



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 16/08 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/66 (2017.01)

A61P 31/20 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/082 (2018.08); C07K 16/2809 (2018.08); C07K 16/2818 (2018.08); C07K 16/283 (2018.08); C07K 2317/31 (2018.08); C07K 2317/565 (2018.08); C07K 2317/73 (2018.08); C07K 2319/33 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2016114504, 16.09.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
16.09.2014

Дата регистрации:  
29.10.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
16.09.2013 EP 13184635.4

(43) Дата публикации заявки: 23.10.2017 Бюл. №  
30

(45) Опубликовано: 29.10.2018 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 18.04.2016

(86) Заявка РСТ:  
EP 2014/069675 (16.09.2014)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2015/036606 (19.03.2015)

Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО  
"Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ПРОТЦЕР Ульрике (DE),  
БОНЕ Феликс (DE),  
МОМБУРГ Франк (DE),  
МОЛЬДЕНХАУЭР Герхард (DE)

(73) Патентообладатель(и):

ХЕЛЬМХОЛЬТЦ ЦЕНТРУМ МЮНХЕН  
- ДОЙЧЕС ФОРШУНГСЦЕНТРУМ ФЮР  
ГЕЗУНДХАЙТ УНД УМВЕЛЬТ (ГМБХ)  
(DE),  
ДОЙЧЕС КРЕБСФОРШУНГСЦЕНТРУМ  
(DE)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: WO 2008/119567 A2, 09.10.2008. WO  
2011/057124 A1, 12.05.2011. EP 2524699 A1,  
21.11.2012. BOHNE F. et al., "T Cells  
Redirected Against Hepatitis B Virus Surface  
Proteins Eliminate Infected Hepatocytes",  
Gastroenterology, 2008, 134: 239-247. US 2005/  
158829 A1, 21.07.2005. US 2006/127392 A1,  
15.06.2006. PIZARRO J.C. et al., "Structural  
and (см. прод.)

(54) БИ- ИЛИ ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПОЛИПЕПТИДЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ ПОВЕРХНОСТНЫЕ  
АНТИГЕНЫ ИММУННЫХ ЭФФЕКТОРНЫХ КЛЕТОК И АНТИГЕНЫ HBV ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ  
ИНФЕКЦИЙ BV И АССОЦИИРОВАННЫХ С НИМИ СОСТОЯНИЙ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к иммунологии. Предложен полипептид, способный связываться с поверхностным антигеном вируса гепатита В (HBV) и поверхностным антигеном, презентруемым иммунными эффекторными клетками. Также рассмотрена нуклеиновая

кислота, кодирующая указанный полипептид; комплекс, содержащий два полипептида; иммунная эффекторная клетка и композиции для лечения и предупреждения инфекции HBV и/или состояния, вызываемого указанной инфекцией HBV, в частности цирроза печени, печеночно-

клеточной карциномы и рака печени. Полипептид по настоящему изобретению обеспечивает специфический лизис инфицированных HBV

клеток и может найти дальнейшее применение в лечении заболеваний, вызванных инфекцией HBV. 7 н. и 9 з.п. ф-лы, 16 ил., 4 пр.

(56) (продолжение):

**functional characterization of a monoclonal antibody specific for the preS1 region of hepatitis B virus", FEBS Lett., 2001, 509(3):463-8. EA 013564 B1, 30.06.2010.**

R U 2 6 7 1 0 8 9 C 2

R U 2 6 7 1 0 8 9 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

*C07K 16/08* (2006.01)*C07K 16/28* (2006.01)*C07K 16/46* (2006.01)*C07K 19/00* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61K 47/66* (2017.01)*A61P 31/20* (2006.01)*C12N 15/13* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*C12N 5/10* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C07K 16/082* (2018.08); *C07K 16/2809* (2018.08); *C07K 16/2818* (2018.08); *C07K 16/283* (2018.08); *C07K 2317/31* (2018.08); *C07K 2317/565* (2018.08); *C07K 2317/73* (2018.08); *C07K 2319/33* (2018.08)

(21)(22) Application: **2016114504, 16.09.2014**

(24) Effective date for property rights:  
**16.09.2014**

Registration date:  
**29.10.2018**

Priority:

(30) Convention priority:  
**16.09.2013 EP 13184635.4**

(43) Application published: **23.10.2017 Bull. № 30**(45) Date of publication: **29.10.2018 Bull. № 31**(85) Commencement of national phase: **18.04.2016**

(86) PCT application:  
**EP 2014/069675 (16.09.2014)**

(87) PCT publication:  
**WO 2015/036606 (19.03.2015)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO  
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**PROTTSER Ulrike (DE),  
BONE Feliks (DE),  
MOMBURG Frank (DE),  
MOLDENKHAUER Gerkhard (DE)**

(73) Proprietor(s):

**KHELMKHOLTTS TSENTRUM  
MYUNKHEN - DOJCHES  
FORSHUNGSTSENTRUM FYUR  
GEZUNDKHAJT UND UMWELT (GMBKH)  
(DE),  
DOJCHES KREBSFORSHUNGSTSENTRUM  
(DE)**

**(54) BI- OR MULTISPECIFIC POLYPEPTIDES BINDING IMMUNE EFFECTOR CELL SURFACE ANTIGENS  
AND HBV ANTIGENS FOR TREATMENT OF BV INFECTIONS AND ASSOCIATED CONDITIONS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: present invention relates to immunology. Proposed is a polypeptide capable of binding to the surface antigen of the hepatitis B virus (HBV) and a surface antigen presented by immune effector cells. Also, contemplated is a nucleic acid encoding said polypeptide; a complex containing two polypeptides; an immune effector cell, and compositions for treating and preventing HBV infection and / or a

condition caused by said HBV infection, in particular liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma, and liver cancer.

EFFECT: polypeptide of the present invention provides a specific lysis of the infected HBV cells and can find further application in the treatment of diseases caused by HBV infection.

16 cl, 16 dwg, 4 ex

Настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему (a) первый набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR), сконструированный для связывания первого антигена; и (b) (ba) второй набор из шести CDR, сконструированный для связывания второго антигена; или (bb) лиганд, способный связываться со вторым антигеном; где (i) указанный первый антиген выбран из малого поверхностного антигена вируса гепатита В (HBV); среднего поверхностного антигена HBV и большого поверхностного антигена HBV; и (ii) указанный второй антиген выбран из поверхностных антигенов, презентуемых иммунными эффекторными клетками, такими как натуральные киллеры (NK) и цитотоксические Т-лимфоциты (CTL).

В настоящем описании цитирован ряд документов, включая патентные заявки и инструкции изготовителей. Содержание этих документов, хотя и не считается связанным с патентоспособностью настоящего изобретения, включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Более конкретно, все цитированные документы включены в качестве ссылок в той степени, как если бы было конкретно и индивидуально указано, что каждый индивидуальный документ включен в качестве ссылки.

Приблизительно 350 миллионов человек хронически инфицированы вирусом гепатита В (HBV). Инфекция HBV может влечь за собой цирроз печени и печеночно-клеточную карциному (HCC), которые вызывают приблизительно один миллион смертей в год (Ganem et al., Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*; 350:1118-29 (2004)). Инфекции HBV в настоящее время не могут контролироваться приблизительно у 5% взрослых пациентов и приблизительно у 90% новорожденных. В таком случае инфекция HBV становится хронической. Вероятной причиной является недостаточный клеточный иммунный ответ. Доступные в настоящее время противовирусные лекарственные средства, которые используют для лечения инфекции HBV, ингибируют репликацию вируса. Однако ковалентно замкнутая кольцевая ДНК (кзкДНК) остается в ядре инфицированных гепатоцитов и может вызывать реактивацию инфекции HBV после того, как пациент прекращает принимать медикаменты. Таким образом, намереваясь излечить инфекцию полностью, было бы необходимым устранить инфицированные HBV клетки, содержащие указанную кзкДНК (Protzer et al., *Nat Immunol Rev* 12: 2013-213 (2012)).

Однако такое цитотоксическое устранение инфицированных клеток HBV (будь то цитотоксические Т-лимфоциты или натуральные киллеры (NK)) не происходит или не происходит в достаточной степени.

Инфицированные клетки, содержащие кзкДНК HBV, экспонируют на их поверхности поверхностные вирусные белки. Полагают, что это происходит, несмотря на то, что вирус высвобождается во внутриклеточные везикулы, поскольку ряд поверхностных белков HBV остаются встроенными во внутриклеточную мембрану эндоплазматической сети. В ходе процессов везикулярного транспорта указанная внутриклеточная мембрана может сливаться с клеточной мембраной, что приводит к экспонированию поверхностных белков HBV на поверхности инфицированной клетки.

Bohne et al. (T cells redirected against Hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology*; 134:239-247 (2008)) и Krebs et al. (T Cells Expressing a Chimeric Antigen Receptor That Binds Hepatitis B Virus Envelope Proteins Control Virus Replication in Mice. *Gastroenterology* (2013)) описывают химерные рецепторы антигенов, которые при ретровирусной доставке и экспрессии на поверхности Т-клеток позволяют первичным Т-клеткам человека и мыши распознавать гепатоциты, экспонирующие малый поверхностный антиген HBV и лизировать клетки с реплицирующимся HBV.

Биспецифические антитела, как правило, используют в области онкологии. В качестве

примера см. Hartmann et al. (Treatment of refractory Hodgkin disease with an anti-CD 16/CD30 bispecific antibody. Blood; 89:2042-7 (1997)).

В EP 2 524 699 A1 описаны трифункциональные антитела. Эти антитела "обладают функциональной Fc-областью" и "должны состоять из тяжелых цепей иммуноглобулинов различных подклассов". С другой стороны в Hornig und Farber-Schwarz описана в главе 40 "Antibody Engineering" (ed. Patrick Channes, Humane Press, 2012) конструкция scFv, которая лишена Fc-части.

В Liao et al. (Oncology Reports 3, 637-644 (1996)) описаны биспецифические моноклональные антитела, перенацеливающие эффекторные клетки на лизис ксенотрансплантатов гепатомы человека у мышей nude. Описанные биспецифические антитела получают путем слияния двух гибридом с получением гибридомной клеточной линии, экспрессирующей комбинации тяжелая/легкая цепь двух различных антител. Это может приводить спариванию двух различных тяжелых цепей, а также к спариванию идентичных тяжелых цепей, что дает начало случайной смеси моноспецифических исходных антител и биспецифических антител. Биспецифические антитела содержат тяжелую и легкую цепи и димеризуются с образованием молекулы Ig, которая не является единой полипептидной цепью.

Ввиду уровня техники, техническая проблема может состоять в предоставлении альтернативных или усовершенствованных средств и способов для лечения инфекции HBV, а также состояний, вызываемых инфекцией HBV, таких как цирроз печени или печеночно-клеточная карцинома. Выражаясь в терминах клеточной биологии, техническая проблема может состоять в предоставлении средств и способов для устранения клеток, содержащих кзкДНК HBV. Эта техническая проблема решается прилагаемой формулой изобретения.

Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему (a) первый набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR), скомпонованных для связывания первого антигена; и (b) (ba) второй набор из шести CDR, скомпонованных для связывания второго антигена; или (bb) лиганд, способный связываться со вторым антигеном; где (i) указанный первый антиген выбран из малого поверхностного антигена HBV; среднего поверхностного антигена HBV и большого поверхностного антигена HBV; и (ii) указанный второй антиген выбран из поверхностных антигенов, презентруемых иммунными эффекторными клетками, такими как натуральные киллеры (NK) и цитотоксические Т-лимфоциты (CTL).

Термин "полипептид" определяет молекулу, которая представляет собой поликонденсат аминокислот, которые образуют одну единую цепь с одним N-концом и одним C-концом. Составляющие аминокислоты включают 20 встречающихся в природе протеиногенных аминокислот. Предпочтительно, указанный полипептид состоит исключительно из указанных встречающихся в природе протеиногенных аминокислот. Вместе с тем, термин распространяется на молекулы, которые, в дополнение к указанным встречающимся в природе протеиногенным аминокислотам, содержат вплоть до 20%, 10%, 5%, 2% или 1% аминокислот, которые выбраны из не встречающихся в природе  $\alpha$ -аминокислот,  $\beta$ -аминокислот, D-аминокислот, селеноцистеина, селенометионина, гидроксипролина, пирролизина и орнитина. Более того, понятно, что одна или более, как например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, могут быть фосфорилированными. Последнее применимо, в частности, к серину, треонину и тирозину. Также могут присутствовать другие посттрансляционные модификации, известные в данной области, включая гликозилирование.

Гликозилирование включает N-связанное гликозилирование, как правило, по аспарагину,

и О-связанное гликозилирование, как правило, по остаткам серина или треонина. N-и/или С-конец может быть защищенным защитными группами, включая ацетил для N-конца и амин для С-конца. Тип связи между аминокислотами, содержащимися в указанном полипептиде, ограничивается амидными (CONH) связями. Термин "амидная связь" включает пептидные связи, которые соединят  $\alpha$ -карбоксилат данной аминокислоты с  $\alpha$ -аминогруппой следующей аминокислоты. "Амидная связь" также распространяется на изопептидные связи, которые представляют собой амидную связь, которая не присутствует на основной цепи полипептида. Например, вместо  $\alpha$ -аминогруппы может быть вовлечена аминогруппа боковой цепи лизина. Аналогично, вместо  $\alpha$ -карбоксильной группы может быть вовлечен карбоксилат боковой цепи глутамата или аспартата. Предусматривается встречаемость одного или более, как например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 изопептидных связей. Хотя предпочтительными являются полипептиды, в которых составляющие аминокислоты связаны друг с другом исключительно пептидными связями.

Как правило, отсутствует верхний предел количества аминокислот в полипептиде. Как можно видеть из иллюстративных полипептидных последовательностей, содержащихся в списке последовательностей, полипептиды по настоящему изобретению обычно содержат несколько сот аминокислот, предпочтительно от 250 до 1000, от 400 до 900 или от 700 до 800 аминокислот. Различить пептиды с одной стороны и полипептид с другой стороны просто: пептиды имеют 30 или менее аминокислот и полипептиды имеют более 30 аминокислот.

