Gly	Leu	Pro	Cys	Arg	Leu	
25					245					250					255		
	Pro	Ala	Gly	Val	Gly	Thr	Arg	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Lys	Trp	Thr	Pro	
				260					265					270			
30	Pro	Gly	Gly	Gly	Pro	Asp	Leu	Leu	Val	Thr	Gly	Asp	Asn	Gly	Asp	Phe	
			275					280					285				
	Thr	Leu	Arg	Leu	Glu	Asp	Val	Ser	Gln	Ala	Gln	Ala	Gly	Thr	Tyr	Thr	
35							295					300					
	Cys	His	Ile	His	Leu	Gln	Glu	Gln	Gln	Leu	Asn	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	
	305					310					315					320	
	Ala	Ile	Ile	Thr	Val	Thr	Pro	Lys	Ser	Phe	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Leu	
40					325					330					335		
	Gly	Lys	Leu	Leu	Cys	Glu	Val	Thr	Pro	Val	Ser	Gly	Gln	Glu	Arg	Phe	
				340					345					350			
45	Val	Trp	Ser	Ser	Leu	Asp	Thr	Pro	Ser	Gln	Arg	Ser	Phe	Ser	Gly	Pro	
			355					360					365				
	Trp	Leu	Glu	Ala	Gln	Glu	Ala	Gln	Leu	Leu	Ser	Gln	Pro	Trp	Gln	Cys	
50			370				375					380					
	Gln	Leu	Tyr	Gln	Gly	Glu	Arg	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Val	Tyr	Phe	Thr	
	385					390					395					400	
	Glu	Leu	Ser	Ser	Pro	Gly	Ala	Gln	Arg	Ser	Gly	Arg	Ala	Pro	Gly	Ala	
55					405					410					415		
	Leu	Pro	Ala	Gly	His	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Ile	Leu	Gly	Val	Leu	Ser	
				420					425					430			

Leu Leu Leu Leu Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg
 435 440 445
 5 Gln Trp Arg Pro Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro
 450 455 460
 Pro Gln Ala Gln Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro
 465 470 475 480
 10 Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln
 485 490 495
 Leu
 15 <210> 74
 <211> 422
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 74
 Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys
 1 5 10 15
 25 Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly
 20 25 30
 Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro
 35 40 45
 Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp
 50 55 60
 35 Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly
 65 70 75 80
 Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu
 85 90 95
 40 Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg
 100 105 110
 Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg
 115 120 125
 45 Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr
 130 135 140
 50 Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn
 145 150 155 160
 Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg
 165 170 175
 55 Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His
 180 185 190
 Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser

	195	200	205
	Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser		
	210	215	220
5	Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu Glu Pro Pro Thr Pro Leu		
	225	230	235
	Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val Gly Leu Pro Cys Arg Leu		
10		245	250
	Pro Ala Gly Val Gly Thr Arg Ser Phe Leu Thr Ala Lys Trp Thr Pro		
		260	265
	Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Leu Val Thr Gly Asp Asn Gly Asp Phe		
15		275	280
	Thr Leu Arg Leu Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr		
		290	295
20	Cys His Ile His Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu		
	305	310	315
	Ala Ile Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu		
25		325	330
	Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe		
		340	345
	Val Trp Ser Ser Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro		
30		355	360
	Trp Leu Glu Ala Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys		
		370	375
35	Gln Leu Tyr Gln Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr		
	385	390	395
	Glu Leu Ser Ser Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala		
40		405	410
	Leu Pro Ala Gly His Leu		
		420	
45	<210> 75		
	<211> 6		
	<212> Білок		
	<213> Homo sapiens		
50	<400> 75		
	Lys Ile Glu Glu Leu Glu		
	1	5	
55	<210> 76		
	<211> 37		
	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		

	<220>		
	<223> праймер rbHC.up		
5	<400> 76 aagcttgcca ccatggagac tgggctgcgc tggcttc	37	
	<210> 77		
	<211> 21		
	<212> ДНК		
10	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> праймер rbHCf.do		
15	<400> 77 ccattgggtga ggggtgcccga g	21	
	<210> 78		
	<211> 20		
20	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> праймер BcPCR_FHLC_leader.fw		
25	<400> 78 atggacatga ggggtccccgc	20	
	<210> 79		
30	<211> 24		
	<212> ДНК		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
35	<223> праймер BcPCR_huCkappa.rev		
	<400> 79 gatttcaact gctcatcaga tggc	24	
40	<210> 80		
	<211> 8		
	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
45	<220>		
	<223> HVR-H1 важкого ланцюга, PD1-0098		
	<400> 80		
50	Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr 1 5		
	<210> 81		
	<211> 3		
55	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> HVR-H2 важкого ланцюга, PD1-0098		

<400> 81
 Tyr Ser Gly
 5 1
 <210> 82
 <211> 9
 <212> Білок
 10 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> HVR-H3 важкого ланцюга, PD1-0098
 15 <400> 82
 His Gly Ser Ala Pro Trp Tyr Phe Asp
 1 5
 20 <210> 83
 <211> 12
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> HVR-L1 легкого ланцюга, PD1-0098
 <400> 83
 30 Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10
 <210> 84
 <211> 3
 35 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> HVR-L2 легкого ланцюга, PD1-0098
 40 <400> 84
 Lys Val Ser
 45 1
 <210> 85
 <211> 6
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 50 <220>
 <223> HVR-L3 легкого ланцюга, PD1-0098
 <400> 85
 55 Gly Ser His Phe Pro Leu
 1 5
 <210> 86

<211> 120
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, PD1-0098

<400> 86

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

<210> 87
 <211> 112
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> варіабельний домен легкого ланцюга VL, PD1-0098

<400> 87

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

	85	90	95
	Ser His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
	100	105	110
5	<210> 88 <211> 7 <212> Білок <213> Штучна послідовність		
10	<220> <223> HVR-H1 важкого ланцюга, PD1-0069		
15	<400> 88 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr 1 5		
20	<210> 89 <211> 3 <212> Білок <213> Штучна послідовність		
25	<220> <223> HVR-H2 важкого ланцюга, PD1-0069		
30	<400> 89 Tyr Ser Gly 1		
35	<210> 90 <211> 7 <212> Білок <213> Штучна послідовність		
40	<220> <223> HVR-H3 важкого ланцюга, PD1-0069		
45	<400> 90 Gly Ile Thr Thr Gly Phe Ala 1 5		
50	<210> 91 <211> 11 <212> Білок <213> Штучна послідовність		
55	<220> <223> HVR-L1 легкого ланцюга, PD1-0069		
	<400> 91 Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Phe 1 5 10		
	<210> 92 <211> 3		

<212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 5 <223> HVR-L2 легкого ланцюга, PD1-0069

 <400> 92

 Tyr Ala Ser
 10 1

 <210> 93
 <211> 6
 <212> Білок
 15 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> HVR-L3 легкого ланцюга, PD1-0069

 20 <400> 93

 Ser Arg Glu Phe Pro Trp
 1 5

 25 <210> 94
 <211> 118
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 30 <220>
 <223> варіабельний домен важкого ланцюга VH, PD1-0069

 <400> 94

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

 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 40 Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Val Ile Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 45 50 55 60

 Lys Asp Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 50 Leu Glu Leu Ala Arg Met Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Ala Arg Leu Gly Ile Thr Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 55 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

 <210> 95

<211> 111
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

5 <220>
 <223> варіабельний домен легкого ланцюга VL, PD1-0069

<400> 95

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

30 <210> 96
 <211> 443
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

35 <220>
 <223> важкий ланцюг 1 з 1+1 PD1/LAG3 0799

<400> 96

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

	100	105	110
5	Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro 115	Ser Val Phe Pro Leu 120	Ala Pro Ser Ser 125
	Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr 130	Ala Ala Leu Gly Cys 135	Leu Val Lys Asp 140
10	Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr 145	Val Ser Trp Asn Ser 150	Gly Ala Leu Thr 155
	Ser Gly Val His Thr Phe Pro 165	Ala Val Leu Gln Ser 170	Ser Gly Leu Tyr 175
15	Ser Leu Ser Ser Val Val Thr 180	Val Pro Ser Ser Ser 185	Leu Gly Thr Gln 190
	Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195	His Lys Pro Ser Asn 200	Thr Lys Val Asp 205
20	Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser 210	Cys Asp Lys Thr His 215	Thr Cys Pro Pro 220
	Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala 225	Gly Gly Pro Ser Val 230	Phe Leu Phe Pro 235
25	Pro Lys Pro Lys Asp Thr 245	Leu Met Ile Ser Arg 250	Thr Pro Glu Val Thr 255
30	Cys Val Val Val Asp Val Ser 260	His Glu Asp Pro Glu 265	Val Lys Phe Asn 270
	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 275	Val His Asn Ala Lys 280	Thr Lys Pro Arg 285
35	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 290	Tyr Arg Val Val Ser 295	Val Leu Thr Val 300
	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 305	Gly Lys Glu Tyr Lys 310	Cys Lys Val Ser 315
40	Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro 325	Ile Glu Lys Thr Ile 330	Ser Lys Ala Lys 335
45	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 340	Val Tyr Thr Leu Pro 345	Pro Cys Arg Asp 350
	Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val 355	Ser Leu Trp Cys Leu 360	Val Lys Gly Phe 365
50	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 370	Glu Trp Glu Ser Asn 375	Gly Gln Pro Glu 380
	Asn Asn Tyr Lys Thr Thr 385	Pro Pro Val Leu Asp 390	Ser Asp Gly Ser Phe 395
55	Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 405	Val Asp Lys Ser Arg 410	Trp Gln Gln Gly 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
5 435 440

<210> 97
<211> 452
<212> Білок
10 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> важкий ланцюг 2 з 1+1 PD1/LAG3 0799

15 <400> 97

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

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

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

25 Ser Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Val Lys Asn Thr Leu Tyr
30 65 70 75 80

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

35 Thr Lys Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

40 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
45 145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

50 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

55 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

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

	225		230		235		240
	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu						
			245		250		255
5	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser						
			260		265		270
10	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu						
			275		280		285
	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr						
			290		295		300
15	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn						
			305		310		315
	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro						
			325		330		335
20	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln						
			340		345		350
	Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val						
25			355		360		365
	Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val						
			370		375		380
30	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro						
			385		390		395
	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr						
			405		410		415
35	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val						
			420		425		430
40	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu						
			435		440		445
	Ser Pro Gly Lys						
			450				
45	<210> 98						
	<211> 227						
	<212> Білок						
	<213> Штучна послідовність						
50	<220>						
	<223> легкий ланцюг 1 з 1+1 PD1/LAG3 0799						
	<400> 98						
55	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly						
	1 5 10 15						
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr						
			20		25		30

	Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
	35 40 45	
5	Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val	
	50 55 60	
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
	65 70 75 80	
10	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
	Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln	
	100 105 110	
15	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val	
	115 120 125	
20	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser	
	130 135 140	
	Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln	
	145 150 155 160	
25	Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val	
	165 170 175	
	Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu	
	180 185 190	
30	Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu	
	195 200 205	
35	Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg	
	210 215 220	
	Gly Glu Cys	
	225	
40	<210> 99	
	<211> 214	
	<212> Білок	
	<213> Штучна послідовність	
45	<220>	
	<223> легкий ланцюг 2 з 1+1 PD1/LAG3 0799	
	<400> 99	
50	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
	1 5 10 15	
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr	
	20 25 30	
55	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
	35 40 45	

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 5 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 10 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 15 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 25 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 30 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 35 <210> 100
 <211> 451
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 40 <220>
 <223> важкий ланцюг 2 з 1+1 PD1/LAG3 0927
 <400> 100
 45 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 50 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 55 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Phe Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

				85				90					95				
	Ala	Lys	Gly	Leu	Thr	Asp	Thr	Thr	Leu	Tyr	Gly	Ser	Asp	Tyr	Trp	Gly	
				100					105					110			
5																	
	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
				115				120					125				
10	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	
				130				135					140				
	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
	145						150				155					160	
15	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
					165					170					175		
	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
				180					185					190			
20																	
	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
				195				200					205				
	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
25							215					220					
	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	
	225					230					235					240	
30	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
					245					250					255		
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
				260					265					270			
35																	
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
			275					280					285				
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
40			290				295					300					
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
	305					310					315				320		
45	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	
					325					330					335		
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
				340					345					350			
50																	
	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
			355					360					365				
	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
55							375					380					
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
	385					390					395					400	

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

5 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

10 Pro Gly Lys
450

<210> 101
<211> 214
15 <212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> легкий ланцюг 2 з 1+1 PD1/LAG3 0927
20 <400> 101

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

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

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

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

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

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

40 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly
115 120 125

45 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

55 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

	195	200	205
	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		
5	<210> 102		
	<211> 443		
	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
10	<220>		
	<223> важкий ланцюг 1 з 1+1 PD1/LAG3 0222		
	<400> 102		
15	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
	1 5 10 15		
20	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser		
	20 25 30		
	Ser Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Gln Pro Pro		
	35 40 45		
25	Lys Leu Leu Ile Lys Tyr 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 Asn Ile His		
	65 70 75 80		
30	Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Arg		
	85 90 95		
	Glu Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser		
	100 105 110		
35	Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser		
	115 120 125		
40	Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp		
	130 135 140		
	Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr		
	145 150 155 160		
45	Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr		
	165 170 175		
	Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln		
	180 185 190		
50	Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp		
	195 200 205		
55	Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro		
	210 215 220		
	Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro		
	225 230 235 240		