Термин "определяющая комплементарность область", сокращенно обозначаемый как "CDR" имеет общепринятое в данной области значение. Она представляет собой короткую подпоследовательность, как правило, в диапазоне от приблизительно 3 до приблизительно 25 аминокислот, которая сообщает антителу способность специфически распознавать эпитоп антигена. Как правило, в переменном домене легкой цепи антитела присутствует три CDR и в переменном домене тяжелой цепи антитела присутствует три CDR. Хотя CDR обычно являются частью доменов иммуноглобулинов, в соответствии с настоящим изобретением в этом отсутствует необходимость.

Достаточной является аминокислотная последовательность, которая содержит указанные CDR, при условии, что указанная аминокислотная последовательность при сворачивании в физиологических условиях презентует указанные CDR в пространственной близости и сохраняет их способность распознавать их антиген. Упомянутая пространственная близость и способность связывать антиген выражаются термином "скомпонованы для связывания антигена", как используют в описанном выше основном варианте осуществления. Термин "домен иммуноглобулина" известен в данной области и относится к последовательности, как правило из 70-100 аминокислот, предполагая трехмерную структуру 2-слойного сэндвича между 7 и 9 антипараллельными  $\beta$ -цепями.

Каждый из указанного первого набора из шести CDR, а также указанного второго набора из шести CDR определяет участок связывания.

Понятно, что, помимо указанного первого набора и указанного второго набора в полипептиде по изобретению отсутствуют другие CDR.

Термин "антиген" имеет его принятое в данной области значение. Он относится к молекуле, которая специфически распознается и связывается набором из шести CDR, которые, как правило, презентуются доменами иммуноглобулинов. Конкретная часть антигена, распознаваемая и связываемая указанными CDR, также известна как эпитоп.

Термин "лиганд" имеет его принятое в данной области значение. Лиганд представляет собой контрструктуру для рецептора. Более конкретно, лиганд способен связываться, предпочтительно специфически связываться, с распознаваемым им рецептором. В соответствии с изобретением указанный лиганд предпочтительно представляет собой

иммунолиганд. Иммунолиганд представляет собой лиганд, который способен связываться с рецептором, присутствующим на поверхности иммунной эффекторной клетки. Предпочтительными иммунными эффекторными клетками являются, как определено выше, NK-клетки и CTL. Предпочтительными являются иммунолиганды, которые, когда они связаны с распознаваемым ими рецептором на поверхности иммунной эффекторной клетки, проявляют стимулирующий и/или костимулирующий эффект. Термины "активировать" и "стимулировать" используют в этом контексте эквивалентно. Рецепторы, связываемые предпочтительными иммунолигандами, дополнительно указаны ниже.

Поверхностные белки S/M/L HBV представляют собой малые, средние и большие поверхностные белки на наружной оболочке HBV (Stibbe, W., and W. H. Gerlich. Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. J. Virol. 1983 46: 626-628).

Три поверхностных антигена HBV транскрибируются и транслируются с одной рамки считывания и отличаются друг от друга длиной N-концевой части. Таким образом, большой поверхностный антиген содержит часть, которая не присутствует ни в среднем, ни в малом поверхностном антигене, и средний поверхностный антиген содержит часть, которая, в то время как содержится в большом антигене, не содержится в малом антигене. Малый антиген состоит из последовательности, которая содержится на C-концевой части как среднего, так и большого антигена.

Большой поверхностный антиген HBV может встраиваться в цитоплазматическую мембрану двумя способами. С внеклеточной стороны может находиться либо N-конец, либо C-конец. Обе конфигурации встречаются в клетках, инфицированных HBV.

Указанный второй антиген представляет собой поверхностный антиген, презентруемый иммунными эффекторными клетками, предпочтительно, специфически презентруемый NK-клетками и/или CTL. Иммунные эффекторные клетки представляют собой клетки, которые перенацеливаются на инфицированные HBV клетки, причем указанные инфицированные HBV клетки презентруют упомянутые поверхностные антигены HBV на их поверхности.

Особенно предпочтительно, чтобы связывание в соответствии с изобретением, в частности, между CDR и антигенами, а также между лигандами и антигенами, было специфическим. Термины "специфически связывается" и "специфически связывающийся" (имеющие то же значение, что и "специфически взаимодействующий") используют в соответствии с настоящим изобретением для обозначения того, что эти связывающие части не реагируют перекрестно или по существу не реагируют перекрестно с эпитопом или структурой, сходной со структурой антигена-мишени. Перекрестную реактивность исследуемой панели молекул можно исследовать, например, путем оценки связывания указанной панели молекул в общепринятых условиях с представляющий интерес эпитопом, а также с рядом более или менее близкородственных (структурно и/или функционально) эпитопов. Специфическими для представляющего интерес эпитопа считаются только те молекулы, которые связываются с представляющим интерес эпитопом в его соответствующем контексте (например, конкретный мотив в структуре белка), но не связываются или по существу не связываются с какими-либо другими

эпитопами.

Первый аспект включает варианты осуществления, где положения (a) и (ba) вместе являются единственными связывающими участками, присутствующими на указанном полипептиде, а также варианты осуществления, где положения (a) и (bb) вместе являются

Хроническая инфекция HBV характеризуется иммунотолерантным статусом. Более конкретно, клетки CTL и NK пациента функционируют так, что полного устранения инфицированных клеток, или полного контроля репликации HBV, или полной элиминации HBV не происходит. Полипептиды по изобретению представляют собой биспецифические молекулы в том отношении, что они специфически распознают поверхностный антиген HBV с одной стороны и поверхностный антиген иммунных эффекторных клеток с другой стороны. Можно полагать, что такие биспецифические молекулы сообщают искусственную специфичность иммунным эффекторным клеткам. В действительности, клетки CTL и NK перенацеливаются полипептидами по изобретению (также обозначаемые как являющиеся "биспецифическими"), так что они привлекаются к инфицированным HBV клеткам и уничтожают их.

Связывание полипептидов по изобретению с инфицированными HBV клетками с одной стороны и привлечение иммунных эффекторных клеток с другой стороны может происходить в любом порядке или также одновременно.

В частности, предполагается системное применение полипептидов по изобретению либо путем инъекции, либо в качестве перорально применяемой формы, и позволение им связаться с инфицированными HBV или экспрессирующими антиген HBV клетками-мишенями и привлечь указанные иммунные эффекторные клетки к указанным клеткам-мишеням.

Вместе с тем, также предусматривается приведение в контакт полипептидов по изобретению с иммунными эффекторными клетками (или популяцией мононуклеарных клеток периферической крови, содержащей указанные эффекторные клетки), так что указанные эффекторные клетки становятся нагруженными указанными полипептидами. Такие эффекторные клетки (или популяция РВМС, содержащая такие нагруженные эффекторные клетки), которые нагружены *in vitro* или *ex vivo*, можно вводить пациенту, страдающему инфекцией HBV или состоянием, ассоциированным с ней и определенным ниже. Такое введение можно осуществлять внутривенно, например, в Arteria hepatica. Иммунная эффекторная клетка с полипептидом в соответствии с настоящим изобретением, связываемым с поверхностным антигеном указанной иммунной эффекторной клетки, также является аспектом настоящего изобретения. Этот аспект дополнительно описан ниже.

Это уничтожение, в частности, в отношении антивирусных иммунных медиаторов (например, цитокинов), секретируемых иммунными клетками, обеспечивает устранение инфекции HBV, или длительный контроль инфекции HBV, или элиминацию опухолевых клеток, экспрессирующих поверхностные антигены HBV. Предпочтительные или иллюстративные биспецифические полипептиды в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают удивительно высокие уровни уничтожения инфицированных HBV клеток или опухолевых клеток печени (также известных как клетки гепатомы), реплицирующих HBV или экспрессирующих поверхностные антигены HBV; см. примеры, прилагаемые к настоящему описанию.

Учитывая, что биспецифические полипептиды в соответствии с настоящим изобретением обеспечивают адаптированную специфичность для иммунных эффекторных клеток, природная имманентная специфичность иммунных клеток или



презентация им антигенов становятся несущественными. По существу, большой набор эффекторных клеток-кандидатов подвержен перенацеливанию. Более того, полипептиды по изобретению обладают биодоступностью и временем полужизни, которые по меньшей мере сравнимы с биодоступностью и временем полужизни моноклональных антител.

5 В предпочтительном варианте осуществления (a) указанный первый набор из шести CDR содержится в первом фрагменте scFv; и/или (b) (ba) указанный второй набор из шести CDR содержится во втором фрагменте scFv; или (bb) указанный лиганд представляет собой иммунолиганд, предпочтительно способный связываться с NKG2D/CD314 (такой как лиганды MICA, MICB, ULBP1-6), NKp30/NCR3/CD337 (такой как  
10 лиганд B7-H6), 4-1BB/CD137 (такой как лиганд 4-1BB-L/CD137L) или OX40/CD134 (такой как лиганд OX40-L/CD252). Наклонная черта ("/") разделяет альтернативные принятые в данной области обозначения. В скобках представлены предпочтительные репрезентативные представители данного рода антигенов.

Термин "scFv" является общепринятым в данной области. Это сокращение обозначает  
15 "одноцепочечный вариабельный фрагмент" антитела и определяет полипептид, способный специфически распознавать и связывать эпитоп антигена. Как отмечалось выше, три CDR презентуются вариабельным доменом легкой цепи ( $V_L$ ) антитела и три CDR презентуются вариабельным доменом тяжелой цепи ( $V_H$ ) антитела. В scFv два вариабельных домена соединены друг с другом пептидным линкером. Полученная  
20 слитая конструкция представляет собой единую полипептидную цепь. Это обеспечивает простоту экспрессии молекулы scFv. Схематическое изображение представлено на фиг.1.

Термины " $V_H$ -домен" и " $V_L$ -домен" используют в соответствии с определениями,  
25 установленными в данной области. Таким образом, они относятся к вариабельной области тяжелой цепи ( $V_H$ ) и вариабельной области легкой цепи ( $V_L$ ) иммуноглобулинов, соответственно. Как правило, каждый из  $V_H$ - и  $V_L$ -доменов содержит три определяющих комплементарность области (CDR), где CDR представляют собой высоковариабельные области, в основном ответственные за связывание антигена.

30 Пептидный линкер предпочтительно используют для связывания либо вариабельных областей scFv, либо для связывания scFv с областью димеризации и/или спейсерной областью, предпочтительно, с Fc. Как правило, пептидные линкеры имеют длину от 3 до 30 аминокислот, предпочтительно от 5 до 25 или от 10 до 20 аминокислот.

Предпочтительными являются линкеры, которые не нарушают или по существу не  
35 нарушают структуру и/или функцию доменов или полипептидов, которые они связывают (связывание приводит к одной непрерывной полипептидной цепи). Линкеры включают Gly-богатые линкеры, такие как линкер  $(Gly_4Ser)_3$  (SEQ ID NO: 47), который используют в предпочтительных полипептидах по изобретению для связывания доменов  $V_H/V_L$  scFv, специфичных к CTL или NK, и линкер Y<sub>01</sub> (SEQ ID NO: 48; AKTTPKLEEGEFSEARV, как описано в Sellie et al., Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 40, No. 6,  
40 November 2007, pp. 875-880), который используют в предпочтительных полипептидах по изобретению для связывания доменов  $V_H/V_L$  scFv, специфичных к поверхностным антигенам HBV. Также линкер  $(Gly_4Ser)_4$  (SEQ ID NO: 49) можно использовать для  
45 связывания доменов  $V_H/V_L$  scFv, специфичных к поверхностным антигенам HBV.

Термин "антитело", как используют в рамках изобретения, имеет его принятое в данной области значение. Предпочтительно, он относится к моноклональному антителу. Моноклональные антитела можно получать, например, способами, первоначально

описанными в Kohler and Milstein, Nature 256 (1975), 495, и Galfre, Meth. Enzymol. 73 (1981), 3, которые включают слияние клеток миеломы мыши с клетками селезенки, происходящими из иммунизированных млекопитающих, с модификациями, разработанными в данной области. Более того, антитела или их фрагменты, направленные на упомянутые выше поверхностные белки HBV, можно получать с использованием способов, которые описаны, например, в Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Получение химерных антител описано, например, в WO 89/09622. Другим источником антител для применения в соответствии с настоящим изобретением являются так называемые ксеногенные антитела. Общий принцип получения ксеногенных антител, таких как антитела человека, у мышей описан, например, в WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 и WO 96/33735. Антитела для применения в соответствии с изобретением или их соответствующую иммуноглобулиновую цепь(и) можно далее модифицировать с использованием общепринятых способов, известных в данной области, например, с использованием делеции(ий), инсерции(ий), замены(замен), вставки(вставок) и/или рекомбинации(ий) и/или любой другой модификации(ий) аминокислот, известной в данной области, либо отдельно, либо в комбинации. Способы внесения таких модификаций в последовательность ДНК или полипептида, лежащую в основе аминокислотной последовательности цепи иммуноглобулина, хорошо известны специалисту в данной области; см., например, Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989. Модификации полипептидов также включают посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование.

В следующем предпочтительном варианте осуществления указанный первый набор из шести CDR связывает эпитоп указанного первого антигена, причем указанный эпитоп расположен (а) в указанном малом поверхностном антигене HBV; или (б) в части указанного большого поверхностного антигена HBV, которая не содержится в указанном малом поверхностном антигене HBV; или (с) в части указанного большого поверхностного антигена HBV, структура которой отличается от указанного малого поверхностного антигена.

Положение (а) относится к эпитопам, присутствующим в малом поверхностном антигене HBV. Вследствие описанной выше взаимосвязи между малым, средним и большим поверхностными антигенами HBV, вся последовательность малого антигена содержится в среднем или большом антигене. Как правило, но не обязательно, трехмерный эпитоп, презентуемый малым поверхностным антигеном, также презентуется средним и/или большим поверхностными антигенами.