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

5 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

10 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

15 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

20 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp
340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

25 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

30 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

35 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

40 <210> 103
<211> 450
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

45 <220>
<223> важкий ланцюг 2 з 1+1 PD1/LAG3 0222

<400> 103

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

55 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					
5	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		
10	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	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
			115						120				125				
15	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
		130					135					140					
20	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
				165						170					175		
25	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
			180						185					190			
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
		195						200					205				
30	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
		210					215					220					
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	
35	225					230					235					240	
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				245						250					255		
40	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265						270		
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
		275						280					285				
45	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
		290					295					300					
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
50	305					310					315					320	
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	
				325						330					335		
55	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	
				340					345					350			
	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
			355					360					365				

	Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp	
	370	375 380
5	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val	
	385	390 395 400
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp	
		405 410 415
10	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His	
		420 425 430
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	
15		435 440 445
	Gly Lys	
	450	
20	<210> 104	
	<211> 225	
	<212> Білок	
	<213> Штучна послідовність	
25	<220>	
	<223> легкий ланцюг 1 з 1+1 PD1/LAG3 0222	
	<400> 104	
30	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Val	
	1	5 10 15
	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
		20 25 30
35	Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Arg Thr Leu Glu Trp Ile	
		35 40 45
	Gly Val Ile Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe	
40		50 55 60
	Lys Asp Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
		65 70 75 80
45	Leu Glu Leu Ala Arg Met Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys	
		85 90 95
	Ala Arg Leu Gly Ile Thr Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
		100 105 110
50	Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile	
		115 120 125
	Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val	
55		130 135 140
	Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys	
		145 150 155 160

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
165 170 175

5 Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
180 185 190

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
195 200 205

10 His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
210 215 220

Cys
225

15 <210> 105
<211> 214
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

20 <220>
<223> легкий ланцюг 2 з 1+1 PD1/LAG3 0222

<400> 105

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

30 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

35 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

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

45 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys Leu Lys Ser Gly
115 120 125

50 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

55 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

	180	185	190
	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
	195	200	205
5	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		
	<210> 106		
10	<211> 444		
	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
15	<223> важкий ланцюг 1 з 1+1 PD1/LAG3 0224		
	<400> 106		
	Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly		
20	1 5 10 15		
	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser		
	20 25 30		
25	Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
	35 40 45		
	Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Arg Arg Phe Ser Gly Val Pro		
	50 55 60		
30	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
	65 70 75 80		
	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly		
35	85 90 95		
	Ser His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
	100 105 110		
40	Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser		
	115 120 125		
	Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys		
	130 135 140		
45	Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu		
	145 150 155 160		
	Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu		
50	165 170 175		
	Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr		
	180 185 190		
55	Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val		
	195 200 205		
	Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro		
	210 215 220		

	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe	225	230	235	240
5	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	245	250	255	
	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe	260	265	270	
10	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	275	280	285	
	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	290	295	300	
15	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	305	310	315	320
20	Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	325	330	335	
	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg	340	345	350	
25	Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly	355	360	365	
	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	370	375	380	
30	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	385	390	395	400
	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln	405	410	415	
35	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	420	425	430	
40	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	435	440		
	<210> 107				
45	<211> 227				
	<212> Білок				
	<213> Штучна послідовність				
	<220>				
50	<223> легкий ланцюг 1 з 1+1 PD1/LAG3 0224				
	<400> 107				
55	Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln	1	5	10	15
	Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp	20	25	30	

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asp Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 5 Leu Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Phe Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 10 Leu Gln Leu Asn Ser Val Ala Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp His Gly Ser Ala Pro Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg
 100 105 110
 15 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 130 135 140
 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 145 150 155 160
 25 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 165 170 175
 Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 180 185 190
 30 Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 195 200 205
 Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 210 215 220
 35 Gly Glu Cys
 225
 40 <210> 108
 <211> 443
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> важкий ланцюг aLAG3(0156) (MDX25F7)
 <400> 108
 50 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
 55 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
5	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
10				100					105					110		
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Lys	Ala	Pro	Ser	Val
			115					120					125			
15	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Cys	Gly	Asp	Thr	Pro	Ser	Ser	Thr	Val	Thr
		130					135					140				
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Leu	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Thr
20	145					150					155					160
	Trp	Asn	Ser	Gly	Thr	Leu	Thr	Asn	Gly	Val	Arg	Thr	Phe	Pro	Ser	Val
				165					170						175	
	Arg	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Ser	Val	Thr
25				180					185					190		
	Ser	Ser	Ser	Gln	Pro	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala	Thr	Asn
			195					200					205			
30	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Ser	Thr	Cys	Ser	Lys	Pro	Thr
		210					215					220				
	Cys	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro
35	225					230					235					240
	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
				245						250					255	
	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Thr
40				260					265					270		
	Trp	Tyr	Ile	Asn	Asn	Glu	Gln	Val	Arg	Thr	Ala	Arg	Pro	Pro	Leu	Arg
			275					280					285			
45	Glu	Gln	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Ile	Arg	Val	Val	Ser	Thr	Leu	Pro	Ile
		290					295					300				
	Ala	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Arg	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	His
50	305					310					315					320
	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Arg
				325						330					335	
	Gly	Gln	Pro	Leu	Glu	Pro	Lys	Val	Tyr	Thr	Met	Gly	Pro	Pro	Arg	Glu
55				340					345					350		
	Glu	Leu	Ser	Ser	Arg	Ser	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Asn	Gly	Phe
			355					360					365			

Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu
 370 375 380
 5 Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr
 385 390 395 400
 Phe Leu Tyr Asn Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly
 405 410 415
 10 Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 435 440
 15 <210> 109
 <211> 214
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 20 <220>
 <223> легкий ланцюг aLAG3(0156) (MDX25F7)
 <400> 109
 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
 30 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 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
 40 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 Arg Thr Val Ala Ala
 45 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 50 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 55 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

	180	185	190
	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
	195	200	205
5	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		
	<210> 110		
10	<211> 444		
	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
15	<223> важкий ланцюг aLAG3(0414)		
	<400> 110		
20	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr		
	20 25 30		
25	Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35 40 45		
	Ala Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val		
	50 55 60		
30	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Phe Lys Asn Thr Leu Tyr		
	65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
35	85 90 95		
	Ala Lys Gly Leu Thr Asp Thr Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr Trp Gly		
	100 105 110		
40	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser		
	115 120 125		
	Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val		
	130 135 140		
45	Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val		
	145 150 155 160		
	Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser		
50	165 170 175		
	Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val		
	180 185 190		
55	Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr		
	195 200 205		
	Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro		
	210 215 220		

	Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe	225	230	235	240
5	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	245	250	255	
	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe	260	265	270	
10	Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu	275	280	285	
	Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro	290	295	300	
15	Ile Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val	305	310	315	320
20	His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	325	330	335	
	Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg	340	345	350	
25	Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly	355	360	365	
	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala	370	375	380	
30	Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	385	390	395	400
	Tyr Phe Leu Tyr Asn Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg	405	410	415	
	Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	420	425	430	
40	Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys	435	440		
	<210> 111				
45	<211> 214				
	<212> Білок				
	<213> Штучна послідовність				
	<220>				
50	<223> легкий ланцюг aLAG3(0414)				
	<400> 111				
55	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	1	5	10	15
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr	20	25	30	

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 5 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 10 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Ser Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 15 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 20 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 25 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 30 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 35
 <210> 112
 <211> 445
 <212> Білок
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> важкий ланцюг aLAG3(0416)
 45 <400> 112
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 50 Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 55 Ser Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Val Lys Asn Thr Leu Tyr

	65		70		75		80									
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Leu	Cys
				85						90					95	
5	Thr	Lys	Thr	His	Ser	Gly	Leu	Ile	Val	Asn	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp
				100					105					110		
10	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Lys	Ala	Pro
			115					120					125			
	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Cys	Gly	Asp	Thr	Pro	Ser	Ser	Thr
			130				135					140				
15	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Leu	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
	145					150					155					160
	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Thr	Leu	Thr	Asn	Gly	Val	Arg	Thr	Phe	Pro
				165						170					175	
20	Ser	Val	Arg	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Ser
				180					185					190		
	Val	Thr	Ser	Ser	Ser	Gln	Pro	Val	Thr	Cys	Asn	Val	Ala	His	Pro	Ala
25			195				200						205			
	Thr	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Ser	Thr	Cys	Ser	Lys
			210				215					220				
30	Pro	Thr	Cys	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile
	225					230					235					240
	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
				245						250					255	
35	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
				260					265					270		
	Phe	Thr	Trp	Tyr	Ile	Asn	Asn	Glu	Gln	Val	Arg	Thr	Ala	Arg	Pro	Pro
40			275					280					285			
	Leu	Arg	Glu	Gln	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Ile	Arg	Val	Val	Ser	Thr	Leu
		290					295					300				
45	Pro	Ile	Ala	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Arg	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys
	305					310					315					320
	Val	His	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
				325						330					335	
50	Ala	Arg	Gly	Gln	Pro	Leu	Glu	Pro	Lys	Val	Tyr	Thr	Met	Gly	Pro	Pro
				340					345					350		
	Arg	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Arg	Ser	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Asn
55			355				360						365			
	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Glu	Lys	Asn	Gly	Lys
		370					375					380				

Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

5 Ser Tyr Phe Leu Tyr Asn Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln
405 410 415

Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

10 His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 113
<211> 214
15 <212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> легкий ланцюг aLAG3(0416)
20 <400> 113

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

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

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

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

35 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Ala Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

40 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

45 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

55 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

	195	200	205
	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210		
5	<210> 114		
	<211> 695		
	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
10	<220>		
	<223> важкий ланцюг з 2+2 PD1/LAG3 8970		
	<400> 114		
15	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1 5 10 15		
20	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr		
	20 25 30		
	Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35 40 45		
25	Ala Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val		
	50 55 60		
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Phe Lys Asn Thr Leu Tyr		
	65 70 75 80		
30	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85 90 95		
	Ala Lys Gly Leu Thr Asp Thr Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr Trp Gly		
35	100 105 110		
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
	115 120 125		
40	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
	130 135 140		
	Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
	145 150 155 160		
45	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
	165 170 175		
	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
50	180 185 190		
	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
	195 200 205		
55	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
	210 215 220		
	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly		
	225 230 235 240		

	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
					245					250					255		
5	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
				260					265					270			
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
			275					280					285				
10	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
		290					295					300					
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
15	305					310					315					320	
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	
				325						330					335		
20	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
				340					345					350			
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
			355					360					365				
25	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
		370					375					380					
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
30	385					390					395					400	
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
					405					410					415		
35	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
				420					425					430			
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
			435					440					445				
40	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
		450					455					460					
	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	
45	465					470					475					480	
	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	
					485					490					495		
50	Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	
				500					505					510			
	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Arg	Asp	Ile	Tyr	Tyr	
			515					520					525				
55	Pro	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	
		530					535					540					
	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	

	545		550		555		560
	Val Tyr Tyr Cys	Val Leu Leu Thr Gly	Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp				
		565	570			575	
5	Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala						
		580	585			590	
10	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser						
		595	600			605	
	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu						
		610	615			620	
15	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser						
		625	630			635	640
	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu						
		645	650			655	
20	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val						
		660	665			670	
	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys						
25		675	680			685	
	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys						
		690	695				
30	<210> 115						
	<211> 216						
	<212> Білок						
	<213> Штучна послідовність						
35	<220>						
	<223> легкий ланцюг 1 з 2+2 PD1/LAG3 8970						
	<400> 115						
40	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly						
	1	5	10			15	
	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser						
		20	25			30	
45	Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro						
		35	40			45	
	Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp						
50		50	55			60	
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser						
		65	70			75	80
55	Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr						
		85	90			95	
	Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser						
		100	105			110	

	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
			115					120					125			
5	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
		130					135					140				
	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
	145					150					155					160
10	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
					165					170					175	
	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
15				180					185					190		
	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
		195						200					205			
20	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys								
		210					215									
	<210>	116														
	<211>	696														
25	<212>	Білок														
	<213>	Штучна послідовність														
	<220>															
	<223>	важкий ланцюг з 2+2 PD1/LAG3 8984														
30	<400>	116														
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
35	Ser	Leu	Arg	Leu	Ala	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
				20					25					30		
	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
40			35					40					45			
	Ser	Gly	Ile	Asp	Asn	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val
		50					55					60				
45	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Val	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70					75				80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Leu	Cys
					85					90					95	
50	Thr	Lys	Thr	His	Ser	Gly	Leu	Ile	Val	Asn	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp
				100					105					110		
	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
55			115					120					125			
	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
		130					135						140			

	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
	145					150					155					160	
5	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
					165					170					175		
	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	
				180					185					190			
10	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	
			195					200					205				
	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	
15		210					215					220					
	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	
	225					230					235					240	
20	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
					245					250					255		
	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
				260					265					270			
25	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
			275					280					285				
	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
30		290					295					300					
	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
	305					310					315					320	
	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	
35					325					330					335		
	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
				340					345					350			
40	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
			355					360					365				
	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
45		370					375					380					
	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
	385					390					395					400	
	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	
50					405					410					415		
	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	
				420					425					430			
55	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	
			435				440						445				
	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
		450					455					460					