В соответствии с положением (б), предпочтительно, чтобы указанная часть указанного большого поверхностного антигена HBV также не содержалась в указанном среднем поверхностном антигене HBV. Что касается положения (с), понятно, что "отличие в структуре" включает эпитопы указанного большого поверхностного антигена HBV, которые содержат или состоят из последовательностей, которые являются частью последовательности указанного малого поверхностного антигена HBV, где указанные эпитопы не присутствуют на указанном малом поверхностном антигене HBV. В соответствии с положением (с), более того, предпочтительно, чтобы указанный эпитоп находился в части указанного большого поверхностного антигена HBV, структура которой отличается от указанного среднего поверхностного антигена HBV.

Указанное положение (а), т.е. что указанным первым антигеном называется малый поверхностный антиген HBV, является особенно предпочтительным в отношении всех аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения.

В соответствии с положениями (b) и (c), полипептид специфически распознает большой поверхностный антиген HBV.

В следующем предпочтительном варианте осуществления указанный поверхностный антиген, презентируемый иммунными эффекторными клетками, выбран из CD3, CD28, 4-1BB, OX40, CD16, CD56, NKG2D и NKp30/NCR3. Таким образом, настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему (a) первый набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR), скомпонованный для связывания первого антигена; и (b) (ba) второй набор из шести CDR, скомпонованный для связывания второго антигена; или (bb) лиганд, способный связываться со вторым антигеном; где (i) указанный первый антиген выбран из малого поверхностного антигена вируса гепатита В (HBV); среднего поверхностного антигена HBV; и большого поверхностного антигена HBV; и (ii) указанный второй антиген выбран из поверхностных антигенов, презентируемых иммунными эффекторными клетками, такими как натуральные киллеры (NK) и цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), где (c) указанный первый набор из шести CDR содержится в первом фрагменте scFv; и (d) (da) указанный второй набор из шести CDR содержится во втором фрагменте scFv; или (db) указанный лиганд представляет собой иммунный лиганд, способный связываться с NKG2D, такой как лиганды MICA, MICB, ULBP1-6; NKp30, такой как лиганд B7-H6, 4-1BB, такой как лиганд 4-1BB-L; или OX40, такой как лиганд OX40-L; и где указанный поверхностный антиген, презентируемый иммунными эффекторными клетками, выбран из CD3, CD28, 4-1BB, OX40, CD16, CD56, NKG2D и NKp30.

CD3 означает эписилон-цепь CD3, которая является частью CD3-Т-клеточного рецепторного комплекса. (Borst, J. et al., The delta- and epsilon-chains of the human T3/T-cell receptor complex are distinct polypeptides. *Nature*. 1984. 312: 455-458).

CD28 представляет собой главный костимулирующий рецептор Т-клеток (Lesslauer, W. et al., T90/44 (9.3 antigen). A cell surface molecule with a function in human T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 1986. 16: 1289-1296).

4-1 BB (CD137) представляет собой костимулирующий рецептор активированных Т-клеток и NK-клеток (Kwon, B.S. et al., cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989. 86: 1963-1967).

OX40 (CD134) представляет собой вторичный костимулирующий рецептор. (Arch, R. H. et al., *Mol. Cell. Biol.* 1998. 18: 558-565). 4-1 BB и OX40 являются представителями семейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF), который связывает ассоциированные с рецептором TNF лиганды и активирует ядерный фактор каппа-В.

CD16 (FcγRIIIa) представляет собой низкоаффинный Fc-рецептор, экспрессируемый NK-клетками, подгруппой активированных цитотоксических Т-клеток, а также клеточными типами миеломоноцитарной линии дифференцировки, связывающимися с Fc-доменом молекул IgG. (Lanier, L.L. et al., Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3+ T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen). *J. Exp. Med.* 1985. 162: 2089-2106).

CD56 (NCAM) представляет собой молекулу адгезии, экспрессируемую NK-клетками. (Lanier, L.L. et al., Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J. Exp. Med.* 1989. 169: 2233-2238).

NKG2D представляет собой активирующий рецептор, экспрессируемый NK-клетками (Houchins, J. et al., DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. 1991. *J. Exp. Med.* 173: 1017-1020V).

NKp30 (NCR3) представляет собой рецептор, экспрессируемый NK-клетками (Pende,

D. et al., Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. 2000. J. Exp. Med. 192: 337-346).

CD3, CD28, 4-1BB и OX40 присутствуют на поверхности CTL. Связывание полипептида по изобретению с любым из этих поверхностных антигенов вовлекает стимуляцию или костимуляцию CTL.

CD16, CD56, NKG2D, NKp30/NCR3 и 4-1 BB присутствуют на поверхности НК-клеток. Связывание полипептида по изобретению с любым из этих поверхностных антигенов вовлекает стимуляцию или костимуляцию НК-клеток.

Что касается CTL человека, предпочтительными являются CD3 и CD28. Что касается НК-клеток человека, предпочтительными являются CD16 и CD56.

Упомянутые поверхностные антигены обозначают общепризнанными названиями (также см. Kenneth Murphy, Janeway's Immunobiology, 7<sup>th</sup> edition, Garland Science; William E. Paul, Fundamental Immunology, 7<sup>th</sup> edition, Lippincott Williams & Wilkins).

В следующем предпочтительном варианте осуществления указанный полипептид дополнительно содержит область димеризации. Указанная область димеризации может обеспечить ковалентную и/или нековалентную димеризацию.

Посредством димеризации биспецифические двухвалентные антитела преобразуются в биспецифические четырехвалентные (или даже тетраспецифические четырехвалентные, если различные биспецифические антитела коэкспрессируются в продуцирующей клетке). Ожидается, что биспецифические четырехвалентные реагенты, как описано в настоящем описании, будут обладать увеличенной авидностью, сходной с общепринятыми моноспецифическими антителами, поскольку они способны связывать две молекулы антигена одного типа их N-концевой стороной и их C-концевой стороной, соответственно.

В особенно предпочтительном варианте осуществления указанная область димеризации, которая связывает два полипептида по изобретению, состоит из шарнирной области тяжелой цепи IgG или содержит остатки цистеина, ответственные за димеризацию тяжелых цепей антитела. Предпочтительно, указанная область димеризации состоит из подпоследовательности длиной 32 аминокислоты, и так называемая шарнирная область тяжелой цепи (EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGAPSVFLFPPKP, см. SEQ ID NO: 43-46) содержит два остатка цистеина (подчеркнуты в указанной выше последовательности), ответственных за димеризацию тяжелых цепей. Предпочтительно осуществляют мутацию одного остатка цистеина в шарнирной области тяжелой цепи IgG, который опосредует межмолекулярную дисульфидную связь между константными доменами тяжелой и легкой цепей IgG в природном антителе, на серин для предотвращения аберрантных дисульфидных мостиков.

Домены димеризации, пригодные для нековалентной димеризации, известны в данной области и включают лейциновые молнии.

В следующем предпочтительном варианте осуществления указанный полипептид дополнительно содержит спейсерную область, причем указанная спейсерная область предпочтительно содержит СН2-домен и СН3-домен, и указанная спейсерная область расположена между (i) указанным первым фрагментом scFv и (ii) указанным вторым фрагментом scFv или указанным рекомбинантным лигандом в аминокислотной последовательности указанного полипептида.

Преимущественной является спейсерная область, содержащая или состоящая из СН2-домена и СН3-домена, в частности, происходящего из IgG. Их способность связывать белок А обеспечивает эффективную секрецию из продуцирующих клеток и/или

последующую очистку от реагентов.

Как указанные домены CH2 и CH3 с одной стороны, так и указанная область димеризации с другой стороны, могут быть предоставлены соответствующей областью молекулы IgG, предпочтительно молекулы IgG1 или IgG2, еще более предпочтительно молекулы IgG1 или IgG2 человека (hIgG1, hIgG2). Предпочтительная подпоследовательность молекулы hIgG1, в которой представлен CH2-домен, CH3-домен и домен димеризации, представлена в последовательностях 43-46. Предпочтительно, и это применимо к упомянутым последовательностям, в часть hIgG1, в частности, указанный домен CH2, внесена мутация во множестве положений для уменьшения или устранения связывания с Fc-рецепторами (указанные полужирным шрифтом и курсивом в подпоследовательностях, приведенных ниже). Более часто, в Fc-область, в частности, в CH2-домен и/или CH3-домен, может быть внесена мутация в одном или более положениях для уменьшения или устранения связывания с Fc-рецепторами. Такая методика известна в данной области и описана, например, в Armour et al., Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. Eur. J. Immunol. 1999. 29: 2613-2624 и Lazaret al., Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. 103: 4005-4010. Это является преимущественным, поскольку запуск антителозависимой клеточно-опосредуемой цитотоксичности (ADCC) не является предпочтительным в соответствии с изобретением.

Иными словами, Fc-фрагмент антитела можно использовать для внесения спейсерной области и области димеризации. Термин "Fc-фрагмент" известен квалифицированному специалисту и определяет фрагмент IgG, который получен расщеплением папаином и содержит домены CH2 и CH3.

Между указанным первым scFv-фрагментом и указанной спейсерной областью и/или между указанной спейсерной областью и указанным вторым scFv-фрагментом присутствует/присутствуют (а) линкерная последовательность(и). Предпочтительные линкерные последовательности описаны в настоящем описании выше. Как можно видеть из предпочтительных последовательностей, содержащихся в списке последовательностей, в частности, из последовательностей SEQ ID NO: 43-46, такие линкерные последовательности могут состоять из остатков глицина или остатков глицина и серина.

На фиг.2 проиллюстрирована молекулярная архитектура предпочтительных полипептидов по изобретению, которые содержат область димеризации (шарнирная область hIgG), а также область CH2 и CH3, отделяющую два фрагмента scFv друг от друга.

Термины "CH2-домен" и "CH3-домен" имеют их принятое в данной области значение. Они относятся ко второму и третьему константным доменам тяжелых цепей антитела.

Понятно, что особенно предпочтительный вариант осуществления относится к полипептиду, содержащему

(а) первый набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR), скомпонованных для связывания первого антигена; и (b) (ba) второй набор из шести CDR, скомпонованных для связывания второго антигена; или (bb) лиганд, способный связываться со вторым антигеном; где (i) указанный первый антиген выбран из малого поверхностного антигена вируса гепатита В (HBV); среднего поверхностного антигена HBV и большого поверхностного антигена HBV; и (ii) указанный второй антиген выбран из поверхностных антигенов, презентуемых иммунными эффекторными клетками, такими как натуральные киллеры (NK) и цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), где (с) указанный первый набор из шести CDR содержится в первом scFv-фрагменте; и (d) (da)

указанный второй набор из шести CDR содержится во втором scFv-фрагменте; или (db) указанный лиганд представляет собой иммунолиганд, предпочтительно способный связываться с NKG2D, такой как лиганды MICA, MICB, ULBP1-6; NKp30, такой как лиганд B7-H6; 4-1BB, такой как лиганд 4-1BB-L; или OX40, такой как лиганд OX40-L, где указанный поверхностный антиген, презентируемый иммунными эффекторными клетками, выбран из CD3, CD28, 4-1BB, OX40, CD16, CD56, NKG2D, NKp30 и 4-1BB, и где указанный полипептид дополнительно содержит область димеризации и спейсерную область, причем указанная область димеризации и указанная спейсерная область предпочтительно являются такими, как определено выше.

В следующем предпочтительном варианте осуществления (а) указанный первый набор из шести CDR имеет последовательности SEQ ID NO: 1-6, 7-12 или 13-18; и/или (б) указанный второй набор из шести CDR имеет последовательности SEQ ID NO: 19-24, 25-30, 31-36 или 37-42.

Как общепринято в данной области и, более того, как очевидно из прилагаемого списка последовательностей, порядок CDR в каждом наборе из шести CDR, как описано выше, является следующим: CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи.

C8, 5F9, 5A19, OKT3, 9.3, A9 и NCAM29.2, как используют в списке последовательностей, обозначают антитело, из которого происходят соответствующие CDR, и относятся к предпочтительному антителу против HBs, ко второму отличающемуся антителу против HBs, к антителу против большого поверхностного антигена HBV, к антителу против CD3 человека, к антителу против CD28 человека, к антителу против CD16 человека и к антителу против CD56 человека, соответственно. "HB" обозначает малый поверхностный антиген HBV.

Особенно предпочтительным является то, что указанный полипептид содержит или состоит из любой аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 43-46 или аминокислотной последовательности, которая обладает по меньшей мере 80% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 43-46 при условии, что CDR указанной аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью, являются идентичными CDR, содержащимся в любой из SEQ ID NO: 43-46, соответственно. В SEQ ID NO: 43 последние три остатка "GNS" являются необязательными.

Предпочтительные уровни идентичности последовательностей включают по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% и по меньшей мере 99%. Средства и способы для определения идентичности последовательностей хорошо известны в данной области. Предпочтительным алгоритмом для попарного определения идентичности последовательности является Basic local alignment search tool (BLAST), как описано, например, в McGinnis and Madden (Nucleic Acid Research 32, W20-W25 (2004)).

Положение указанных CDR в данной последовательности, в настоящем случае в последовательностях SEQ ID NO: 43-46, можно определять принятыми в данной области способами, и известные принятые в данной области способы включают системы Chothia, Kabat и LeFranc/IMGT, соответственно. В отсутствие какого либо указания на обратное понятно, что CDR согласно определенным выше особенно предпочтительным вариантам осуществления представляют собой CDR, определенные выше, а именно, первый набор, имеющий последовательности SEQ ID NO: 1-6, 7-12 или 13-18, и второй набор, имеющий последовательности SEQ ID NO: 19-24, 25-30, 31-36 или 37-42. Как можно видеть из

последовательностей в прилагаемом списке последовательностей, эти конкретные последовательности CDR (подчеркнуты в последовательностях, приведенных ниже) действительно содержатся в последовательностях SEQ ID NO: 43-46.