	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	
	465					470					475					480	
5	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	
					485					490					495		
	Ser	Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	
				500					505					510			
10	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Arg	Asp	Ile	Tyr	
			515					520					525				
	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	
15			530				535						540				
	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	
	545					550					555					560	
20	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg	Val	Tyr	Phe	Ala	Leu	
					565					570					575		
	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	
				580					585					590			
25	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	
			595					600					605				
	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	
30			610				615					620					
	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	
	625					630					635					640	
35	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	
					645					650					655		
	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	
				660					665					670			
40	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	
			675					680					685				
	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys									
45			690				695										
	<210>	117															
	<211>	694															
	<212>	Білок															
50	<213>	Штучна послідовність															
	<220>																
	<223>	важкий ланцюг з 2+2 PD1/LAG3 9010															
55	<400>	117															
	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			
5	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					
10	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		
15	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	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
20				115				120					125				
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
		130					135					140					
25	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
					165					170					175		
30	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
35			195					200					205				
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
		210					215					220					
40	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	
	225					230					235					240	
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
					245					250					255		
45	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270			
	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
50			275					280					285				
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
		290					295					300					
55	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305					310					315					320	
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	
					325					330					335		

	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	
	340 345 350	
5	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu	
	355 360 365	
	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp	
	370 375 380	
10	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val	
	385 390 395 400	
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp	
15	405 410 415	
	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His	
	420 425 430	
20	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	
	435 440 445	
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
	450 455 460	
25	Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
	465 470 475 480	
	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe	
30	485 490 495	
	Ser Ser Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	
	500 505 510	
35	Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro	
	515 520 525	
	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn	
	530 535 540	
40	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val	
	545 550 555 560	
	Tyr Tyr Cys Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser	
45	565 570 575	
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala	
	580 585 590	
50	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	
	595 600 605	
	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	
	610 615 620	
55	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
	625 630 635 640	
	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	

	645	650	655
	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
	660	665	670
5	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
	675	680	685
10	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	690		
	<210> 118		
	<211> 695		
	<212> Білок		
15	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> важкий ланцюг 1 з 2+1 PD1/LAG3 8310		
20	<400> 118		
	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1 5 10 15		
25	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr		
	20 25 30		
	Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35 40 45		
30	Ala Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val		
	50 55 60		
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Phe Lys Asn Thr Leu Tyr		
35	65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85 90 95		
40	Ala Lys Gly Leu Thr Asp Thr Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr Trp Gly		
	100 105 110		
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
	115 120 125		
45	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
	130 135 140		
	Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
50	145 150 155 160		
	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
	165 170 175		
55	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
	180 185 190		
	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
	195 200 205		

	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
	210						215					220					
5	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	
	225					230					235					240	
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
					245					250					255		
10	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
				260					265					270			
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
15			275					280					285				
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
	290						295					300					
20	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
	305					310					315					320	
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	
					325					330					335		
25	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
				340					345					350			
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
30			355					360					365				
	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
	370						375					380					
35	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
	385					390					395					400	
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
					405					410					415		
40	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
				420					425					430			
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
45			435					440					445				
	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
	450						455					460					
50	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	
	465					470					475					480	
	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	
					485					490					495		
55	Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	
				500					505					510			
	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Arg	Asp	Ile	Tyr	Tyr	

UA 128451 C2

	515	520	525	
5	Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys 530 535 540			
	Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala 545 550 555 560			
10	Val Tyr Tyr Cys Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp 565 570 575			
	Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala 580 585 590			
15	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser 595 600 605			
	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu 610 615 620			
20	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser 625 630 635 640			
	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu 645 650 655			
25	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val 660 665 670			
30	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys 675 680 685			
	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 690 695			
35	<210> 119			
	<211> 451			
	<212> Білок			
40	<213> Штучна послідовність			
	<220>			
	<223> важкий ланцюг 2 з 2+1 PD1/LAG3 8310			
	<400> 119			
45	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15			
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Asp Asp Tyr 20 25 30			
50	Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45			
55	Ala Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val 50 55 60			
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Phe Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80			

	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
5	Ala	Lys	Gly	Leu	Thr	Asp	Thr	Thr	Leu	Tyr	Gly	Ser	Asp	Tyr	Trp	Gly	
				100					105					110			
	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
			115					120					125				
10	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	
		130					135					140					
	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
15	145					150				155						160	
	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
				165						170					175		
20	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
			180						185					190			
	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
			195					200					205				
25	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
		210					215					220					
	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	
30	225					230					235					240	
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
				245						250					255		
35	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
			260						265					270			
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
		275						280				285					
40	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
		290					295					300					
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
45	305					310					315					320	
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	
				325						330					335		
50	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
			340						345					350			
	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
			355					360					365				
55	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
		370					375					380					
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	

	385		390		395		400									
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
					405					410					415	
5	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
				420					425					430		
10	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
			435					440					445			
	Pro	Gly	Lys													
			450													
15	<210>	120														
	<211>	696														
	<212>	Білок														
	<213>	Штучна послідовність														
20	<220>															
	<223>	важкий ланцюг 1 з 2+1 PD1/LAG3 8311														
	<400>	120														
25	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ala	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
				20					25					30		
30	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
	Ser	Gly	Ile	Asp	Asn	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val
35		50					55					60				
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Val	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65					70					75					80
40	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Leu	Cys
				85						90					95	
	Thr	Lys	Thr	His	Ser	Gly	Leu	Ile	Val	Asn	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp
				100					105					110		
45	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
			115					120					125			
	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
50		130					135					140				
	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
	145					150					155					160
55	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165						170					175	
	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
				180					185					190		

	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	
			195					200					205				
5	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	
		210					215					220					
	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	
	225					230				235					240		
10	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
					245					250					255		
	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
15				260					265					270			
	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
		275						280					285				
20	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
	290						295					300					
	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
	305					310					315					320	
25	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	
					325					330					335		
	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
30				340					345					350			
	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
		355						360					365				
35	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
	370						375					380					
	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
	385					390				395						400	
40	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	
					405					410					415		
	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	
45				420					425					430			
	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	
		435						440					445				
50	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
	450						455					460					
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	
	465					470					475					480	
55	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	
					485					490					495		
	Ser	Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	

	500	505	510
	Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr	Ile Ser Gly Gly Gly	Arg Asp Ile Tyr
	515	520	525
5	Tyr Pro Asp Ser Val Lys	Gly Arg Phe Thr Ile	Ser Arg Asp Asn Ser
	530	535	540
10	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu	Gln Met Asn Ser Leu	Arg Ala Glu Asp Thr
	545	550	555
	Ala Val Tyr Tyr Cys Val	Leu Leu Thr Gly Arg	Val Tyr Phe Ala Leu
	565	570	575
15	Asp Ser Trp Gly Gln Gly	Thr Leu Val Thr Val	Ser Ser Ala Ser Val
	580	585	590
	Ala Ala Pro Ser Val Phe	Ile Phe Pro Pro Ser	Asp Glu Gln Leu Lys
	595	600	605
20	Ser Gly Thr Ala Ser Val	Val Cys Leu Leu Asn	Asn Phe Tyr Pro Arg
	610	615	620
25	Glu Ala Lys Val Gln Trp	Lys Val Asp Asn Ala	Leu Gln Ser Gly Asn
	625	630	635
	Ser Gln Glu Ser Val Thr	Glu Gln Asp Ser Lys	Asp Ser Thr Tyr Ser
	645	650	655
30	Leu Ser Ser Thr Leu Thr	Leu Ser Lys Ala Asp	Tyr Glu Lys His Lys
	660	665	670
	Val Tyr Ala Cys Glu Val	Thr His Gln Gly Leu	Ser Ser Pro Val Thr
	675	680	685
35	Lys Ser Phe Asn Arg Gly	Glu Cys	
	690	695	
40	<210> 121		
	<211> 452		
	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
45	<220>		
	<223> важкий ланцюг 2 з 2+1 PD1/LAG3 8311		
	<400> 121		
50	Glu Val Gln Leu Val Glu	Ser Gly Gly Gly Leu	Val Gln Pro Gly Gly
	1	5	10
	Ser Leu Arg Leu Ala Cys	Ala Ala Ser Gly Phe	Thr Phe Ser Asp Tyr
	20	25	30
55	Ala Met Ser Trp Val Arg	Gln Ala Pro Gly Lys	Gly Leu Glu Trp Val
	35	40	45
	Ser Gly Ile Asp Asn Ser	Gly Tyr Tyr Thr Tyr	Thr Thr Asp Ser Val
	50	55	60

	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Val	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
5	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Leu	Cys	85	90	95	
	Thr	Lys	Thr	His	Ser	Gly	Leu	Ile	Val	Asn	Asp	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	100	105	110	
10	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	115	120	125	
15	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	130	135	140	
	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	145	150	155	160
20	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	165	170	175	
	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	180	185	190	
25	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	195	200	205	
30	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	210	215	220	
	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	225	230	235	240
35	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	245	250	255	
	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	260	265	270	
40	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	275	280	285	
	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	290	295	300	
45	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	305	310	315	320
50	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	325	330	335	
	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	340	345	350	
55	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	355	360	365	
	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val				

	370		375		380													
	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro		
	385					390				395						400		
5	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr		
					405					410					415			
	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val		
10				420					425					430				
	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu		
			435					440					445					
15	Ser	Pro	Gly	Lys														
			450															
	<210>	122																
	<211>	694																
20	<212>	Білок																
	<213>	Штучна послідовність																
	<220>																	
	<223>	важкий ланцюг 1 з 2+1 PD1/LAG3 1252																
25	<400>	122																
	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu		
	1				5					10					15			
30	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			35					40					45					
	Gly	Glu	Ile	Asn	His	Asn	Gly	Asn	Thr	Asn	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys		
		50					55					60						
40	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			
45	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	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val		
50			115					120					125					
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala		
		130					135					140						
55	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser		
	145					150					155					160		
	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val		
					165					170					175			

	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
				180					185					190		
5	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
			195					200					205			
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
10			210				215					220				
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly
	225					230					235					240
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
15					245					250					255	
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
				260					265					270		
20	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
			275					280					285			
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
25			290				295					300				
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
	305					310					315					320
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu
30					325					330					335	
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr
				340					345					350		
35	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
			355					360					365			
	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
40			370				375					380				
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
	385					390					395					400
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
45					405					410					415	
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				420					425					430		
50	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
			435					440					445			
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
55			450				455					460				
	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln
	465					470					475					480
	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe

					485					490					495				
		Ser	Ser	Tyr	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu		
					500					505					510				
5		Glu	Trp	Val	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Arg	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Pro		
				515					520					525					
		Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn		
10				530				535					540						
		Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val		
		545					550					555					560		
15		Tyr	Tyr	Cys	Val	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg	Val	Tyr	Phe	Ala	Leu	Asp	Ser		
					565						570					575			
		Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala	Ala		
20					580					585					590				
		Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly		
				595				600						605					
		Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala		
25				610				615					620						
		Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln		
		625					630					635					640		
30		Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser		
					645						650					655			
		Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr		
				660						665					670				
35		Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser		
				675					680					685					
		Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys												
40				690															
		<210>		123															
		<211>		941															
		<212>		Білок															
45		<213>		Штучна послідовність															
		<220>																	
		<223>		важкий ланцюг 1 з 2+1 PD1/LAG3 8312															
50		<400>		123															
		Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
		1				5					10					15			
55		Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe	Asp	Asp	Tyr		
					20					25					30				
		Thr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
				35					40					45					

	Ala Val Ile Ser Trp Asp Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val	50	55	60
5	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Phe Lys Asn Thr Leu Tyr	65	70	75
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		85	90
10	Ala Lys Gly Leu Thr Asp Thr Thr Leu Tyr Gly Ser Asp Tyr Trp Gly	100	105	110
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		115	120
15	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala	130	135	140
	Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val	145	150	155
20	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		165	170
25	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val	180	185	190
	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		195	200
30	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys	210	215	220
	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly	225	230	235
35	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		245	250
40	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	260	265	270
	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		275	280
45	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	290	295	300
50	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	305	310	315
	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile		325	330
55	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	340	345	350
	Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser			

	355		360		365												
	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
	370						375					380					
5	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
	385					390					395					400	
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
10					405					410					415		
	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
				420					425					430			
15	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
			435					440					445				
	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
20		450					455					460					
	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	
	465					470					475					480	
	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ala	Ser	
25					485					490					495		
	Glu	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Asp	Asn	Ser	Phe	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	
				500					505					510			
30	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ser	Ser	Thr	Leu	
			515					520					525				
	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	
		530					535					540					
35	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	
	545					550					555					560	
	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Tyr	Asp	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	
40					565					570					575		
	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	
				580					585					590			
45	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	
			595					600					605				
	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	
50		610					615					620					
	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	
	625					630					635					640	
	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	
55					645					650					655		
	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	
				660					665					670			

	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	
			675					680					685				
5	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
			690				695					700					
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	
	705				710				715						720		
10	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	
				725					730						735		
	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr	Met	
15				740				745						750			
	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Thr	
			755					760					765				
20	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Arg	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	
	770					775						780					
	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	
	785					790					795					800	
25	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Leu	
				805						810					815		
	Leu	Thr	Gly	Arg	Val	Tyr	Phe	Ala	Leu	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
30				820					825					830			
	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	
			835					840					845				
35	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
	850					855						860					
	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
	865				870						875					880	
40	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
				885					890						895		
	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
45				900				905						910			
	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
			915				920						925				
50	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys				
	930					935						940					
	<210>	124															
	<211>	942															
	<212>	Білок															
55	<213>	Штучна послідовність															
	<220>																
	<223>	важкий ланцюг 1 з 2+1 PD1/LAG3 8313															