Последовательности SEQ ID NO: 1-6 определяют CDR и SEQ ID NO: 37-40 определяют биспецифические полипептиды, способные связывать конкретный эпитоп в малом поверхностном антигене HBV. Этот эпитоп расположен в а-детерминанте, которая экспонируется на поверхности инфицированных клеток и вирионов, соответственно. Термин "а-детерминанта" используют для обозначения области в малом поверхностном антигене HBV, где расположены основные эпитопы для индукции защитного гуморального иммунного ответа. Эти CDR, а также полипептиды SEQ ID NO: 43-46, имеют то преимущество, что их можно использовать для всех серотипов HBV.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептиды, определенные выше. Предпочтительные варианты осуществления полипептидов дают начало соответствующим предпочтительным вариантам осуществления указанной нуклеиновой кислоты.

Термин "нуклеиновая кислота" имеет его принятое в данной области значение и конкретно не ограничен. Предпочтительными являются ДНК, такая как геномная ДНК или кДНК, а также РНК, такая как мРНК. Хотя это и не является предпочтительным, предусматривается применение нуклеотидных производных, которые включают 2'-дериватизированные нуклеотиды, такие как 2'-метилнуклеотиды; пептидные нуклеотиды, которые встречаются в пептидных нуклеиновых кислотах, и т.п.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится ковалентно связанному комплексу, содержащему или состоящему из первого и второго полипептида, где между указанным первым и указанным вторым полипептидами существует по меньшей мере одна ковалентная связь, предпочтительно по меньшей мере один дисульфидный мостик между остатком Cys указанного первого полипептида и остатком Cys указанного второго полипептида, причем указанные первый и второй полипептиды являются такими, как определено в соответствии с изобретением.

Предпочтительными являются две ковалентные связи между указанным первым и указанным вторым полипептидами, предпочтительно, две дисульфидных связи, как представлено на фиг.2.

Также предусматривается комплекс, содержащий или состоящий из первого и второго полипептидов, где указанный первый и указанный второй полипептиды связаны друг с другом нековалентно.

Иллюстративное изображение такого ковалентно связанного комплекса представлено на фиг.2. Предпочтительным является указанный комплекс, являющийся димером.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей или состоящей из одного или более полипептидов по изобретению и/или одного или более комплексов по изобретению при условии, что по меньшей мере два полипептида содержатся в указанной композиции, причем эти два полипептида отличаются друг от друга в отношении первого антигена и/или второго антигена, с которыми они связываются.

В предпочтительном варианте осуществления указанного четвертого аспекта указанные два полипептида представляют собой (а) (i) полипептид, связывающийся с малым или большим поверхностными антигенами HBV и CD3; и (ii) полипептид, связывающийся с малым или большим поверхностными антигенами HBV и CD28; или (b) (i) полипептид, связывающийся с малым или большим поверхностными антигенами HBV и CD16; и (ii) полипептид, связывающийся с малым или большим поверхностными

антигенами HBV и CD56.

Как альтернатива (a), так и альтернатива (b), в частности, в той степени, в которой они относятся к полипептидам, связывающимся с малым поверхностным антигеном HBV этого предпочтительного варианта осуществления, обеспечивают неожиданно высокие уровни элиминации вплоть до 95% по сравнению с отрицательным контролем. Ожидается, что это обеспечит полное устранение инфицированных HBV клеток или положительных по антигену HBV опухолевых клеток, особенно после многократного применения в ситуации *in vivo*.

Было обнаружено, что комбинированное применение биспецифических молекул, связывающихся с двумя различными маркерами CTL или маркерами NK, обеспечивает синергические эффекты. На фиг.3 и 4В показано сравнение специфического лизиса клеток-мишеней при введении биспецифических конструкций.

В особенно предпочтительном варианте осуществления указанные два полипептиды содержат или состоят из последовательностей (a) SEQ ID NO: 43 и 44; или (b) SEQ ID NO: 45 и 46.

Каждая из последовательностей SEQ ID NO: 43-46 позволяет образование двух дисульфидных мостиков, когда образуется гомодимер. Вместе с тем, предусматривается преднамеренное образование также и гетеродимеров. Примером гетеродимера является ковалентно связанный комплекс двух полипептидов по настоящему изобретению, где первый полипептид связывается с поверхностным антигеном HBV и первым маркером, презентруемым иммунной эффекторной клеткой, и второй полипептид связывается с поверхностным антигеном HBV и вторым маркером иммунной эффекторной клетки. Два маркера иммунной эффекторной клетки могут представлять собой, например, CD3 и CD28, или, альтернативно, CD16 и CD56.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей или состоящей из одного или более полипептидов по изобретению, одного или более комплексов по изобретению и/или одной или более композиций по изобретению.

Фармацевтическая композиция, кроме того, может содержать фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты и/или разбавители. Примеры подходящих фармацевтических носителей, эксципиентов и/или разбавителей хорошо известны в данной области и включают фосфатно-солевые буферы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих веществ, стерильные растворы и т.д. Композиции, содержащие такие носители, можно составлять хорошо известными общепринятыми способами. Эти фармацевтические композиции можно вводить индивидууму в подходящей дозе. Введение подходящих композиций может осуществляться различными путями, например, посредством внутривенного, подкожного или перорального введения, которые являются предпочтительными вариантами, и, более того, посредством внутрибрюшинного, внутримышечного, местного, внутрикожного, интраназального или интробронхиального введения. Составы для перорального введения включают таблетки и сиропы. Особенно предпочтительно, чтобы указанное введение проводили посредством инъекции. Композиции также можно вводить прямо в заданную область, например, путем биолистической доставки во внешнюю или внутреннюю заданную область. Режим дозирования определяется лечащим врачом и клиническими факторами. Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от множества факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное вводимое соединение, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарственные средства,



вводимые одновременно. Белковое фармацевтически активное вещество может присутствовать в количествах от 1 нг до 10 мг/кг массы тела на дозу; однако предусматриваются дозы ниже или выше этого иллюстративного диапазона, особенно учитывая вышеупомянутые факторы. Если режим представляет собой непрерывную инфузию, количество также должно находиться в диапазоне от 1 нг до 10 мг на килограмм массы тела в минуту.

Особенно предпочтительным является внутривенное введение.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к одному или более полипептидам по любому из изобретений, к одному или более комплексам по изобретению и/или к одной или более композициям по любому из изобретений для применения в способе лечения или предупреждения инфекции HBV и/или состояния, вызываемого указанной инфекцией HBV, причем указанное состояние, вызываемое указанной инфекцией HBV, выбрано из цирроза печени, печеночно-клеточной карциномы и рака печени, причем указанный рак печени характеризуется одним или более поверхностными антигенами HBV. Предпочтительно, чтобы указанная печеночно-клеточная карцинома характеризовалась экспрессией одного или более из определенных выше поверхностных антигенов HBV.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения инфекции HBV и/или состояния, вызываемого указанной инфекцией HBV, причем указанное состояние, вызываемое инфекцией HBV, выбрано из цирроза печени и печеночно-клеточной карциномы, причем указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества или профилактического количества, соответственно, одного или более полипептидов по изобретению, одного или более комплексов по изобретению и/или одной или более композиций по изобретению пациенту, нуждающемуся в этом.

Предпочтительно, чтобы указанная фармацевтическая композиция, указанные полипептид/комплекс/композиция для применения в способе лечения и указанный способ лечения, указанные полипептиды, комплексы и/или композиции были единственными фармацевтически активными средствами, содержащимися или используемыми.

Вместе с тем, предусматривается преднамеренное включение одного или более дополнительных фармацевтически активных средств в комбинированную терапию. Такие дополнительные фармацевтически активные средства могут быть выбраны из интерферонов или других иммуномодуляторов (например, таких как интерферон-альфа 2a или 2b, интерферон-лямбда), противовирусных средств прямого действия, таких как аналоги нуклеоз(т)идов (например, такие как ламивудин (Epivir-HBV, Zeffix или Heptodin), адефовир дипивоксил (Hepsera, Preveon), энтекавир (Baraclude, Entaliv), телбувидин (Tyzeka, Sebivo), тенофовир (Viread)), ингибиторы проникновения (например, такие как Myrcludex-B), другие противовирусные средства или цитокины, такие как интерлейкин-2.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к способу уничтожения клеток, инфицированных HBV, *in vitro*, причем указанный способ включает культивирование указанных клеток, инфицированных HBV, с (i) иммунными эффекторными клетками и (ii) одним или более полипептидами по изобретению, одним или более комплексами по изобретению и/или одной или более композициями по изобретению.

В предпочтительном варианте осуществления способа *in vitro* указанные иммунные эффекторные клетки (i) содержатся в моноклеарных клетках периферической крови;

или (ii) представляют собой или содержат НК-клетки и/или CTL.

В следующем аспекте, настоящее изобретение относится к иммунной эффекторной клетке *in vitro* или *ex vivo*, которая имеет полипептид по изобретению или комплекс в соответствии с изобретением, связанный с поверхностным антигеном указанной

5 иммунной эффекторной клетки. Предпочтительные иммунные эффекторные клетки и предпочтительные поверхностные антигены, презентруемые иммунными эффекторными клетками, являются такими, как определено выше. Такая иммунная эффекторная клетка является пригодной для введения пациенту, страдающему инфекцией HBV, циррозом печени или печеночно-клеточной карциномой. Таким образом, также

10 предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая или состоящая из иммунной эффекторной клетки, которая имеет связанный с ее поверхностным антигеном полипептид по изобретению или комплекс в соответствии с изобретением. Также предусматривается иммунная эффекторная клетка, которая имеет связанный с ее

15 поверхностным антигеном полипептид по изобретению или комплекс в соответствии с изобретением для применения в способе лечения или предупреждения инфекции HBV, цирроза печени или печеночно-клеточной карциномы.

Последовательности, описанные в настоящей заявке

20

25

30

35

40

45

SEQ ID NO 1

C8 HC CDR1

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala

5

SEQ ID NO 2

C8 HC CDR2

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr

10

SEQ ID NO 3

C8 HC CDR3

Ala Lys Pro Pro Gly Arg Gln Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Ile Tyr Tyr Phe Pro Leu Gly Asn

15

SEQ ID NO 4

C8 LC CDR1

Asn Ile Gly Ser Lys Ser

20

SEQ ID NO 5

C8 LC CDR2

Asp Asp Ser

25

SEQ ID NO 6

C8 LC CDR3

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Leu Val Val

30

SEQ ID NO 7

5F9 HC CDR1

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala

35

SEQ ID NO 8

5F9 HC CDR2

Ile Asn Ser Asp Gly Arg Ser Thr

40

SEQ ID NO 9

5F9 HC CDR3

45

Ala Arg Thr Phe Tyr Ala Asp Tyr

5

10

15

20

25

30

35

40

45

SEQ ID NO 10  
5F9 LC CDR1  
Gln Asn Val Asp Thr Thr

5

SEQ ID NO 11  
5F9 LC CDR2  
Trp Ala Ser

10

SEQ ID NO 12  
5F9 LC CDR3  
Gln Gln Tyr Ser Ile Phe Pro Tyr Thr

15

SEQ ID NO 13  
5A19 HC CDR1  
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

20

SEQ ID NO 14  
5A19 HC CDR2  
Val Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala

25

SEQ ID NO 15  
5A19 HC CDR3  
Ala Ser Phe Asn Trp Asp Val Ala Tyr

30

SEQ ID NO 16  
5A19 LC CDR1  
Gln Ser Leu Leu Asn Thr Arg Thr Arg Lys Ser Tyr

35

SEQ ID NO 17  
5A19 LC CDR2  
Trp Ala Ser

40

SEQ ID NO 18  
5A19 LC CDR3

45

Lys Gln Ser Tyr Ser Leu Tyr Thr

5

10

15

20

25

30

35

40

45

SEQ ID NO 19  
OKT3 HC CDR1  
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr

5

SEQ ID NO 20  
OKT3 HC CDR2  
Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr

10

SEQ ID NO 21  
OKT3 HC CDR3  
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr

15

SEQ ID NO 22  
OKT3 LC CDR1  
Ser Ser Val Ser Tyr

20

SEQ ID NO 23  
OKT3 LC CDR2  
Asp Thr Ser

25

SEQ ID NO 24  
OKT3 LC CDR3  
Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr

30

SEQ ID NO 25  
9.3 HC CDR1  
Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Gly

35

SEQ ID NO 26  
9.3 HC CDR2  
Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr

40

SEQ ID NO 27  
9.3 HC CDR3

45

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr

SEQ ID NO 28

9.3 LC CDR1

Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu

SEQ ID NO 29

9.3 LC CDR2

Ala Ala Ser

SEQ ID NO 30

9.3 LC CDR3

Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr

SEQ ID NO 31

A9 HC CDR1

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp

SEQ ID NO 32

A9 HC CDR2

Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr

SEQ ID NO 33

A9 HC CDR3

Ala Arg Ser Ala Ser Trp Tyr Phe Asp Val

SEQ ID NO 34

A9 LC CDR1

Thr Gly Thr Val Thr Thr Ser Asn Tyr

SEQ ID NO 35

A9 LC CDR2

His Thr Asn

SEQ ID NO 36

A9 LC CDR3



Ala Leu Trp Tyr Asn Asn His Trp Val

SEQ ID NO 37

NCAM29.2 HC CDR1

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly

SEQ ID NO 38

NCAM29.2 HC CDR2

Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Ala Ile

SEQ ID NO 39

NCAM29.2 HC CDR3

Val Arg Gly Arg Arg Leu Gly Glu Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

SEQ ID NO 40

NCAM29.2 LC CDR1

Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr

SEQ ID NO 41

NCAM29.2 LC CDR2

Trp Ala Ser

SEQ ID NO 42

NCAM29.2 LC CDR3

Gln Gln Tyr Ser Ser Trp Thr

SEQ ID NO 43

C8-hlgG1Fc<sub>mut</sub>-OKT3

MDFEVQIFSFLLISASVIMSRMAEVQLVESGGGLLQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQA  
 PGKGLEWVSSISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPPGRQ  
 EYYGSSIIYFPLGNWGQGT LVT VSSASTKGPKLEEGEFSEARVQSALTQPASVSVAPGQTARI  
 TCGGN NIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVDSDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEA  
 DYYCQVWDSSSDLVVFGGGTKLTVLGNSGGGSGGGGSGGGGSASEPKS SDKTHTCPPCPAP  
 AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKGLASSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK  
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDPGW SHPQFEKSRGGGQVQLQQSGAELARPGASVKMSC

KASGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSS  
 LTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGNSGGGGSGGGGSGGGGSASQIVLTQSPA  
 IMSASPGKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKSLASGVPAPFRGSGSGTSYSL  
 TISGMEAEDAATYYCQOWSSNPFTFGSGTKLEINGNS

## SEQ ID NO 44

C8- hlgG1Fc<sub>mut</sub>-9.3

MDFEVQIFSFLLISASVIMSRMAEVQLVESGGGLLQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQA  
 PGKGLEWVSSIISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPPGRQ  
 EYYGSSIIYFPLGNWGQGTTLTVSSASTKGPKLEEGERFSEARVQSALTQPASVSVAPGQTARI  
 TCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEA  
 DYYCQVWDSSSDLVVFGGGTKLTVLGNSSGGGGSGGGGSGGGGSASEPKS**SDK**THTC**PPCPAP**  
**AAG**PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNK**GLASSI**EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK  
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDPGWSH**PF**EKSSGGGGQVQLQESGPGLVTPSQSLITC  
 TVSGFSLSDYGVHWVRQSPGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKSQVFLKMNSL  
 QADDTAVYYCARDKGYSYYY**SM**DYWGQGTTVTVSSRGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPASLAV  
 SLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQWYQQKPGQPPKLLIFAA**SN**VESGVPARFSGSGSGTNFS  
 LNIHPVDEDDVAMYFCQ**QSR**KVPYTFGGG**TKLEIKR**

## SEQ ID NO 45

C8- hlgG1Fc<sub>mut</sub>-A9

MDFEVQIFSFLLISASVIMSRMAEVQLVESGGGLLQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQA  
 PGKGLEWVSSIISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPPGRQ  
 EYYGSSIIYFPLGNWGQGTTLTVSSASTKGPKLEEGERFSEARVQSALTQPASVSVAPGQTARI  
 TCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEA  
 DYYCQVWDSSSDLVVFGGGTKLTVLGNSSGGGGSGGGGSGGGGSASEPKS**SDK**THTC**PPCPAP**  
**AAG**PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNK**GLASSI**EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK  
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDPGWSH**PF**EKSSGGGGQVQLQSGAELVRPGTSVKISC  
 KASGYTFTNYWLGWVKQRPBGHGLEWIGDIYPGGGYTNYNEKFKGKATVTADTSSRTAYVQVRS  
 LTSEDSAVYFCARSASWYFDVWGAGTTVTVSSGNSGGGGSGGGGSGGGGSASQAVVTQESALT  
 TSPGETVTLTCSRNTGT**VTTS**NYANWVQEKPDHLFTGLIGHT**TNN**RAPGVPARFSGSLIGDKAA  
 LTITGAQTEDEAIYFCALWYNNHWVFGGGTKLTVL

## SEQ ID NO 46

C8- hlgG1Fc<sub>mut</sub>-NCAM29.2

MDFEVQIFSFLLISASVIMSRMAEVQLVESGGGLLQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQA  
 PGKGLEWVSSISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPPGRO  
 EYYGSSIIYFPLGNWQGTLVTVSSASTKGPKLEEGEFSEARVQSALTQPASVSVAPGQTARI  
 TCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEA  
 DYYCQVWDSSSDLVVFGGGTKLTVLGNSSGGGSGGGGSGGGGSASEPKS**SD**KTHT**C**PP**C**PAP**P**  
 AAGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNK**GLASS**IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK  
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDPGWSH**PQFEKSSGGGDVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCA**  
 ASGFTFSSFGMHWVRQAPEKGLEWVAY**ISSGSYAI**YYADTVKGRFTISRDN PENTLFLQMTSL  
 RSEDSAMYYCVRGRRLGEGYAMDYWGQGTSTVTVSSGNSSGGGSGGGGSGGGGSASDIVMSQSP  
 SSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW**AST**TRKSGVPDRFTGS  
 GSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQ**QYSSWTF**GGGGTKLEIKR

## SEQ ID NO 47

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

## SEQ ID NO 48

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val

## SEQ ID NO 49

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

Изобретение иллюстрируется чертежами.

Фиг.1:

scFv-фрагменты получают путем слияния двух переменных доменов. Слияние вовлекает применение гибкого пептидного линкера, который не нарушает или по существу не нарушает структуру каждого переменного домена.

Фиг.2:

Димеризация двух полипептидов по изобретению путем образования дисульфидных связей. Каждый полипептид содержит биспецифическое двухвалентное антитело. Природная димеризация антител в эндоплазматической сети продуцирующих клеток может приводить к образованию биспецифического четырехвалентного антитела, или три- или тетраспецифического четырехвалентного антитела, если два биспецифических двухвалентных антитела коэкспрессируются (не представлено).

Фиг.3:

Сравнение специфической элиминации продуцирующих поверхностный антиген HBV клеток-мишеней гепатомы после введения единичных биспецифических антител и синергические эффекты одновременного введения двух CTL-специфических или двух специфичных к NK-клеткам биспецифических антител. Использован анализ Blue Cell Viability Assay CellTiter.

Фиг.4:

А) Секреция цитокинов как признак активации иммунных эффекторных клеток в присутствии биспецифических антител по настоящему изобретению. Инфицированные HBV клетки НераRG сокультивировали с РВМС в присутствии или в отсутствие указанных биспецифических антител.

5 В) Специфическая элиминация инфицированных HBV клеток-мишеней в сокультуре с иммунными клетками и биспецифическими антителами.

Фиг.5:

Вариабельность клеток-мишеней, сокультивируемых с РВМС в присутствии индивидуальных реактивных в отношении HBs биспецифических антител. Единичные биспецифические антитела опосредуют лизис клеток-мишеней. А, С, Е: Эффект стимуляции посредством  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD3 (А),  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD28 (С) или суммарный (Е). В, D, F: Эффект стимуляции  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD3 [Fc $\Delta$ ADCC] (В),  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD28 [Fc $\Delta$ ADCC] (D) или суммарный (F). Стрелка указывает на добавление РВМС и биспецифических антител. Кривые с точками соответствуют трансфицированным HBs клеткам NuH7-S, кривые с ромбами соответствуют родительским клеткам гепатомы NuH7. Используют анализ цитотоксичности в реальном времени xCELLigence. Время нормализации клеточного индекса: 0 ч.

Фиг.6:

Жизнеспособность клеток-мишеней, сокультивируемых с РВМС в присутствии реактивных к HBs биспецифических антител. Комбинация биспецифических антител опосредует массивное уничтожение клеток-мишеней. А: Эффект стимуляции  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD3 и  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD28. В: Эффект стимуляции  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD3 [Fc $\Delta$ ADCC] и  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD28 [Fc $\Delta$ ADCC]. С, D: Эффект индивидуальных биспецифических антител по сравнению с комбинациями. Стрелка указывает на добавление РВМС и биспецифических антител. Кривые с точками соответствуют клеткам NuH7-S, кривые с ромбами соответствуют клеткам NuH7. Время нормализации клеточного индекса: 0 ч.

Фиг.7:

Жизнеспособность клеток-мишеней, сокультивируемых с РВМС, в присутствии различных концентраций биспецифических антител. Смеси 50 мкл/50 мкл содержащих антитело супернатантов  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD3/ $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD28 (А), или  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD3 [Fc $\Delta$ ADCC]/ $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD28 [Fc $\Delta$ ADCC] (В), индуцировали лизис клеток-мишеней раньше, чем смеси 25 мкл/25 мкл, что указывает на дозозависимые эффекты. Стрелками указано добавление РВМС и биспецифических антител. Кривые с точками соответствуют клеткам NuH7-S, кривые с ромбами соответствуют клеткам NuH7. Время нормализации клеточного индекса: 0 ч.

Фиг.8:

Жизнеспособность клеток-мишеней, сокультивируемых с различными количествами РВМС в присутствии смеси  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD3 и  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD28.  $2 \times 10^5$  РВМС опосредуют значительно более раннюю элиминацию клеток NuH7-S, чем  $1 \times 10^5$  РВМС. Стрелками указано добавление РВМС и биспецифических антител. Кривые с точками соответствуют клеткам NuH7-S, кривые с ромбами соответствуют клеткам NuH7. Время нормализации клеточного индекса: 0 ч.

Фиг.9:

Жизнеспособность клеток-мишеней, сокультивируемых с РВМС в присутствии смесей  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD3/ $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD28 в течение различных периодов времени. Супернатанты, содержавшие биспецифические антитела, извлекали после указанных периодов стимуляции. Стимуляция только в течение 4 ч привела к небольшому снижению жизнеспособности клеток-мишеней (конечная жизнеспособность 78,5%). Стимуляция

РВМС биспецифическими антителами в течение 8 ч или дольше индуцировала элиминацию клеток-мишеней. После стимуляции в течение 8 ч и 12 ч уничтожение клеток-мишеней было замедленным по сравнению со стимуляцией в течение 24 ч или 48 ч, что указывает на непрерывную активацию и перенацеливание эффекторных клеток. Однако конечная жизнеспособность NuH7-S через 48 ч была сравнимой: стимуляция в течение 8 ч: 14,7%; стимуляция в течение 12 ч: 11,7%, стимуляция в течение 24 ч: 5,1%, стимуляция в течение 48 ч: 3,2%. Стрелка указывает на добавление РВМС и биспецифических конструкций. Представлена кинетика жизнеспособности для клеток NuH7-S. Время нормализации клеточного индекса: 0 ч.

Фиг.10:

Секреция IL-2, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  из РВМС после сокультивирования с клетками NuH7-S/NuH7 в присутствии  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD3/  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD28 в различные моменты времени. А: Концентрация IL-2 возрастала с течением времени и достигала плато приблизительно через 24 ч с концентрацией приблизительно 1550 пг/мл. В: Секреция IFN- $\gamma$  начиналась между 8 ч и 12 ч и возрастала вплоть до 12000 пг/мл (48 ч). С: Продукция TNF- $\alpha$  поддавалась обнаружению уже через 4 ч, возрастала непрерывно, достигала пика через 24 ч (1700 пг/мл) и снижалась до 1400 пг/мл после 48 ч. Можно было обнаружить высокую фоновую секрецию TNF- $\alpha$  в отсутствие HBs (клетки NuH7) причем наивысшая концентрация снижалась через 4 ч (~70 пг/мл) до 9 пг/мл после сокультивирования в течение 48 ч.

Фиг.11:

Окрашивание LAMP-1 после сокультивирования РВМС с клетками NuH7-S/NuH7 в присутствии биспецифических антител. Поверхностная экспрессия маркера эндосомальной дегрануляции LAMP-1 обнаруживается на CD4<sup>+</sup> (А, В) и CD8<sup>+</sup> (С, D) Т-клетках после сокультивирования с клетками NuH7-S (черная линия) или NuH7 (серая линия) в присутствии либо  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD3/  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD28 (А, С), либо  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD3 [Fc $\Delta$ ADCC]/  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD28 [Fc $\Delta$ ADCC] (В, D).

Фиг.12:

FACS-анализ РВМС, сокультивируемых с клетками NuH7-S или NuH7 в присутствии  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD3/  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD28 через 8 ч, 12 ч и 24 ч. А, В; Проценты IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-2<sup>+</sup>/TNF $\alpha$ <sup>+</sup>/CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клеток (А) или IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-2<sup>+</sup>/TNF $\alpha$ <sup>+</sup>/CD154<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (В) Т-клеток. С, D: Окна булевых комбинаций для IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-2<sup>+</sup> и/или TNF $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (С), или IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-2<sup>+</sup> и/или TNF $\alpha$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (D) Т-клеток.

Фиг.13:

FACS-анализ РВМС, сокультивируемых с иммобилизованным или растворимым HBsAg в присутствии  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD3 [Fc $\Delta$ ADCC]/  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD28 [Fc $\Delta$ ADCC] после 24 ч и 48 ч. А, В: Проценты IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-2<sup>+</sup>/TNF $\alpha$ <sup>+</sup>/CD154<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клеток (А) или IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-2<sup>+</sup>/TNF $\alpha$ <sup>+</sup>/CD154<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (В) Т-клеток. С, D: Окна булевых комбинаций для IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-2<sup>+</sup> и/или TNF $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (С), или IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-2<sup>+</sup> и/или TNF $\alpha$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (D) Т-клеток.

Фиг.14:

HBsAg в супернатанте клеток NuH7-S (110.8 S/CO), клеток HepG2.2.15 (41.7 S/CO) и инфицированных HBV клеток HeparG (16.5 S/CO).

Фиг.15:

Жизнеспособность инфицированных HBV/неинфицированных клеток HeparG, сокультивированных с РВМС, в присутствии биспецифических антител.  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD3 (А) и  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD3/  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD28 (В) опосредуют значительный лизис клеток-мишеней.

Конечная жизнеспособность необработанных клеток составляет 65,9% (HBV+) и 62,9% (HBV-). Стрелками указано добавление РВМС и биспецифических конструкций. Кривые с точками соответствуют инфицированным HBV клеткам НераRG, кривые с ромбами соответствуют неинфицированным клеткам НераRG. Время нормализации клеточного

индекса в анализе xCELLigence: 0 ч.

Фиг.16:

Уменьшение размера опухоли у животных, которых лечили биспецифическими антителами. Мышей, имеющих положительные по HBV подкожные опухоли HepG2.2.15, обрабатывали РВМС человека и смесью биспецифических антител  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD3 и  $\alpha$ HBs  $\times$   $\alpha$ CD28 в течение четырех последовательных суток. Мышей умерщвляли и размер опухоли анализировали.