<400> 124

5	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	1 5 10 15
	Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr	20 25 30
10	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35 40 45
	Ser Gly Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val	50 55 60
15	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Val Lys Asn Thr Leu Tyr	65 70 75 80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys	85 90 95
20	Thr Lys Thr His Ser Gly Leu Ile Val Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp	100 105 110
	Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro	115 120 125
25	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr	130 135 140
30	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr	145 150 155 160
	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro	165 170 175
35	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr	180 185 190
	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn	195 200 205
40	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser	210 215 220
45	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala	225 230 235 240
	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu	245 250 255
50	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser	260 265 270
	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu	275 280 285
55	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr	290 295 300

	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
	305					310					315					320	
5	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	
					325					330					335		
	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
				340						345					350		
10	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
			355						360					365			
	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
15			370					375					380				
	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
	385					390					395					400	
20	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	
					405					410					415		
	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	
					420				425					430			
25	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	
			435					440					445				
	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
30			450				455					460					
	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	
	465					470					475					480	
35	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ala	
					485					490					495		
	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Asp	Asn	Ser	Phe	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	
				500					505					510			
40	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ser	Ser	Thr	
			515					520					525				
	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	
45			530				535					540					
	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	
	545					550					555					560	
50	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Tyr	Asp	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	
					565					570					575		
	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	
				580					585					590			
55	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	
			595					600					605				
	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	
	610						615					620					

	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	
	625					630					635					640	
5	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	
					645					650					655		
	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	
				660					665					670			
10	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	
			675					680					685				
	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
15		690					695					700					
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	
	705					710				715						720	
20	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	
					725					730					735		
	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr	
				740					745					750			
25	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	
			755					760					765				
	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Arg	Asp	Ile	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys	
30		770					775					780					
	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	
	785					790					795					800	
35	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	
					805					810					815		
	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg	Val	Tyr	Phe	Ala	Leu	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	
				820					825					830			
40	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
			835					840					845				
	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
45		850					855					860					
	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
	865					870					875					880	
50	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
					885					890					895		
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				900					905					910			
55	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
			915					920					925				
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys			

	930	935	940
	<210> 125		
	<211> 940		
5	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
10	<223> важкий ланцюг 1 з 2+1 PD1/LAG3 1088		
	<400> 125		
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu		
15	1 5 10 15		
	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr		
	20 25 30		
20	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		
25	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		
30	85 90 95		
	Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln		
	100 105 110		
35	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val		
	115 120 125		
	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		
	130 135 140		
40	Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser		
	145 150 155 160		
	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
45	165 170 175		
	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
	180 185 190		
50	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
	195 200 205		
	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
	210 215 220		
55	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly		
	225 230 235 240		
	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
	245 250 255		

	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270			
5	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
			275					280					285				
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
		290					295					300					
10	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305					310					315					320	
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	
15					325					330					335		
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
				340					345					350			
20	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
			355					360					365				
	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
	370						375					380					
25	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
	385					390					395					400	
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
30					405					410					415		
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430			
35	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
		435						440					445				
	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
	450						455					460					
40	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	
	465					470					475					480	
	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ala	Ser	Glu	
45					485					490					495		
	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Asp	Asn	Ser	Phe	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	
				500					505					510			
50	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ser	Ser	Thr	Leu	Glu	
		515					520						525				
	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	
	530						535					540					
55	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	
	545					550					555					560	
	Cys	Gln	Gln	Asn	Tyr	Asp	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	

	565	570	575
	Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro		
5	580	585	590
	Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu		
	595	600	605
10	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp		
	610	615	620
	Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp		
	625	630	635
15	Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys		
	645	650	655
	Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln		
20	660	665	670
	Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly		
	675	680	685
25	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
	690	695	700
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln		
	705	710	715
30	Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg		
	725	730	735
	Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser		
35	740	745	750
	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile		
	755	760	765
40	Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg		
	770	775	780
	Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met		
	785	790	795
45	Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Leu Leu		
	805	810	815
	Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
50	820	825	830
	Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu		
	835	840	845
55	Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys		
	850	855	860
	Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		
	865	870	875
			880

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
885 890 895

5 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
900 905 910

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
915 920 925

10 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
930 935 940

<210> 126
<211> 589
15 <212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> важкий ланцюг 1 з 2+1 PD1/LAG3 0918
20 <400> 126

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

25 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

35 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

40 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 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

45 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

50 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

55 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

	195		200		205											
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
	210						215					220				
5	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly
	225					230					235					240
	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
10					245					250					255	
	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
				260					265					270		
15	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
		275						280					285			
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
20		290					295					300				
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
	305					310					315					320
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu
25					325					330					335	
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys
				340					345					350		
30	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
		355						360					365			
	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
35		370					375					380				
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
	385					390					395					400
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
40					405					410						415
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
				420					425						430	
45	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
		435						440					445			
	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
50		450					455					460				
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu
	465					470					475					480
	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe
55					485					490					495	
	Ser	Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys
				500					505					510		

Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr
 515 520 525
 Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 5 530 535 540
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
 545 550 555 560
 10 Ala Val Tyr Tyr Cys Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu
 565 570 575
 Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 15 580 585
 <210> 127
 <211> 580
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 20
 <220>
 <223> важкий ланцюг 2 з 2+1 PD1/LAG3 0918
 <400> 127
 25
 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
 30 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
 50 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 40 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
 45 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 50 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 55 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro

	180							185							190						
5	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys					
			195					200					205								
10	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp					
		210					215					220									
15	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly					
	225					230					235					240					
20	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile					
				245						250					255						
25	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu					
				260					265					270							
30	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His					
		275						280					285								
35	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg					
		290					295					300									
40	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys					
	305					310					315					320					
45	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu					
					325					330					335						
50	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr					
				340					345					350							
55	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu					
			355					360					365								
60	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp					
		370					375					380									
65	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val					
	385					390					395					400					
70	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp					
					405					410					415						
75	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His					
				420					425					430							
80	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro					
			435					440					445								
85	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser					
		450					455					460									
90	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu					
	465					470					475					480					
95	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ala	Ser	Glu					
					485					490					495						

	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Asp	Asn	Ser	Phe	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
				500					505					510		
5	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ser	Ser	Thr	Leu	Glu
			515					520					525			
	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
		530					535					540				
10	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr
	545					550					555					560
	Cys	Gln	Gln	Asn	Tyr	Asp	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys
					565					570					575	
15	Val	Glu	Ile	Lys												
				580												
20	<210>	128														
	<211>	288														
	<212>	Білок														
	<213>	Homo sapiens														
25	<400>	128														
	Met	Gln	Ile	Pro	Gln	Ala	Pro	Trp	Pro	Val	Val	Trp	Ala	Val	Leu	Gln
	1				5					10					15	
30	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			
35	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
40	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
45				100					105					110		
	Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu
			115					120					125			
50	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
55	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
5	Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly		
	210	215	220
10	Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro		
	225	230	235
	Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly		
	245	250	255
15	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
20	<210> 129		
	<211> 5		
	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
25	<220>		
	<223> Пептидний лінкер G45		
	<400> 129		
30	Gly Gly Gly Gly Ser		
	1 5		
	<210> 130		
35	<211> 10		
	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
40	<223> Пептидний лінкер (G45)2		
	<400> 130		
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser		
45	1 5 10		
	<210> 131		
	<211> 10		
	<212> Білок		
50	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> Пептидний лінкер (SG4)2		
55	<400> 131		
	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		
	1 5 10		

5 <210> 132
 <211> 14
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Пептидний лінкер G4(SG4)2
 <400> 132
 10 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10
 15 <210> 133
 <211> 10
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 20 <223> Пептидний лінкер
 <400> 133
 25 Gly Ser Pro Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser
 1 5 10
 30 <210> 134
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Пептидний лінкер (G4S)3
 35 <400> 134
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 40 <210> 135
 <211> 20
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> Пептидний лінкер (G4S)4
 <400> 135
 50 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser
 20
 55 <210> 136
 <211> 8
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Пептидний лінкер
 5 <400> 136
 Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
 1 5
 10 <210> 137
 <211> 8
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 15 <220>
 <223> Пептидний лінкер
 <400> 137
 20 Gly Ser Gly Ser Gly Asn Gly Ser
 1 5
 <210> 138
 <211> 8
 25 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Пептидний лінкер
 30 <400> 138
 Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5
 35 <210> 139
 <211> 6
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 40 <220>
 <223> Пептидний лінкер
 <400> 139
 45 Gly Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5
 <210> 140
 50 <211> 4
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 55 <223> Пептидний лінкер
 <400> 140
 Gly Gly Ser Gly

1

<210> 141
 <211> 8
 5 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Пептидний лінкер
 10 <400> 141

Gly Gly Ser Gly Asn Gly Ser Gly
 1 5
 15 <210> 142
 <211> 8
 <212> Білок
 20 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Пептидний лінкер

<400> 142
 25 Gly Gly Asn Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5

<210> 143
 30 <211> 6
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 35 <223> Пептидний лінкер

<400> 143

Gly Gly Asn Gly Ser Gly
 40 1 5

<210> 144
 <211> 461
 <212> Білок
 45 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> важкий ланцюг 2 з 1+1 PD1/LAG3 0725 (1+1 транс)

<400> 144
 50

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
	50						55					60					
5	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
	65					70					75					80	
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
					85					90					95		
10	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	
				100					105					110			
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
15				115				120					125				
	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
							135					140					
20	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
	145					150					155					160	
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
					165					170					175		
25	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
				180					185					190			
	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
30				195				200					205				
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
		210				215						220					
35	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	
	225					230					235					240	
	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	
					245					250					255		
40	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe	Asp	Asp	Tyr	Thr	Met	Asn	
				260					265					270			
	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	
45				275				280					285				
	Ser	Trp	Asp	Gly	Gly	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	
		290					295					300					
50	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Phe	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	
	305					310					315					320	
	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Gly	
					325					330					335		
55	Leu	Thr	Asp	Thr	Thr	Leu	Tyr	Gly	Ser	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
				340				345						350			
	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	

	355		360		365											
	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
	370						375					380				
5	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
	385					390					395					400
	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
10					405					410					415	
	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
				420					425					430		
15	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
		435						440					445			
	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys			
20		450					455						460			
	<210>	145														
	<211>	685														
	<212>	Білок														
	<213>	Штучна послідовність														
25	<220>															
	<223>	важкий ланцюг 2 з 2+1 PD1/LAG3 0750 (2+1 транс)														
	<400>	145														
30	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
	1				5					10					15	
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe	Asp	Asp	Tyr
35				20					25					30		
	Thr	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
40	Ala	Val	Ile	Ser	Trp	Asp	Gly	Gly	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val
		50					55						60			
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Phe	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
45	65					70					75					80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
	Ala	Lys	Gly	Leu	Thr	Asp	Thr	Thr	Leu	Tyr	Gly	Ser	Asp	Tyr	Trp	Gly
50				100					105					110		
	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
				115				120					125			
55	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
		130					135					140				
	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
	145					150					155					160

	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
					165					170					175		
5	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
				180					185					190			
	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
				195				200					205				
10	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
		210					215					220					
	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	
15	225					230					235					240	
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
					245					250					255		
20	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
				260					265					270			
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
			275					280					285				
25	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
		290					295					300					
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
30	305					310					315					320	
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	
					325					330					335		
35	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
				340					345					350			
	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
			355					360					365				
40	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
		370					375					380					
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
45	385					390					395					400	
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
					405					410					415		
50	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
				420					425					430			
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
			435					440					445				
55	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	
		450					455					460					
	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	

	465		470		475		480									
	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ile	Phe	Asp	Asp	Tyr	Thr	Met	Asn
				485						490					495	
5	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile
				500					505					510		
10	Ser	Trp	Asp	Gly	Gly	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg
			515					520					525			
	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Phe	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met
		530					535					540				
15	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Gly
	545					550					555					560
	Leu	Thr	Asp	Thr	Thr	Leu	Tyr	Gly	Ser	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
					565					570					575	
20	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
				580					585					590		
	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
25			595					600					605			
	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
		610					615					620				
30	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
	625					630					635					640
	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
					645					650					655	
35	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser
				660					665					670		
	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys			
40			675					680					685			
	<210>	146														
	<211>	215														
	<212>	Білок														
45	<213>	Штучна послідовність														
	<220>															
	<223>	легкий ланцюг CEA (CEA TCB)														
50	<400>	146														
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	
55	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Ala	Ala	Val	Gly	Thr	Tyr
				20					25					30		
	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35					40					45			

	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Arg	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50						55					60					
5	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
	65					70					75				80		
	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Leu	
					85					90					95		
10	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	
				100					105					110			
	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	
15			115					120					125				
	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	
	130						135					140					
20	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	
	145					150					155				160		
	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	
					165					170					175		
25	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	
				180					185					190			
	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	
30			195					200					205				
	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210						215										
35	<210>	147															
	<211>	214															
	<212>	Білок															
	<213>	Штучна послідовність															
40	<220>																
	<223>	легкий ланцюг CD3 (CEA TCB)															
	<400>	147															
45	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	
				20					25					30			
50	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Glu	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly	
			35					40					45				
	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	
55		50					55					60					
	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	
	65					70					75				80		