Изобретение иллюстрируется примерами.

Пример 1

Материалы и способы для примера 2

Клонирование и продуцирование биспецифических антител

Комплементарные ДНК, кодирующие переменные тяжелые и переменные легкие цепи антитела против CD3 (ОКТ3), антитела против CD28 (9.3), антитела против CD16 (A9) и антитела против CD56 (NCAM29.2) получали посредством амплификации способом ПЦР обратнотранскрибированных мРНК из соответствующей гибридомы с использованием набора праймеров, охватывающих все подтипы VH и Vk/VL. Продукты ПЦР лигировали в pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Life Technologies) и секвенировали. Антитело против HBsAg scFv C8 было предоставлено в кодон-оптимизированной форме в плазмиде pMP71-C8. С использованием праймеров, содержащих соответствующие участки рестрикции на 5' и 3'-фланкирующих областях, кДНК переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи, кодирующие упомянутые выше антитела, собирали с помощью глицин-серинового линкера в scFv. scFv ОКТ3, 9.3, A9 и NCAM29.2 (с N-концевым удлинением посредством (Gly)<sub>3-4</sub>) клонировали на 3'-конце кДНК, присутствующей в pBluescript KS II+ (Stratagene), которая кодирует Fc-домен (шарнирная область, CH2, CH3) IgG1 человека, которая удлинена глицин-сериновым линкером GlyAsnSer(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>AlaSer на 5'-конце, и последовательность StrepTag (WSHPQFEK) и во второй серии конструкций дополнительный глицин-сериновый линкер (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> на 3'-конце. Кодирующую последовательность C8 scFv клонировали на 5'-конце упомянутого 5'-глицин-серинового линкера. Полную последовательность scFv-линкер-hIgG1Fc-линкер-scFv субклонировали в экспрессирующий вектор млекопитающих pcDNA3.1(-) (Invitrogen). Плазмидную ДНК Maxi-prep использовали для трансфекции клеток НЕК293 с использованием реагента для трансфекции reagent (PepLab). Стабильные трансфектанты отбирали с использованием 0,8-1,0 мг/мл G418 и увеличивали в количестве. Супернатанты трансфектантов НЕК собирали и анализировали способом ELISA в отношении концентрации секретируемых биспецифических антител и вестерн-блоттингом в отношении целостности секретируемых антител с использованием меченных пероксидазой антител козы, специфичных к IgG-Fc человека.

Условия культивирования клеток и инфицирование HBV

Клетки гепатомы HuH7 (Nakabayashi, et al. 1982. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. Cancer Res. 42: 3858-3863) и клетки НЕК293 поддерживали в модифицированной способном Дульбекко среде Игла (DMEM), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS), пенициллином (100 Е/мл), стрептомицином (100 мкг/мл) и L-глутамином (2 ммоль/л) (все от GIBCO, Life

Technologies).

Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) выделяли центрифугированием в градиенте плотности из гепаринизированной цельной крови с использованием среды для разделения лимфоцитов LSM 1077 (PAA). 25 мл крови наслаивали на 13 мл LSM 1077. После центрифугирования при 2000 об/мин в течение 20 мин (без торможения) при комнатной температуре РВМС собирали и культивировали в среде RPMI 1640, дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS), пенициллином (100 Е/мл), стрептомицином (100 мкг/мл) и L-глутамином (2 ммоль/л) (все от GIBCO). После стадии покоя в течение ночи РВМС или отсортированные NK-клетки использовали для экспериментов по сокультивированию.

Клетки НераRG поддерживали в среде Williams E Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Германия), дополненной L-глутамином (5 ммоль/л), глюкозой (0,06% [масс./об.]), HEPES (23 ммоль/л, pH7,4), гентамицином (50 (мкг/мл), пенициллином (501 Е/мл), стрептомицином (50 пг/мл), инозином (37 пмоль/л), гидрокортизоном (4,8 пг/мл) и инсулином (1 мкг/мл). Перед инфицированием клеткам НераRG позволяли дифференцироваться в течение 4 недель с использованием среды для дифференцировки (среда Williams E Medium (как описано выше), дополненной DMSO (1,75%). Клетки НераRG инфицировали с использованием исходных культур HBV при конечной m.o.i. 200 и PEG (5%) в среде для дифференцировки. Инфекционный инокулят удаляли после инкубации в течение ночи, и заменяли средой для дифференцировки, и культивировали в течение 6 суток. Для сокультур с перенацеленными Т-клетками авторы настоящего изобретения заменили среду для дифференцировки на свободную от гидрокортизона среду за 2 суток до начала сокультивирования, чтобы избежать иммуносупрессии, опосредуемой гидрокортизоном.

Трансфекция плазмидами, кодирующими поверхностный антиген HBV

Клетки NuH-7 трансфицировали плазмидами, кодирующими различные поверхностные антигены, с использованием реагента для трансфекции FuGene (Promega). В 8 лунок 96-луночного планшета добавляли 3 мкл FuGENE, 1 мкг плазмидной ДНК добавляли к 100 мкл OptiMEM (Gibco). Раствор для трансфекции инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре, чтобы FuGENE связался с плазмидной ДНК. Использовали конечный объем 100 мкл на лунку после добавления дополнительного OptiMEM и проводили инкубацию в течение по меньшей мере 24 ч.

Магнитно-активируемая клеточная сортировка (MACS) для NK-клеток

Клетки NK выделяли из РВМС с использованием набора для выделения CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NK-клеток человека (Miltenyi). На первой стадии отрицательной селекции все клетки, не являющиеся NK-клетками, удаляли с использованием моноклональных антител, направленных против антигенов, не экспрессируемых на поверхности NK-клеток. На второй стадии положительной селекции NK-клетки выделяли с использованием моноклональных антител против CD16, конъюгированных с микрогранулами из оксида железа, и удерживали внутри магнитного поля. После выделения NK-клетки культивировали в среде RPMI-1640, как описано выше.

Сокультура HBV-положительных клеток-мишеней и перенацеленных эффекторных клеток

Клетки-мишени культивировали в 96-луночном планшете при смыкании монослоя. Добавляли  $1 \times 10^5$  эффекторных клеток в объеме среды 100 мкл на лунку. Добавляли 100 мкл на лунку супернатантов НЕК, содержавших биспецифические антитела. Для определения синергических эффектов добавляли 50 мкл супернатанта каждого биспецифического антитела на лунку. Необработанные клетки-мишени, инкубированные

с 200 мкл среды или с эффекторными клетками отдельно или с биспецифическими антителами отдельно служили в качестве отрицательного контроля.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) активации эффекторных клеток

Секрецию цитокинов вследствие активации эффекторных клеток выявляли с помощью  
5 ELISA. Использовали ELISA MAX™ для IFN- $\gamma$  человека (BioLegend). Поглощение при 450 нм выявляли с использованием программы Magellan6 и InfiniteF200 (Tecan).

Анализ жизнеспособности клеток-мишеней

Жизнеспособность клеток-мишеней после сокультивирования определяли с использованием анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Blue (Promega). Этот анализ  
10 основан на способности живых клеток конвертировать окислительно-восстановительный краситель (резазурин) во флуоресцентный конечный продукт (резорурфин) вследствие метаболической активности. Нежизнеспособные клетки быстро утрачивают их метаболическую способность и, таким образом, не генерируют флуоресцентный сигнал. После удаления супернатанта к сокультурам добавляли 100 мкл на лунку бесцветной  
15 DMEM, содержащей 20% реагент CellTiter-Blue и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. Сигнал флуоресценции регистрировали при 560 нм с использованием InfiniteF200 (Tecan).

Пример 2

Результаты

В первой линии экспериментов авторы настоящего изобретения оценивали активность  
20 биспецифических конструкций антител, направленных на поверхностные антигены CTL CD3 и CD28 и на поверхностные антигены NK-клеток CD16 и CD56. Авторы настоящего изобретения использовали трансфицированные плазмидой клеточные линии гепатомы, продуцирующие поверхностные антигены HBV. После налаживания экспрессии белка  
25 HBV эти клетки-мишени сокультивировали вместе с иммунными эффекторными клетками, а именно РВМС и выделенными NK-клетками, и биспецифическими конструкциями антител. РВМС содержат приблизительно 70% Т-клеток, но только 7% NK-клеток. Таким образом, авторы настоящего изобретения проводили магнитное  
30 выделение CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> NK-клеток. В качестве отрицательных контролей авторы настоящего изобретения анализировали сокультуры с HBV-отрицательными клетками-мишенями, преинкубированные с супернатантами, содержащими HBV и субвирусные частицы. Этот контроль использовали для исключения активации эффекторных клеток вследствие неспецифического связывания частиц HBV на поверхности HBV-  
35 отрицательных клеток-мишеней. Более того, авторы настоящего изобретения сокультивировали HBV-положительные клетки-мишени с иммунными эффекторными клетками в отсутствие биспецифических конструкций для оценки неспецифической фоновой цитотоксичности. Для исключения цитотоксического эффекта биспецифических конструкций авторы настоящего изобретения получили культуры HBV-положительных  
40 клеток-мишеней без иммунных эффекторных клеток в присутствии биспецифических конструкций.

Эти эксперименты продемонстрировали специфическую активацию CTL при сокультивировании в присутствии CD3- или CD28-специфических конструкций, как определяют по секреции провоспалительного цитокина интерферона-гамма (IFN- $\gamma$ ),  
45 составляющей вплоть до 7000 пг/мл. Этот эффект далее усиливался совместным введением CD3- и CD28-специфических конструкций, демонстрирующих синергический эффект.

Более того, биспецифические конструкции опосредовали специфическую цитотоксическую элиминацию HBsAg-продуцирующих клеточных линий гепатомы



HuH7 (фиг.3), составляющую вплоть до 90% снижения жизнеспособности клеток-мишеней по сравнению с контролями. Этот цитотоксический ответ наблюдали для сокультур РВМС и HBV-положительных клеток-мишеней вместе с биспецифическими конструкциями, направленными против CD3 и CD28, а также для выделенных NK-клеток с конструкциями, направленными против CD16 и CD56. Совместное введение конструкций, специфичных к CTL и NK-клеткам, далее увеличивало цитотоксический эффект синергично до уровней элиминации выше 95%. Авторы настоящего изобретения наблюдали неспецифическую фоновую цитотоксичность от 15% до 40% для CTL и NK-клеток, соответственно.

Во втором раунде экспериментов авторы настоящего изобретения использовали инфицированные HBV клетки гепатомы НераRG. Эта клеточная линия позволяет инфицирование HBV после дифференцировки в течение четырех недель и отражает естественную ситуацию для HBV-инфицированных тканей. Как правило, уровни инфицирования для клеток НераRG никогда не достигают 100%, и эта смесь инфицированных и неинфицированных клеток имитирует ситуацию у HBV-инфицированного индивидуума при противовирусной терапии, имеющего как инфицированные, так и неинфицированные клетки, в присутствии свободных внеклеточных вирусных частиц.

В сокультурах иммунных эффекторных клеток и совместно введенных биспецифических конструкций HBV-инфицированные клетки НераRG опосредовали эффективную активацию как CTL, так и NK-клеток с впечатляющими уровнями IFN- $\gamma$  вплоть до 60000 пг/мл (фиг.4А). В этом эксперименте авторы настоящего изобретения не выделяли или не увеличивали в количестве NK-клетки перед сокультивированием.

Более того, биспецифические конструкции антител приводили к цитотоксическому ответу активированных иммунных эффекторных клеток, что приводило к специфической элиминации HBV-инфицированных клеток-мишеней (фиг.4В). Авторы настоящего изобретения наблюдали уровни элиминации от 50% до 70% для NK-клеток и CTL, соответственно. В этих экспериментах неспецифическая фоновая цитотоксичность отсутствовала.

### Пример 3

#### Способы для примера 4

Для анализа терапевтического потенциала биспецифических конструкций антител в отношении успешного перенацеливания Т-клеток на HBV-положительные клетки проводили эксперименты по сокультивированию *in vitro* и проводили их детальный анализ. Авторы настоящего изобретения использовали биспецифические конструкции антител, содержащие одноцепочечные связывающие домены, направленные против CD3 человека ( $\alpha$ CD3) и CD28 человека ( $\alpha$ CD28) и, кроме того, конструкции, содержавшие направленные мутации в их спейсерном Fc-домене, которые должны устранять антителозависимую клеточную цитотоксичность ( $\Delta$ ADCC), путем препятствования связыванию рецептора Fc $\gamma$ . Их конструировали в качестве меры безопасности для исключения неспецифической активации натуральных киллеров. С другой стороны все конструкции биспецифических антител содержали специфический связывающий домен С8 S-белка HBV (HBsAg). Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), выделенные из свежей венозной крови здоровых доноров, сокультивировали с различными клеточными линиями гепатомы человека в качестве заместительных моделей для инфекции HBV. Авторы настоящего изобретения использовали HuH7-S (трансгенный по S-антигену HBV) и в качестве отрицательного контроля родительскую клеточную линию HuH7, инфицированную HBV, или в качестве контроля

неинфицированные клетки HeparG. Клетки HepG2.2.15 (HBV с трансгенным геномом) использовали в качестве контролей для количественного определения маркера HBV. Для предоставления биспецифических конструкций антител добавляли супернатант продуцирующих клеточных линий, содержащих биспецифические антитела. Для визуализации изменений жизнеспособности клеток-мишеней вследствие цитотоксичности, опосредуемой биспецифическими антителами, с течением времени, использовали систему xCELLigence. Этот способ позволяет мониторинг в реальном времени жизнеспособности клеток при культивировании в течение длительных периодов времени. Таким образом, клетки-мишени гепатомы высевали на специально сконструированные микропланшеты для титрования, которые содержали гребенчатыми золотыми микроэлектродами для неинвазивного мониторинга жизнеспособности прикрепляющихся клеток-мишеней с использованием электрического сопротивления в качестве считываемых данных. Цитотоксическая элиминация приводит к изменению сопротивления, которое может быть конвертировано в так называемую величину клеточного индекса (CI), которую используют для мониторинга жизнеспособности клеток.