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

5 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser Ser Ala
100 105 110

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
115 120 125

10 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
130 135 140

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
145 150 155 160

15 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
165 170 175

20 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
180 185 190

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
195 200 205

25 Val Glu Pro Lys Ser Cys
210

<210> 148
<211> 694
30 <212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CEA CD3 crossfab VHck fc виступ P329GLALA (CEA TCB)

35 <400> 148

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

40 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

50 Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

55 Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

	115	120	125	
	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala			
	130	135	140	
5	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
	145	150	155	160
	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
10		165	170	175
	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val			
		180	185	190
15	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His			
		195	200	205
	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys			
	210	215	220	
20	Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu			
	225	230	235	240
	Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser			
25		245	250	255
	Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val			
		260	265	270
30	Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Arg Ser			
		275	280	285
	Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg			
	290	295	300	
35	Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met			
	305	310	315	320
	Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His			
40		325	330	335
	Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln			
		340	345	350
45	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val			
		355	360	365
	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser			
	370	375	380	
50	Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln			
	385	390	395	400
	Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val			
55		405	410	415
	Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu			
		420	425	430

	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu
			435					440					445			
5	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg
			450				455					460				
	Gly	Glu	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
	465					470					475					480
10	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
					485					490					495	
	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
15				500					505					510		
	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
			515					520					525			
20	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
		530					535					540				
	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
	545					550					555					560
25	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly
					565					570						575
	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
30				580					585					590		
	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn
			595					600					605			
35	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
		610					615					620				
	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
	625					630					635					640
40	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
					645					650					655	
	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
45				660					665					670		
	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
			675					680					685			
50	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
		690														
	<210>	149														
	<211>	451														
	<212>	Білок														
55	<213>	Штучна послідовність														
	<220>															
	<223>	CEA VHCH1 Fc отвір P329GLALA (CEA TCB)														

<400> 149

5	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	1 5 10 15
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe	20 25 30
10	Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	35 40 45
	Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe	50 55 60
15	Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	65 70 75 80
	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85 90 95
20	Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly	100 105 110
	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser	115 120 125
	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala	130 135 140
30	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val	145 150 155 160
	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala	165 170 175
35	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val	180 185 190
	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His	195 200 205
	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys	210 215 220
45	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly	225 230 235 240
	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	245 250 255
50	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	260 265 270
	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	275 280 285
55	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 5 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 10 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 15 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 20 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 25 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450
 30 <210> 150
 <211> 232
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність
 35 <220>
 <223> CD3 VH-CL (CEACAM5 TCB)
 <400> 150
 40 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 50 Ser Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 55 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe

	100	105	110
	Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	Leu Val Thr Val Ser	Ser Ala Ser Val
	115	120	125
5	Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys		
	130	135	140
10	Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg		
	145	150	155
	Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn		
		165	170
15	Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser		
		180	185
	Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
		195	200
20	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
		210	220
	Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
25		225	230
	<210> 151		
	<211> 449		
	<212> Білок		
30	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> CEACAM5 VH-CH1(EE)-Fc (отвір, P329G LALA)		
35	<400> 151		
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
	1	5	10
40	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr		
		20	25
	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
		35	40
45	Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe		
		50	60
	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
50		65	70
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
		85	90
55	Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly		
		100	105
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
		115	125

	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	
	130						135					140					
5	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
	145					150					155					160	
	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
					165					170					175		
10	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
				180					185					190			
	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
15				195				200					205				
	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
	210						215					220					
20	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	
	225					230					235					240	
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
					245					250					255		
25	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
				260					265					270			
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
30			275					280					285				
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
		290					295					300					
35	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
	305					310					315					320	
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	
					325					330					335		
40	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
				340					345					350			
	Cys	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
45			355					360					365				
	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
			370				375					380					
50	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
	385					390					395					400	
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
					405					410					415		
55	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
				420				425					430				
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	

	435	440	445
	Pro		
5	<210> 152		
	<211> 674		
	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
10	<220>		
	<223> CEACAM5 VH-CH1(EЕ)-CD3 VL-CH1-Fc (виступ, P329G LALA)		
	<400> 152		
15	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
	1	5	10 15
20	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr		
	20	25	30
	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
	35	40	45
25	Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe		
	50	55	60
	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
	65	70	75 80
30	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
	85	90	95
	Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly		
35	100	105	110
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
	115	120	125
40	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
	130	135	140
	Ala Leu Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
	145	150	155 160
45	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
	165	170	175
	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
50	180	185	190
	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
	195	200	205
55	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
	210	215	220
	Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr		
	225	230	235 240

	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	
					245					250					255		
5	Cys	Gly	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	
				260					265					270			
	Val	Gln	Glu	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	
			275					280					285				
10	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Gly	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	
		290					295					300					
	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	
15		305				310					315				320		
	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val	Phe	Gly	
				325					330						335		
20	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	
				340					345					350			
	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	
			355					360					365				
25	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
		370					375					380					
	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
30		385				390					395					400	
	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	
				405					410						415		
35	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	
			420					425					430				
	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	
			435				440						445				
40	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	
		450					455					460					
	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
45		465				470					475					480	
	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
				485					490					495			
50	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
			500						505				510				
	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
			515					520					525				
55	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
		530					535					540					
	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	

	545		550		555		560
	Ile Glu Lys Thr	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln					
		565		570		575	
5	Val Tyr Thr	Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val					
		580		585		590	
10	Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val						
		595		600		605	
	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro						
		610		615		620	
15	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr						
		625		630		635	
	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val						
			645		650		655
20	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu						
		660		665		670	
	Ser Pro						
25							
	<210>	153					
	<211>	218					
	<212>	Білок					
30	<213>	Штучна послідовність					
	<220>						
	<223>	CEACAM5 VL-CL(RK)					
35	<400>	153					
	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly						
	1	5		10		15	
40	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe						
		20		25		30	
	Gly Val Gly Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro						
		35		40		45	
45	Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala						
		50		55		60	
	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser						
50		65		70		75	
	Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn						
		85		90		95	
55	Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg						
		100		105		110	
	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg Lys						
		115		120		125	

	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
	130						135				140					
5	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
	145					150				155					160	
	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
				165					170					175		
10	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
			180					185					190			
	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
15			195				200					205				
	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
	210					215										
20	<210>	154														
	<211>	5														
	<212>	Білок														
	<213>	Штучна послідовність														
25	<220>															
	<223>	CEA-HCDR1														
	<400>	154														
30	Glu	Phe	Gly	Met	Asn											
	1				5											
	<210>	155														
	<211>	17														
35	<212>	Білок														
	<213>	Штучна послідовність														
	<220>															
	<223>	CEA-HCDR2														
40	<400>	155														
	Trp	Ile	Asn	Thr	Lys	Thr	Gly	Glu	Ala	Thr	Tyr	Val	Glu	Glu	Phe	Lys
	1				5				10						15	
45	Gly															
	<210>	156														
	<211>	12														
	<212>	Білок														
	<213>	Штучна послідовність														
	<220>															
55	<223>	CEA-HCDR3														
	<400>	156														
	Trp	Asp	Phe	Ala	Tyr	Tyr	Val	Glu	Ala	Met	Asp	Tyr				

	1	5	10
	<210> 157		
	<211> 11		
5	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> CEA-LCDR1		
10	<400> 157		
	Lys Ala Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Val Ala		
	1	5	10
15	<210> 158		
	<211> 7		
	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
20	<220>		
	<223> CEA-LCDR2		
	<400> 158		
25	Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg		
	1	5	
	<210> 159		
30	<211> 10		
	<212> Білок		
	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
35	<223> CEA-LCDR3		
	<400> 159		
	His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr		
40	1	5	10
	<210> 160		
	<211> 121		
	<212> Білок		
45	<213> Штучна послідовність		
	<220>		
	<223> CEA VH		
50	<400> 160		
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
	1	5	10 15
55	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe		
		20	25 30
	Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
		35	40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
50 55 60

5 Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

10 Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 161
<211> 108
<212> Білок
20 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> CEA VL

25 <400> 161

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

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

50 <210> 162
<211> 5
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> CEA-HCDR1 (CEACAM5)

55 <400> 162

Asp Thr Tyr Met His
1 5

<210> 163
 <211> 17
 <212> Білок
 5 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CEA-HCDR2 (CEACAM5)

 10 <400> 163

 Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe Gln
 1 5 10 15

 15 Gly

 <210> 164
 <211> 12
 20 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CEA-HCDR3 (CEACAM5)

 25 <400> 164

 Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr
 1 5 10

 30
 <210> 165
 <211> 15
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 35
 <220>
 <223> CEA-LCDR1 (CEACAM5)

 <400> 165

 40
 Arg Ala Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe Gly Val Gly Phe Leu His
 1 5 10 15

 <210> 166
 <211> 7
 45 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> CEA-LCDR2 (CEACAM5)

 50 <400> 166

 Arg Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

 55
 <210> 167
 <211> 9
 <212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> CEA-LCDR3 (CEACAM5)

5

<400> 167

Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Tyr Thr

1 5

10

<210> 168

<211> 121

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

15

<220>

<223> CEA VH (CEACAM5)

<400> 168

20

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

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

35 40 45

30

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Val Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

35

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

40

Ala Pro Phe Gly Tyr Tyr Val Ser Asp Tyr Ala Met Ala Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

45

<210> 169

<211> 111

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

50

<220>

<223> CEA VL (CEACAM5)

<400> 169

55

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 Gly Glu Ser Val Asp Ile Phe

20 25 30

	Gly	Val	Gly	Phe	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	
			35					40					45				
5	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	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		
10	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Thr	Asn	
					85					90					95		
	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys		
15				100					105					110			

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 20 1. Біспецифічне антитіло, що містить перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з білком запрограмованої смерті клітин-1 (PD1), і другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з геном активації лімфоцитів-3 (LAG3), причому біспецифічне антитіло є двовалентним і містить Fc-домен,
- 25 де перший Fab-фрагмент містить зазначений перший антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, що містить домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9, і домен VL, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10, і другий Fab-фрагмент містить другий антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, що містить домен VH, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 20, і домен VL, який містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 21.
- 30 2. Біспецифічне антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що біспецифічне антитіло містить Fc-домен, який являє собою Fc-домен IgG, зокрема Fc-домен IgG1 або Fc-домен IgG4, і при цьому Fc-домен містить одну або більше амінокислотних замін, які зменшують зв'язування з Fc-рецептором, зокрема з Fcγ-рецептором.
3. Біспецифічне антитіло за п. 1 або 2, яке **відрізняється** тим, що біспецифічне антитіло містить
- 35 Fc-домен підкласу IgG1 людини з амінокислотними мутаціями L234A, L235A і P329G (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).
4. Біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 1-3, яке **відрізняється** тим, що біспецифічне антитіло містить Fc-домен, що містить модифікацію, яка сприяє асоціації першої та другої субодиниць Fc-домону.
- 40 5. Біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 1-4, яке **відрізняється** тим, що перша субодиниця Fc-домону містить амінокислотні заміни S354C і T366W (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом), а друга субодиниця Fc-домону містить амінокислотні заміни Y349C, T366S і Y407V (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).
6. Біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 1-5, яке **відрізняється** тим, що в одному з Fab-фрагментів варіабельні домени VL і VH замінені один на одний так, що домен VH є частиною
- 45 легкого ланцюга, а домен VL є частиною важкого ланцюга.
7. Біспецифічне антитіло за п. 5 або 6, яке **відрізняється** тим, що в першому Fab-фрагменті, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з PD1, варіабельні домени VL і VH замінені один на одний.
- 50 8. Біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 1-7, яке **відрізняється** тим, що біспецифічне антитіло містить Fab-фрагмент, при цьому в константному домені CL амінокислоту в положенні 124 незалежно заміщають лізином (K), аргініном (R) або гістидином (H) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом), а в константному домені CH1 амінокислоти в положеннях 147 і 213 незалежно заміщають глутаміновою кислотою (E) або аспарагіновою кислотою (D) (нумерація
- 55 відповідно до індексу EU за Кабатом).
9. Біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 6-8, яке **відрізняється** тим, що в другому Fab-фрагменті, який містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, у константному домені CL амінокислоту в положенні 124 незалежно заміщають лізином (K), аргініном (R) або гістидином (H) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом), а в константному домені CH1 амінокислоти в положеннях 147 і 213 незалежно заміщають
- 60

глутаміною (E) або аспарагіною (D) (нумерація відповідно до індексу EU за Кабатом).

10. Біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 1-9, яке містить перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 96, перший легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 98, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 100, і другий легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 101.

11. Біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 1-9, яке **відрізняється** тим, що біспецифічне антитіло містить другий Fab-фрагмент, що містить антигензв'язуючий домен, який специфічно зв'язується з LAG3, який злитий з C-кінцем Fc-домену.

12. Біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 1-9 або 11, яке містить перший важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 96, перший легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 98, другий важкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 144, і другий легкий ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 101.

13. Полінуклеотид, що кодує біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 1-12.

14. Прокаріотична або еукаріотична клітина-хазяїн, що містить полінуклеотид за п. 13.

15. Спосіб одержання біспецифічного антитіла за пп. 1-12, що включає культивування клітини-хазіяна за п. 14 в умовах, придатних для експресії біспецифічного антитіла, і виділення біспецифічного антитіла із культури.

16. Фармацевтична композиція, яка містить біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-12 і щонайменше один фармацевтично прийнятний наповнювач.

17. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-12 або фармацевтична композиція за п. 16 для застосування як лікарського засобу.