#### Сокультивирование с клетками-мишенями

На нулевые сутки высевали  $3 \times 10^4$  клеток HuH7-S/HuH7 на лунку в 96-ленточном планшете (E-Plate 96). На 1 сутки супернатант удаляли и в соответствующие лунки добавляли  $1 \times 10^5$  первичных PBMC человека в 100 мкл среды PBMC или только 100 мкл для контролей. Кроме того, добавляли 100 мкл супернатанта, содержащего биспецифические антитела, по отдельности или в комбинациях. В качестве отрицательного контроля в лунки добавляли 100 мкл среды DMEM до общего объема 200 мкл. Мониторинг культур проводили в течение 48 ч или 72 ч в среде xCELLigence.

Клетки HeparG выращивали до смыкания монослоя, подвергали дифференцировке в течение 21 суток и инфицировали HBV перед экспериментом по иммунотерапии.

Для инфицирования клеток HeparG приготавливали исходную культуру вируса в среде для дифференцировки, содержавшей PEG, и 50 мкл добавляли на лунку. Конечная концентрация PEG составляла 5% и MOI исходной культуры вируса была установлена

как 200 ( $7,5 \times 10^6$  вирусных частиц/лунка). Через 16 ч после добавления основной смеси для инфицирования клетки промывали 3 раза PBS для удаления остаточного вируса. Добавляли среду для дифференцировки и среду заменяли каждые 3 суток в течение всего 12 суток. Перед экспериментами по сокультивированию среду заменяли на среду для сокультивирования (обедненную иммунодепрессантом гидрокортизон). Успешное инфицирование HBV клеток HeparG исследовали путем измерения HBsAg (AxSYM) и HBeAg (BEI System) в супернатанте инфицированных клеток.

#### Получение PBMC

PBMC для экспериментов по сокультивированию выделяли из цельной крови.

Гепаринизированную свежую кровь разбавляли 1:1 промывочной средой RPMI. 25 мл разбавленной крови наслаивали на 15 мл Percoll и центрифугировали при 960 g в течение 20 мин без торможения в поворотной центрифуге. PBMC выделяли и переносили в 50 мл среды RPMI. После промывания клетки ресуспендировали в 10 мл среды PBMC и определяли число клеток. Концентрацию доводили до  $2 \times 10^6$  клеток/мл для обеспечения оптимальных условий. PBMC оставляли в состоянии покоя в течение ночи 37°C.

#### Активированная флуоресценцией сортировка клеток (FACS)

Для исследования эффекторных функций перенацеленных PBMC проводили FACS-анализ. Таким образом, анализировали секрецию провоспалительных цитокинов IFN- $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$ , а также экспрессию маркера активации CD154 (CD40L) и маркера

дегрануляции LAMP-1 (CD107a), соответственно. Измерение продукции цитокинов проводили с использованием внутриклеточного окрашивания цитокинов. Таким образом, 0,2 мкг/мл брэфелдина А (BFA) наносили на клетки и инкубировали в течение 4 часов при 37°C.

- 5 BFA блокирует прямой транспорт между эндоплазматической сетью и аппаратом Гольджи и, вследствие этого, происходит ингибирование экзоцитоза цитокинов. В случае одновременного окрашивания LAMP-1, антитело наносили за 1 ч до добавления BFA (для обеспечения транслокации LAMP-1 на клеточную поверхность). Затем клетки переносили в 96-луночный планшет (круглодонный) и промывали два раза 200 мкл
- 10 буфера FACS. Для окрашивания жизнеспособных клеток и исключения погибших клеток использовали набор LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit. Для фиксации и повышения проницаемости клетки ресуспендировали в 100 мкл реагента Cytofix/Cytoperm и инкубировали на льду в темноте в течение 20 мин. После промывания клетки ресуспендировали в полученной смеси антител или только окрашивали
- 15 соответствующими отдельными цветами для систематической компенсации. Окрашивание проводили на льду в темноте в течение 30 мин. После промывания клетки ресуспендировали в 200 мкл буфера FACS и переносили в пробирки FACS для сбора данных. Сбор данных проводили с использованием либо FACSCanto II, либо LSR Fortessa. Для регистрации данных использовали программное обеспечение FACS Diva, анализ
- 20 проводили с использованием программного обеспечения FlowJo.

#### Эксперименты на животных

- Для первого испытания биспецифических конструкций *in vivo* проводили эксперименты на иммунодефицитных мышах Rag2/IL2R $\gamma$ null (международная номенклатура: B10;B6-Rag2tm1Fwa Il2rgtm1Wjl). Авторы настоящего изобретения
- 25 инъецировали мышам в возрасте 6 недель  $5 \times 10^6$  клеток трансгенной по HBV клеточной линии гепатомы человека HepG2.2.15. Клетки инъецировали подкожно в бок животных. Это приводило к образованию опухоли в течение 14 суток. Мониторинг репликации HBV в опухоли проводили путем определения виремии HBV. РВМС человека выделяли из свежей пуповинной крови человека и стимулировали на планшетах, предварительно
- 30 покрытых антителами против CD3 и CD28 человека в концентрации клеток  $0,25 \times 10^6$  РВМС на мл в течение 3 суток. Затем клетки поддерживали в среде для культивирования клеток, содержащей 300 Е/мл IL-2, в течение 7 суток.

- На 14 сутки после индукции опухоли мышам внутрибрюшинно инъецировали  $2 \times 10^7$
- 35 РВМС на мышь и вводили 100 мкл биспецифических конструкций антител против  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 в супернатанте продуцирующих клеток НЕК в хвостовую вену на животное в течение четырех последовательных суток. Мышей умерщвляли на 18 сутки после индукции опухоли и анализировали в отношении размера опухоли. Затем образцы сыворотки и ткани хранили для дальнейшего анализа.

#### 40 Пример 4

Биспецифические антитела опосредуют специфическую элиминацию клеток-мишеней, экспрессирующих поверхностный белок HBV (HuH7-S)

- Для исследования того, осуществляют ли биспецифические конструкции антител успешное перенацеливание Т-клеток на клетки, экспрессирующие HBsAg, и индуцируют
- 45 ли они лизис клеток-мишеней, выделенные РВМС сокультивировали с клетками HuH7-S в присутствии биспецифических конструкций антитела. Клетки HuH7-S подвергали стабильной трансфекции для экспрессии HBsAg и, таким образом, имитировали HBV-инфицированные гепатоциты. Это обеспечивало продукцию и секрецию субвирусных

частиц в супернатант и включение HBsAg в клеточную мембрану. В качестве отрицательного контроля служили нетрансфицированные клетки HuH7.

Индивидуальные биспецифические антитела индуцируют уничтожение клеток-мишеней

- 5 Для анализа того, способны ли индивидуальные биспецифические антитела стимулировать активацию Т-клеток и опосредовать лизис клеток-мишеней РВМС сокультивировали с клетками HuH7-S/HuH7 в присутствии биспецифических
- 10 четырехвалентных антител  $\alpha\text{HBs} \times \alpha\text{CD3}$ ,  $\alpha\text{HBs} \times \alpha\text{CD28}$ ,  $\alpha\text{HBs} \times \alpha\text{CD3}$  [Fc $\Delta$ ADCC] или  $\alpha\text{HBs} \times \alpha\text{CD28}$  [Fc $\Delta$ ADCC]. Стимуляция эффекторных клеток единичными
- 15 биспецифическими антителами приводила к специфическому уничтожению клеток-мишеней, экспрессирующих HBsAg (фиг.5). Биспецифические антитела, направленные против CD3, опосредовали элиминацию клеток-мишеней раньше и сильнее, чем конструкции, направленные против CD28, поскольку конечная жизнеспособность
- 20 клеток HuH7-S, обработанных  $\alpha\text{CD3}$ , составляла только 6,4% ( $\alpha\text{CD3}\Delta\text{ADCC}$ : 15,5%) по сравнению с 44,42% для  $\alpha\text{CD28}$  ( $\alpha\text{CD28}\Delta\text{ADCC}$ : 48,9%). Более того  $\alpha\text{CD3}\Delta\text{ADCC}$  и  $\alpha\text{CD28}\Delta\text{ADCC}$  требовали больше времени для индукции лизиса клеток-мишеней по сравнению с  $\alpha\text{CD3}$  и  $\alpha\text{CD28}$ , соответственно. Опосредуемое  $\alpha\text{CD3}\Delta\text{ADCC}$  уничтожение начиналось приблизительно через 35 ч после начала сокультивирования, в то время как  $\alpha\text{CD3}$  приводило к снижению жизнеспособности клеток-мишеней уже через 12 ч.
- 25 Также можно было наблюдать небольшой временной сдвиг приблизительно 20 ч между лизисом клеток-мишеней, опосредуемым  $\alpha\text{CD28}\Delta\text{ADCC}$  и  $\alpha\text{CD28}$ . Стимуляция  $\alpha\text{CD3}$  также приводила к поддающемуся обнаружению лизису HBsAg-отрицательных клеток HuH7 с конечной жизнеспособностью 78,1%, что указывает на неспецифическую активацию. Указанное было справедливым для стимуляции  $\alpha\text{CD3}\Delta\text{ADCC}$  в некоторых
- 30 экспериментах, даже если это не показано здесь. Жизнеспособность клеток HuH7 в ходе сокультивирования в присутствии других биспецифических конструкций оставалась на уровне 100%.

Эти данные демонстрируют, что стимуляция каждым из индивидуальных биспецифических антител индуцирует элиминацию клеток-мишеней без дальнейшей

35 костимуляции.

Биспецифические антитела опосредуют лизис клеток-мишеней синергичным образом

Для дальнейшего анализа того, приводит ли комбинация биспецифических конструкций к увеличенной активности и, таким образом, цитотоксичности эффекторных

40 клеток, РВМС сокультивировали с клетками HuH7-S/HuH7 в присутствии комбинаций

35 либо  $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ , либо  $\alpha\text{CD3}\Delta\text{ADCC}/\alpha\text{CD28}\Delta\text{ADCC}$ . Как показано на фиг.6, комбинация биспецифических конструкций привела к массивному уничтожению экспрессирующих HBsAg клеток-мишеней с остаточной жизнеспособностью 1,2% ( $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ ) и 4,4% ( $\alpha\text{CD3}\Delta\text{ADCC}/\alpha\text{CD28}\Delta\text{ADCC}$ ), в то время клетки HuH7 практически не элиминировались (конечная жизнеспособность клеток HuH7:  $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ : 92,4%;  $\alpha\text{CD3}\Delta\text{ADCC}/$

40  $\alpha\text{CD28}\Delta\text{ADCC}$ : 100,4%).

Вновь, опосредуемый  $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$  лизис клеток-мишеней был более быстрым, чем уничтожение, индуцируемое конструкциями с мутантной Fc-областью, даже если

уничтожение клеток-мишеней начиналось приблизительно в тот же момент времени


45 через приблизительно 11 ч (фиг. 6А, В). Комбинация биспецифических антител привела к более быстрой элиминации клеток-мишеней по сравнению с лизисом, индуцируемым индивидуальными биспецифическими конструкциями (фиг.6С, D). Это ожидалось, поскольку Т-клетки получали не только один сигнал, как в случае присутствия индивидуальных конструкций, но получали как активирующий, так и костимулирующий


сигнал, если присутствовали антитела, направленные против CD3 и CD28.

Таким образом, комбинация биспецифических конструкций опосредует специфический лизис поверхностного белка HBV, экспрессирующего клетки-мишени, синергичным образом.

Биспецифические антитела индуцируют элиминацию клеток-мишеней зависимым от концентрации образом

Для исследования того, имело ли количество биспецифических антител эффект на лизис клеток-мишеней для сокультивирования использовали два различных количества биспецифических конструкций. Таким образом, использовали обычное количество

антител (100 мкл супернатанта всего  высокое) и его половину (50 мкл

супернатант всего  низкое). Более низкое количество биспецифических антител

также могло индуцировать лизис клеток-мишеней (конечная жизнеспособность клеток HuH7-S:  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28: 12,6%;  $\alpha$ CD3 $\Delta$ ADCC/ $\alpha$ CD28 $\Delta$ ADCC: 15,9%), в то время как более высокое количество индуцировало более быструю элиминацию клеток-мишеней (фиг.7), причем оставалось только 1,5% ( $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28) и 2,1% ( $\alpha$ CD3 $\Delta$ ADCC/ $\alpha$ CD28 $\Delta$ ADCC) жизнеспособных клеток. Клетки HuH7 оставались неизменными в любом случае. Комбинация либо  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28, либо  $\alpha$ CD3 $\Delta$ ADCC/ $\alpha$ CD28 $\Delta$ ADCC индуцировала уничтожение клеток-мишеней зависимым от концентрации образом.

Увеличенные концентрации эффекторных клеток усиливают лизис клеток-мишеней

Кроме того, интерес представляло то, влияет ли количество эффекторных клеток на элиминацию клеток-мишеней. Таким образом, обычное количество РВМС, использованное для сокультивирования ( $1 \times 10^5$ ), сравнивали с двойным количеством ( $2 \times 10^5$ ). Как продемонстрировано на фиг.8, более высокое количество РВМС индуцировало лизис клеток HuH7-S в присутствии  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 значительно быстрее с конечной жизнеспособностью 4,5% по сравнению 11,7%, но также уничтожалось больше клеток HuH7, если присутствовало двойное количество РВМС (конечная жизнеспособность клеток HuH7:  $2 \times 10^5$  РВМС: 83,8%;  $1 \times 10^5$  РВМС: 102,7%).

Эти данные указывают на то, что элиминация клеток-мишеней зависит от количества эффекторных клеток.