25 18. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-12 або фармацевтична композиція за п. 16 для застосування при лікуванні онкологічного захворювання.

19. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-12 або фармацевтична композиція за п. 16 для застосування при лікуванні хронічної вірусної інфекції.

20. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-12 або фармацевтична композиція за п. 16 для застосування в профілактиці або лікуванні онкологічного захворювання, причому біспецифічне антитіло вводять в комбінації з хіміотерапевтичним агентом, опроміненням та/або іншими агентами для застосування в імунотерапії онкологічного захворювання.

21. Біспецифічне антитіло за будь-яким із пп. 1-12 або фармацевтична композиція за п. 16 для застосування в профілактиці або лікуванні онкологічного захворювання, причому біспецифічне антитіло вводять в комбінації з анти-CEA/анти-CD3 біспецифічним антитілом.

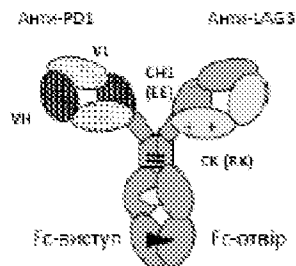


Fig. 1A

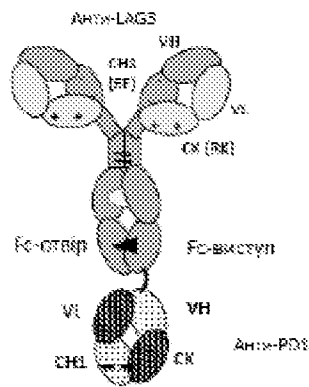


Fig. 1B

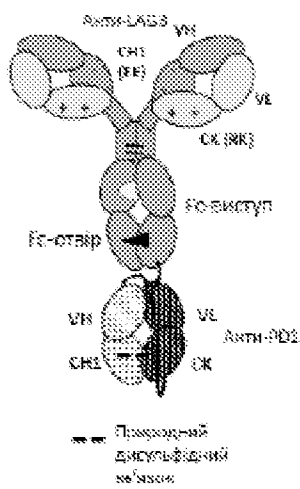


Fig. 1C

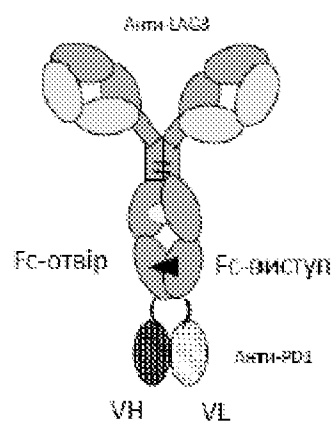
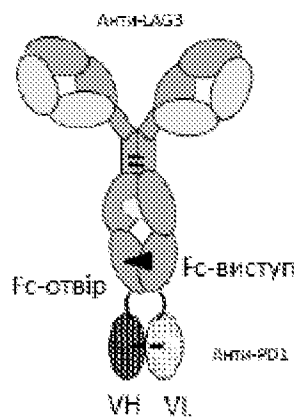
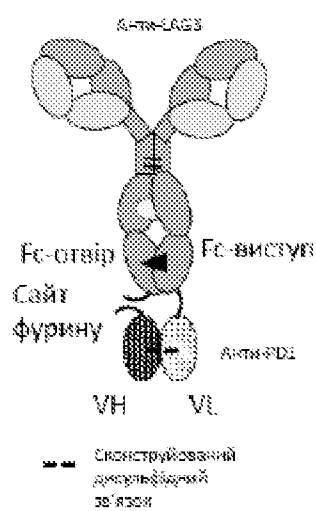


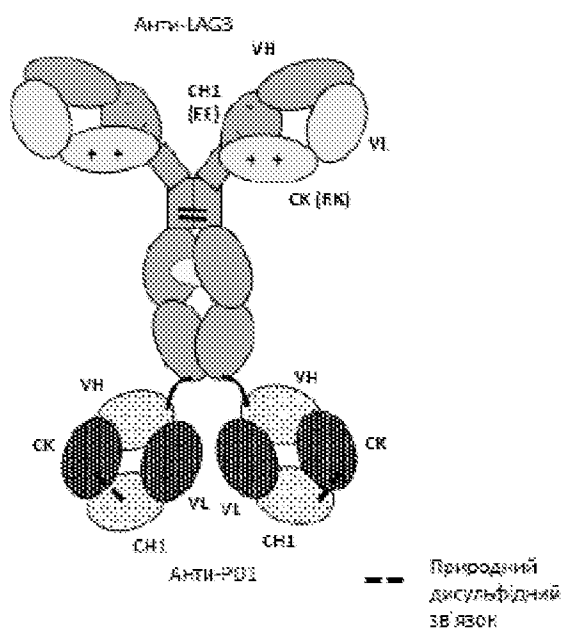
Fig. 1D



Фіг. 1Е



Фіг. 1F



Фіг. 1G

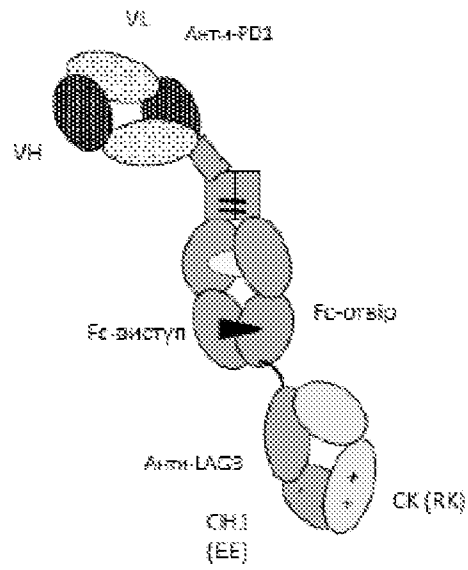


Fig. 1H

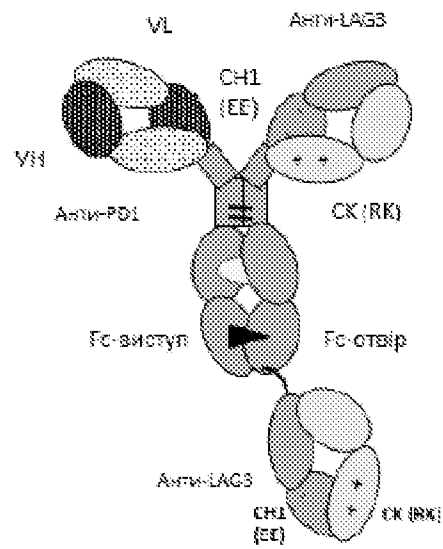


Fig. 1I

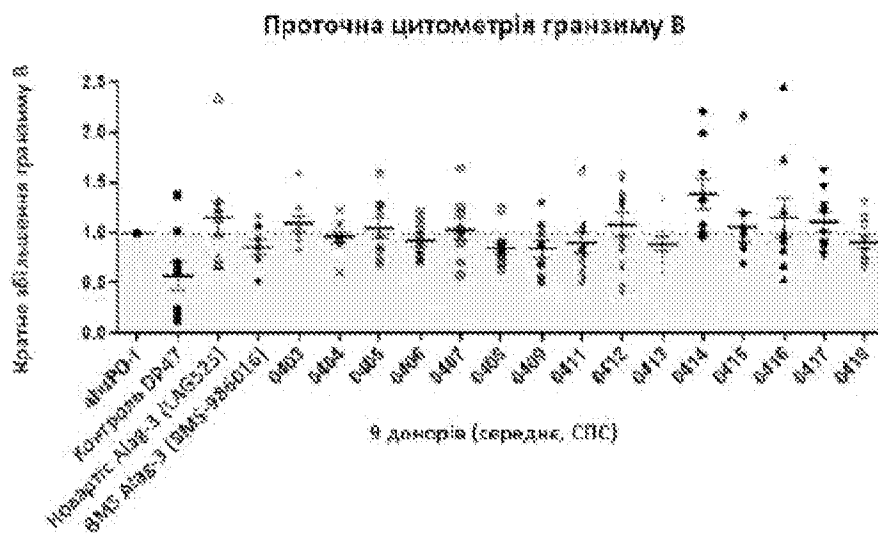


Fig. 2A

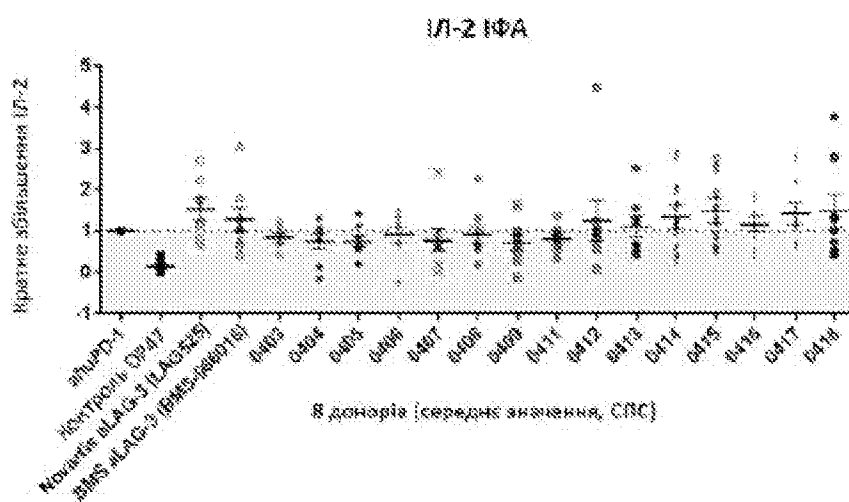
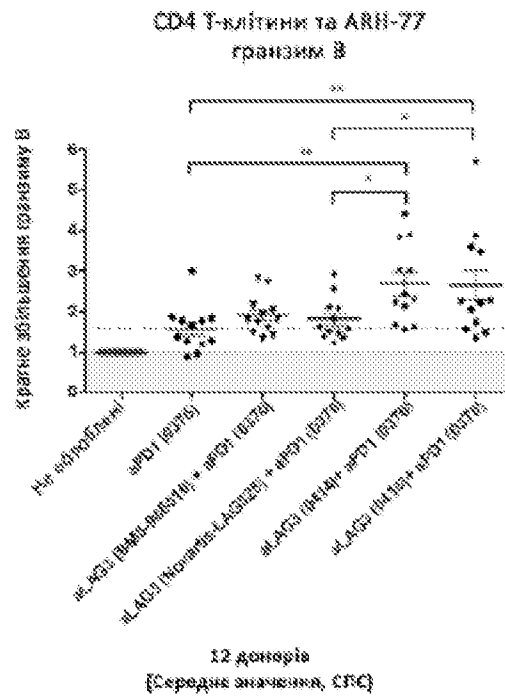
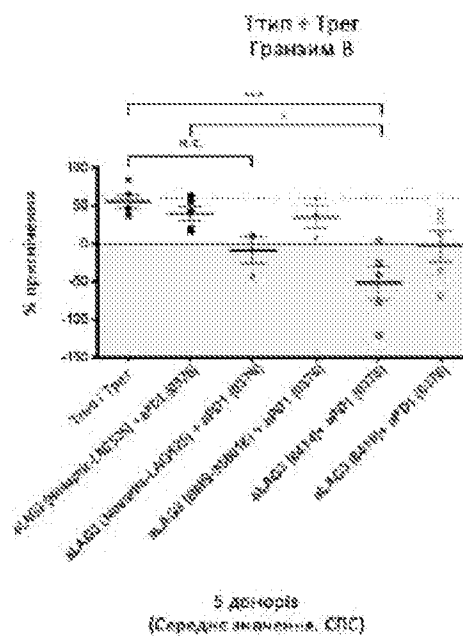


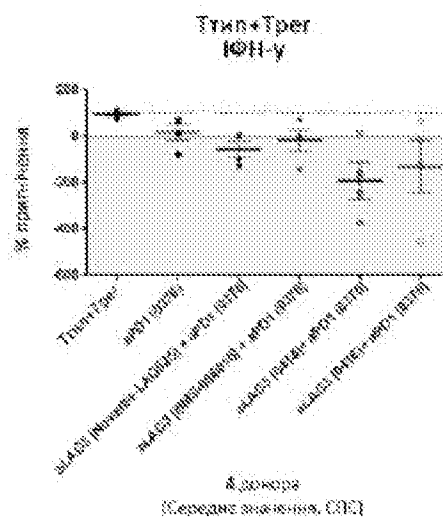
Fig. 2B



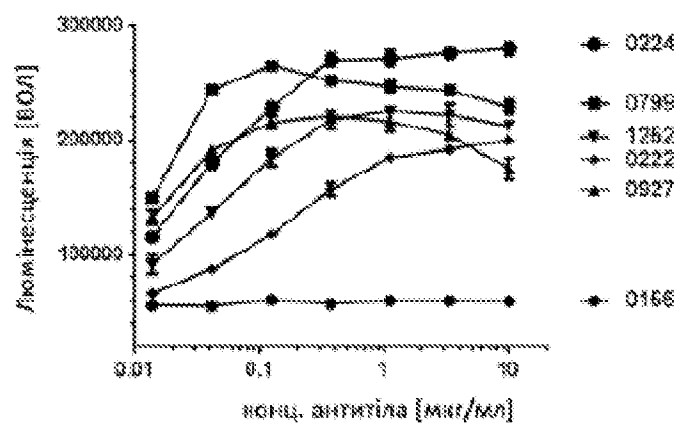
Фіг. 3



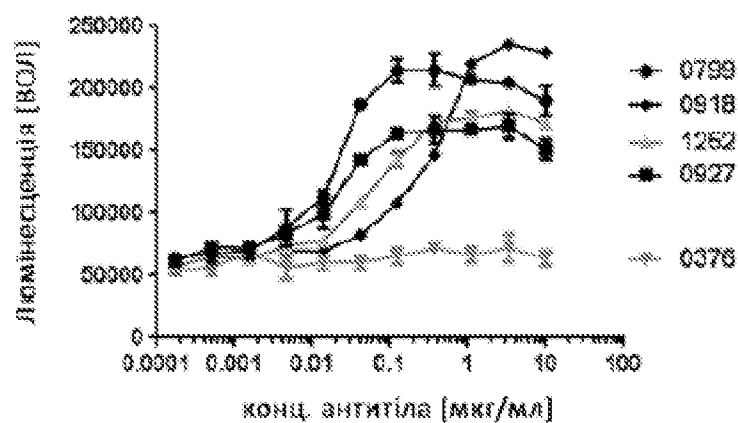
Фіг. 4А



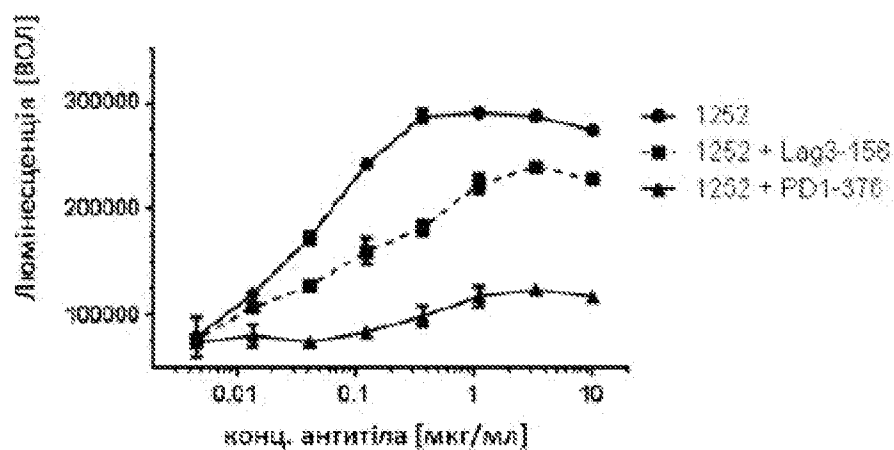
Фіг. 4В



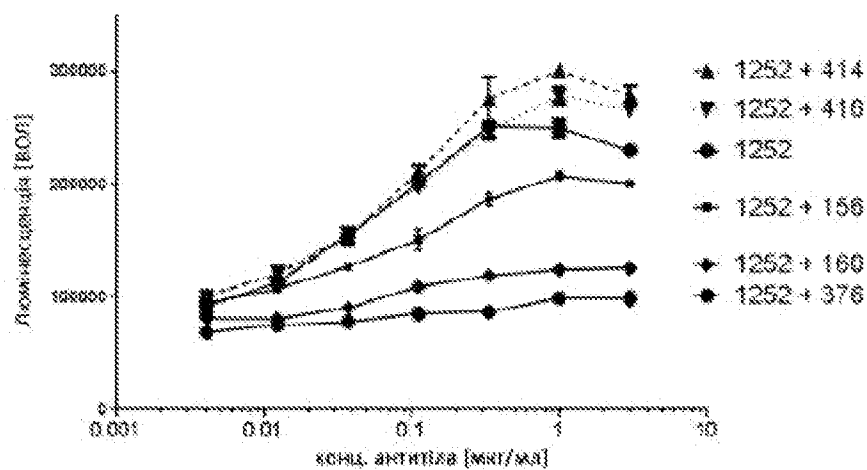
Фіг. 5А



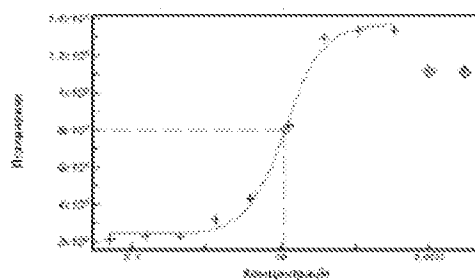
Фіг. 5В



Фіг. 5С



Фіг. 5D



Фіг. 6А

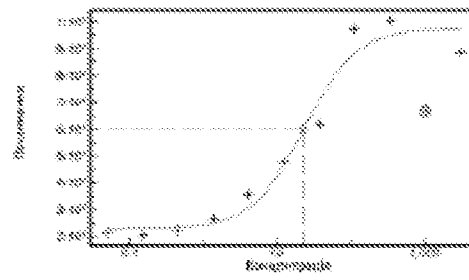


Fig. 6B

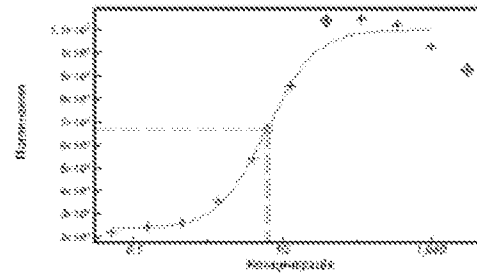


Fig. 6C

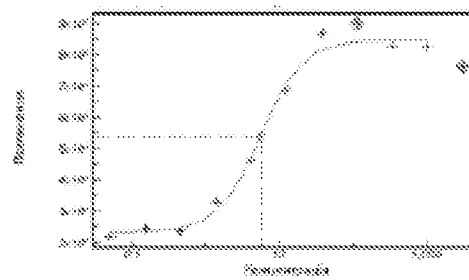


Fig. 6D

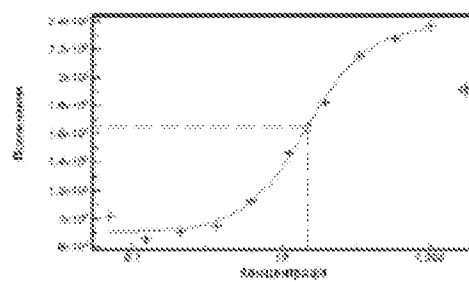


Fig. 7A

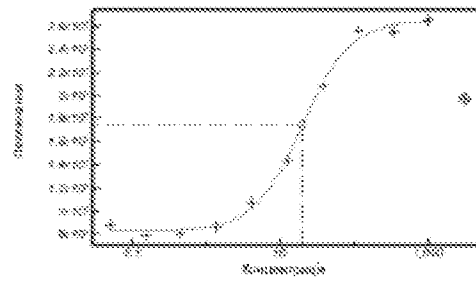


Fig. 7B

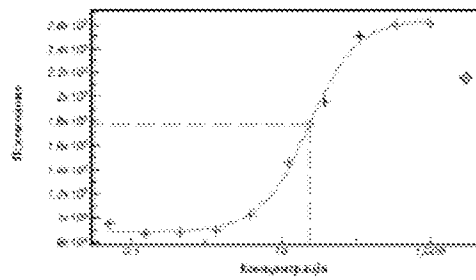


Fig. 7C

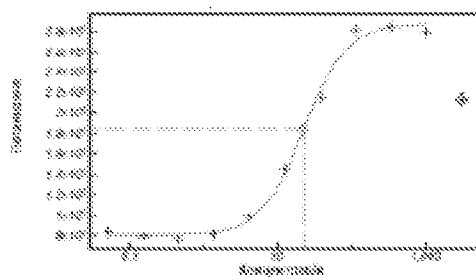


Fig. 7D

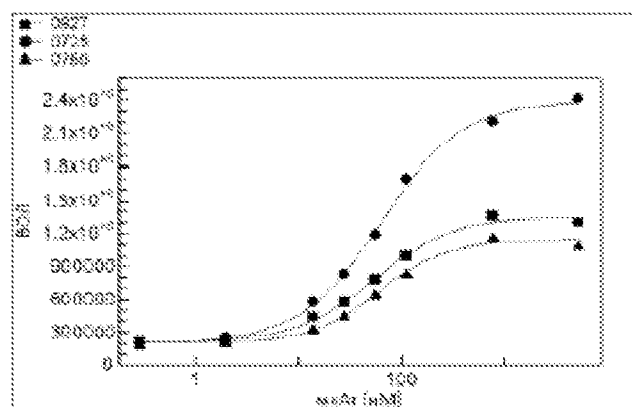


Fig. 7E

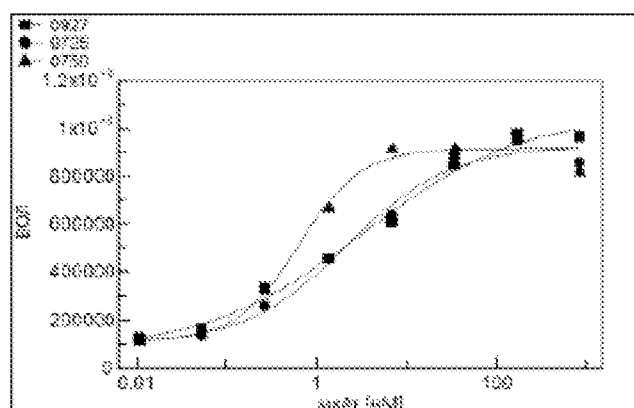


Fig. 7F

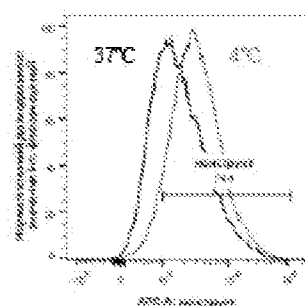


Fig. 8A

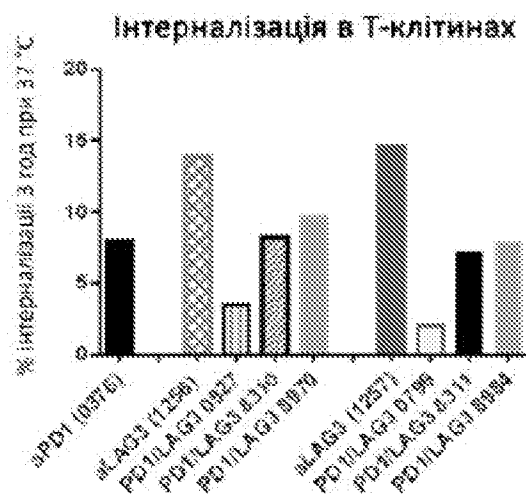
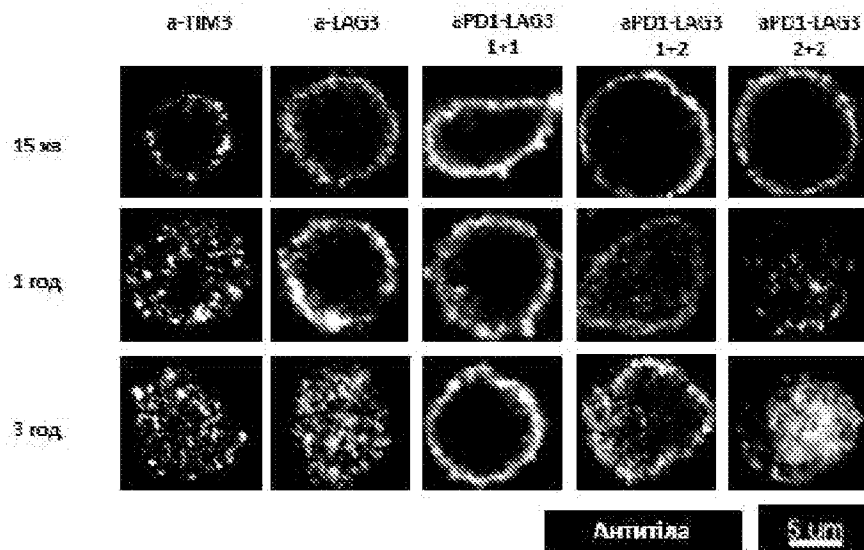
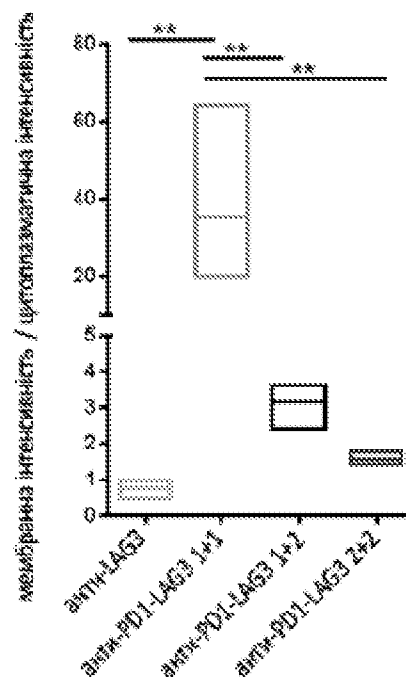


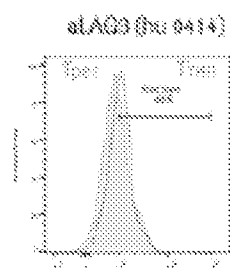
Fig. 8B



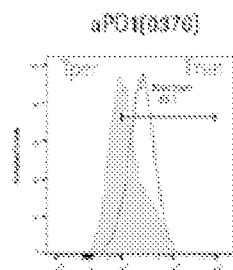
Фиг. 9А



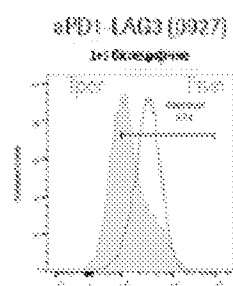
Фиг. 9В



Фиг. 10А

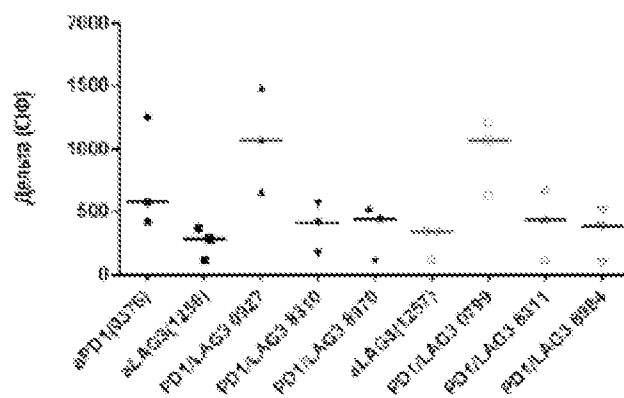


Фіг. 10B



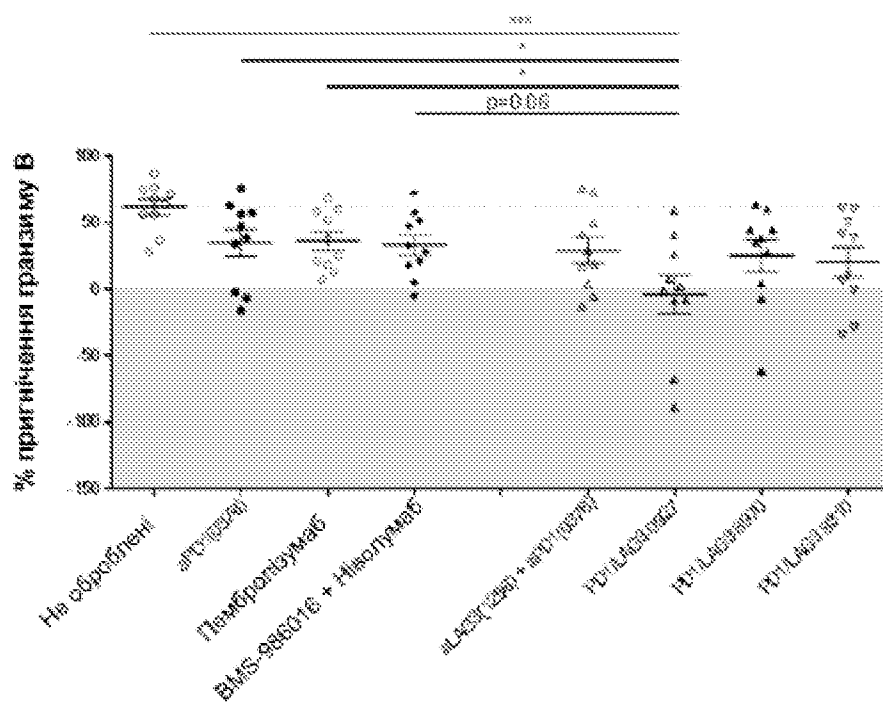
Фіг. 10C

Зв'язування антитіла Ттип у порівнянні з Трег



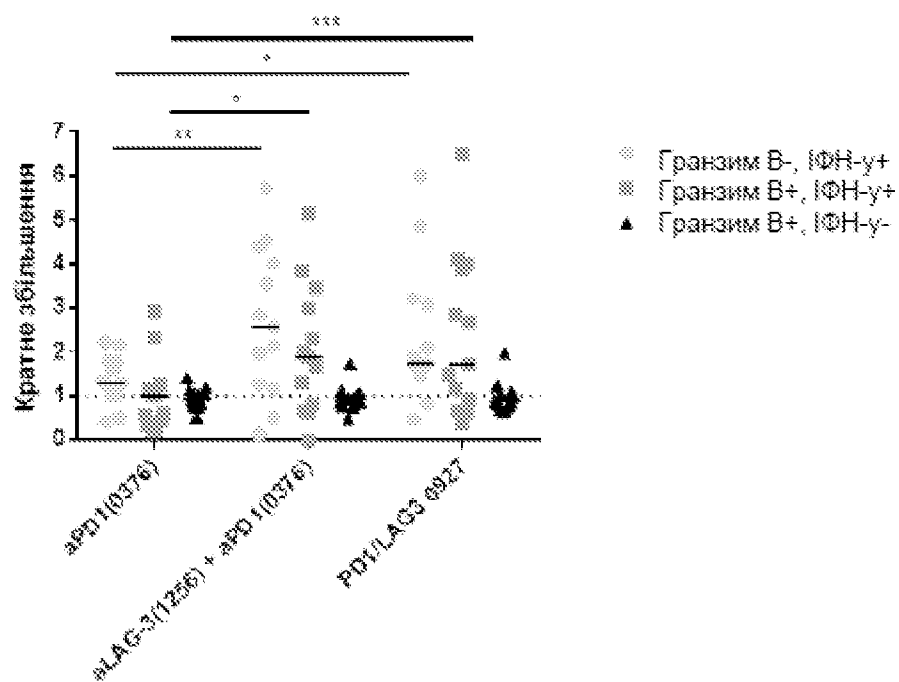
Фіг. 10D

Сумісне блокування PD-1 та Трег зберігає ефекторні функції Ттип від Трег пригнічення



Фіг. 11

Сумісне блокування PD-1 та LAG-3 посилює специфічні
для пухлинного антигена ефекторні функції Т-клітин у
МКПК пацієнтів з меланою



13 Донорів
(Середнє значення, СПС)

Фіг. 12

Рівень гранзиму В при сумісному культивуванні D4 та ARH77
Нормалізований до необроблених

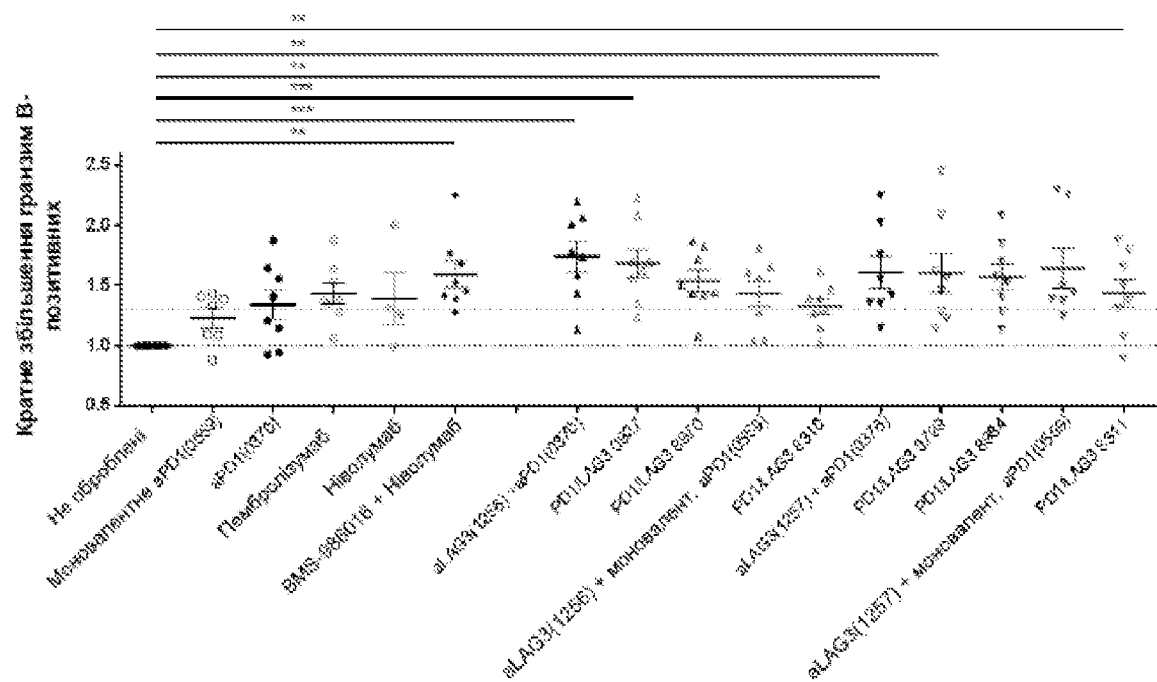
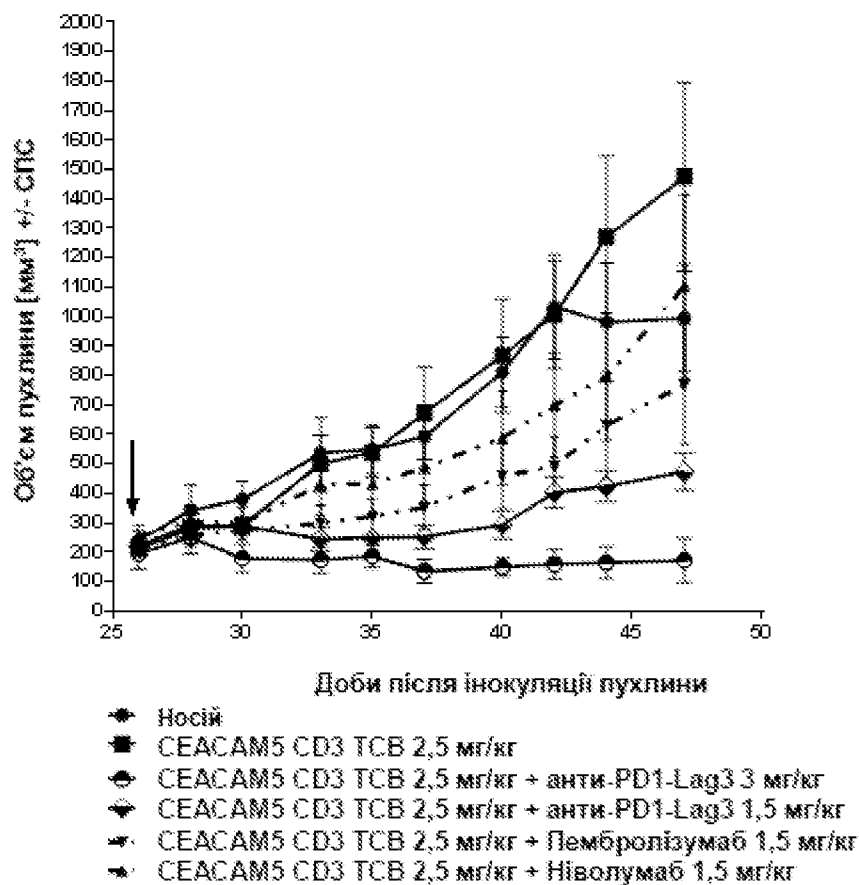
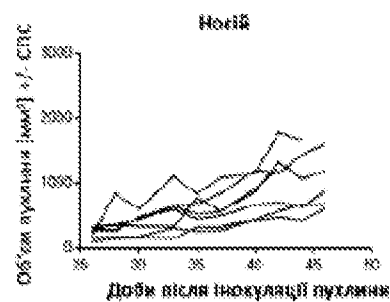


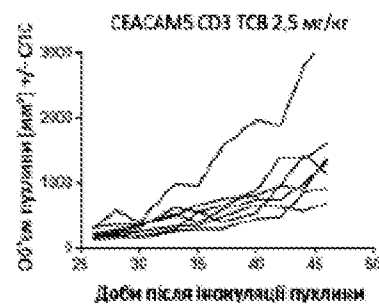
Fig. 13



Фіг. 14



Фіг. 15A



Фіг. 15B

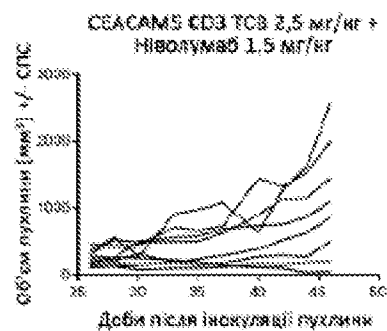


Fig. 15C

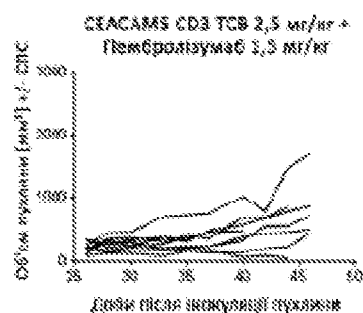


Fig. 15D

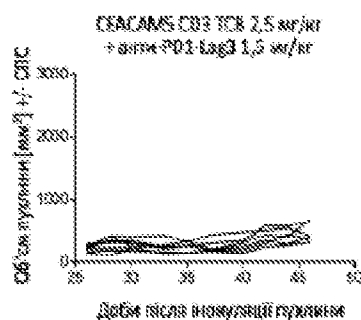


Fig. 15E

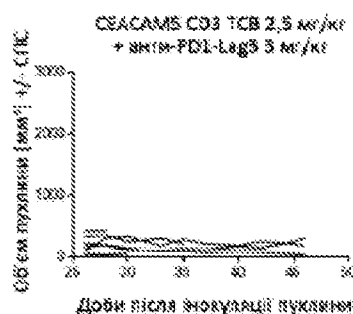


Fig. 15F