Биспецифические антитела опосредуют уничтожение клеток-мишеней после сокультивирования в течение только 8 ч

Для исследования вопроса, как долго биспецифические антитела должны присутствовать в процессе сокультивирования для активации Т-клеток и, таким образом, индукции цитотоксичности, супернатант сокультур, содержавших биспецифические антитела, удаляли через различные моменты времени и добавляли новую стандартную среду DMEM. Если супернатант, содержавший  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28, удаляли после 4 ч, РВМС индуцировали только небольшое снижение жизнеспособности клеток-мишеней (78,5%), но не были способны индуцировать лизис всех клеток-мишеней (фиг.9). Если супернатант, содержавший биспецифические антитела, присутствовал в течение 8 ч или дольше, РВМС были способны индуцировать элиминацию клеток-мишеней. Как проиллюстрировано на фиг.10, для РВМС требовалось больше времени для индукции лизиса клеток-мишеней, если стимуляция  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 длилась 8 ч или 12 ч по сравнению с 24 ч или 48 ч, однако эффект после 48 ч был практически сходным (конечная

жизнеспособность NuH7-S: 8 ч: 14,7%; 12 ч: 11,7%, 24 ч: 5,1%, 48 ч: 3,2%).

Биспецифические антитела опосредуют эффекторные функции Т-клеток в процессе сокультивирования либо с клетками HBsAa, либо с клетками NuH7-S

Для исследования активации и функциональности Т-клеток в процессе экспериментов по сокультивированию секрецию цитокинов исследовали посредством либо ELISA, либо FACS-анализа.

Биспецифические конструкции опосредуют секрецию IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-2

В хронологическом эксперименте анализировали, когда РВМС начинают секретировать цитокины при контакте с биспецифическими антителами и как динамика развивается с течением времени. Таким образом, супернатант сокультур удаляли через 4 ч, 8 ч, 12 ч, 24 ч и 48 ч после добавления РВМС и  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28. Продукцию цитокинов измеряли способом ELISA для IL-2, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ . Секреция IL-2 возрастала с течением времени, однако после 4 ч IL-2 практически не поддавался обнаружению, после 8 ч концентрация составляла уже 316 пг/мл и в течение последующих 4 часов, концентрация увеличилась практически в четыре раза (1119 пг/мл). Не происходило дальнейшего повышения между 24 ч и 48 ч и оказалось, что концентрация IL-2 достигла плато при концентрации приблизительно 1550 пг/мл (фиг.10А). Секреция IFN- $\gamma$  (фиг.10В) требовала больше времени, после 8 ч все еще обнаруживались очень низкие уровни. Между 8 ч и 12 ч Т-клетки начинали секретировать IFN- $\gamma$ , поскольку их концентрация уже составляла 1800 пг/мл после 12 ч. Затем (24 ч) наблюдали увеличение продуцирования IFN- $\gamma$ , концентрация возрастала приблизительно до 10000 пг/мл. Наиболее высокое количество обнаруживалось после 48 ч (12000 пг/мл). Как для IL-2, так и для IFN- $\gamma$  концентрация отрицательных по HBsAg клеток увеличивалась с течением времени, причем наивысшим было количество после 48 ч (IL-2: 45 пг/мл; IFN- $\gamma$ : 200 пг/мл), которое также соответствует наблюдениям, касающимся жизнеспособности клеток.

Секреция TNF- $\alpha$  (фиг.10С) увеличивалась вплоть до 24 ч, где она достигала максимальной концентрации (1700 пг/мл). Затем она снижалась и составляла только 1400 пг/мл после 48 ч. Напротив, секреция TNF- $\alpha$  начиналась раньше, чем остальных, с приблизительно 100 пг/мл после 4 ч с последующим устойчивым увеличением вплоть до 24 ч. Интересно, что продукция TNF- $\alpha$  в клетках NuH7 происходила в точности противоположным образом. Имея относительно высокую фоновую концентрацию по сравнению с другими цитокинами, она продемонстрировала наиболее высокую концентрацию через 4 ч (~70 пг/мл), которая снижалась в течение времени и составляла только 9 пг/мл после 48 ч. В РВМС индуцируется секреция IL-2, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  при контакте с  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 в ходе сокультивирования с клетками, экспрессирующими HBsAg, в то время как среди индивидуальных цитокинов динамика секреции отличается.

Биспецифические конструкции активируют CD8<sup>+</sup> Т-клетки, а также CD4<sup>+</sup> Т-клетки

Чтобы проанализировать, демонстрируют ли РВМС также дегрануляцию цитотоксических везикул исследовали транслокацию LAMP-1 (CD107a), маркера дегрануляции. После сокультивирования с клетками NuH7-S/NuH7 в присутствии  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 или  $\alpha$ CD3 $\Delta$ ADCC/ $\alpha$ CD28 $\Delta$ ADCC, CD8<sup>+</sup> Т-клетки продемонстрировали очевидный сдвиг окрашивания LAMP-1, в то время в образцах, стимулированных  $\alpha$ CD3 $\Delta$ ADCC/ $\alpha$ CD28 $\Delta$ ADCC, сигнал был более сильным по сравнению с  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 (фиг.11 С, D). Интересно, что то же наблюдение можно сделать для CD4<sup>+</sup> Т-клеток (фиг.11 А, В). Для  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 транслокация LAMP-1 была более выраженной в CD8<sup>+</sup> Т-клетках, для  $\alpha$ CD3 $\Delta$ ADCC/ $\alpha$ CD28 $\Delta$ ADCC она было в точности обратной.

Эти данные демонстрируют, что не только CD8<sup>+</sup> Т-клетки, но также CD4<sup>+</sup>

индуцируются к секреции цитотоксических гранул при контакте с биспецифическими антителами и HBsAg.

Для исследования полифункциональности Т-клеток после экспериментов по сокультивированию PBMC окрашивали в отношении IFN- $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$ , а также в отношении маркера активации CD154 (CD40L), который в основном экспрессируется на CD4<sup>+</sup> Т-клетках, через 8 ч, 12 ч и 24 ч после добавления PBMC и  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 (фиг.12). CD4<sup>+</sup> Т-клетки продемонстрировали устойчивое увеличение количества IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Т-клеток (9,3% после 24 ч), IL-2<sup>+</sup> Т-клеток (11,3% после 24 ч), TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> Т-клеток (14,7% после 24 ч) и CD154<sup>+</sup> Т-клеток (28,0% после 24 ч), в то время как основное увеличение происходило между 12 ч и 24 ч (фиг.12А).

Указанное было справедливым для CD8<sup>+</sup> Т-клеток, в то время как процент IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и IL-2<sup>+</sup> клеток на 18,4% и 11,3% превышал процент CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Количество TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> и CD154<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клеток было сниженным на 10,1% и 6,25% по сравнению с CD4<sup>+</sup> Т-клетками (фиг.12В). PBMC в случае клеток HuH7 продемонстрировали отсутствие активации в любом образце. Для дальнейшего анализа Т-клеток, секретирующих цитокины, использовали окна булевых комбинаций (фиг.12С, D). После 24 ч 3,1% CD4<sup>+</sup> Т-клеток и 2,1% CD8<sup>+</sup> Т-клеток были IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-2<sup>+</sup> и TNF $\alpha$ <sup>+</sup>, что указывает на полифункциональность Т-клеток. Таким образом,  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 опосредует активацию PBMC в процессе сокультивирования с клетками HuH7-S/HuH7, что приводит к полифункциональным CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеткам.

Для исключения того, что были обнаружены ложноположительные сигналы вследствие неспецифического связывания с погибшими клетками-мишенями в ходе FACS-анализа, PBMC культивировали в присутствии иммобилизованного HBsAg. Кроме того, исследовали эффект растворимого HBsAg, поскольку инфицированные HBV пациенты обладают высокими количествами HBsAg в их крови. PBMC вновь окрашивали в отношении IFN- $\gamma$ , IL-2 и TNF- $\alpha$ , а также в отношении CD154, но только через 24 ч и 48 ч после добавления PBMC и  $\alpha$ CD3 $\Delta$ ADCC/ $\alpha$ CD28 $\Delta$ ADCC (фиг.13). Вновь CD4<sup>+</sup> Т-клетки продемонстрировали увеличение количества IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Т-клеток (3,4% после 24 ч, 6,8% после 48 ч) и CD154<sup>+</sup> Т-клеток (17,2% после 24 ч, 19,9% после 48 ч). После 48 ч было меньше IL-2<sup>+</sup> Т-клеток (4,9%) по сравнению с 24 ч (5,5%), количество TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> Т-клеток также снижалось (14,9% после 24 ч, 8,1% после 48 ч) (фиг.13А). CD8<sup>+</sup> Т-клетки продемонстрировали только снижение количества TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> Т-клеток (12,6% после 24 ч, 7,4% после 48 ч), в то время как это снижение также наблюдали в ELISA (фиг.10). Процент IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-2<sup>+</sup> и CD154<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клеток возрастал между 24 ч и 48 ч (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>: 4,7% после 24 ч, 8,5% после 48 ч, IL-2<sup>+</sup>: 5,1% после 24 ч, 7,2% после 48 ч, CD154<sup>+</sup>: 8,3% после 24 ч, 10,4% после 48 ч) (фиг.13В). Вновь, процент IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> и IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клеток превышал процент CD4<sup>+</sup> Т-клеток и количество TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> и CD154<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клеток было сниженным по сравнению с CD4<sup>+</sup> Т-клетками. После 48 ч также некоторые Т-клетки, по-видимому, активировались растворимым HBsAg, поскольку TNF $\alpha$ <sup>+</sup> Т-клетки достигали 1,1% (CD4<sup>+</sup> Т-клетки) и 1,0% (CD8<sup>+</sup> Т-клетки), CD154<sup>+</sup> Т-клетки достигали 2,7% (CD4<sup>+</sup> Т-клетки) и

3,1% (CD8<sup>+</sup> Т-клетки), IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клетки достигали 1,2% и IL-2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т-клетки достигали 1,4%. Вновь, для дальнейшего анализа Т-клеток, секретирующих цитокины использовали булевые окна (фиг.13С, D). 0,35% (после 24 ч) и 0,63% (после 48 ч) CD4<sup>+</sup> Т-клеток, 0,3% (после 24 ч) и 1,0% (после 48 ч) CD8<sup>+</sup> Т-клеток были IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-2<sup>+</sup> и TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, что указывает на полифункциональность Т-клеток.  $\alpha$ CD3ADCC/ $\alpha$ CD28ADCC опосредует активацию РВМС в процессе сокультивирования с иммобилизованными HBsAg-клетками, что приводит к полифункциональным CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеткам.

Активация вследствие растворимого HBsAg остается низкой.

Биспецифические антитела опосредуют секрецию IFN $\gamma$  и уничтожение инфицированных HBV клеток НераRG

Наконец, представляло интерес то, способны ли биспецифические антитела перенацеливать Т-клетки на инфицированные HBV клетки НераRG. Успех инфицирования исследовали путем измерения уровня HBsAg в супернатанте инфицированных клеток. По сравнению с результатом для клеток HuH7-S или HepG2.2.15, концентрация HBsAg, продуцируемого инфицированными HBV клетками НераRG, была очень низкой. Кроме того, величины в различных лунках существенно варьировались, на что указывало относительно высокое стандартное отклонение (фиг.14).

Тем не менее, инфицирование было успешным, и проводили сокультивирование РВМС с клетками НераRG в присутствии биспецифических антител. Как можно видеть на фиг.15, жизнеспособность необработанных клеток снижалась с течением времени до остаточной жизнеспособности 65,9% (HBV+) и 62,9% (HBV-) после 56 ч. По сравнению с этим  $\alpha$ CD3 и комбинация  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 опосредовали специфический лизис инфицированных HBV клеток НераRG.  $\alpha$ CD28 отдельно не могло индуцировать специфическую элиминацию клеток-мишеней. Если  $\alpha$ CD3 присутствовало в процессе сокультивирования, жизнеспособность инфицированных HBV клеток снижалась до 25,3%, в то время как неинфицированные клетки НераRG оставались на уровне 53,5% (фиг.15А). Стимуляция эффекторных клеток посредством  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 также привела к значительному уничтожению инфицированных HBV клеток НераRG (фиг.15В), причем 37,5% клеток-мишеней оставались жизнеспособными (не инфицированные клетки НераRG: 62,4%).

Таким образом,  $\alpha$ CD3 или  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 индуцируют специфический лизис инфицированных HBV клеток НераRG.

Биспецифические антитела опосредуют уменьшение положительных по HBV опухолей in vivo

Иммунодефицитным мышам, которым была инъецирована трансгенная по HBV клеточная линия гепатомы человека HepG2.2.15 для развития подкожных HBV-положительных опухолей, инъецировали РВМС человека и биспецифические конструкции, направленные против CD3 и CD28 (фиг.16). Это лечение приводило к значительному снижению размера опухолей по сравнению с животными, которым не проводили введения, или с животными, которым проводили имитирующее введение (животные, которым вводили РВМС и PBS). У животных, которым проводили лечение, размер опухоли снижался приблизительно на пятьдесят процентов.

#### (57) Формула изобретения

1. Полипептид, способный связываться с первым и вторым антигенами, содержащий (а) первый набор из шести определяющих комплементарность областей (CDR), связывающих первый антиген; и



(b) (ba) второй набор из шести CDR, связывающих второй антиген; или  
(bb) лиганд, способный связываться со вторым антигеном;

где

(i) указанный первый антиген выбран из малого поверхностного антигена вируса гепатита В (HBV); среднего поверхностного антигена HBV и большого поверхностного антигена HBV; и

(ii) указанный второй антиген выбран из поверхностных антигенов, презентруемых иммунными эффекторными клетками, такими как натуральные киллеры (NK) и цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), где

указанный первый набор из шести CDR имеет последовательности SEQ ID NO: 1-6, 7-12 или 13-18; и

указанный второй набор из шести CDR имеет последовательности SEQ ID NO: 19-24, 25-30, 31-36 или 37-42,

где в каждом наборе из шести CDR порядок CDR является следующим: CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи,

где указанные CDR являются частью иммуноглобулиновых доменов, и где

указанный лиганд представляет собой иммунолиганд, предпочтительно способный связываться с NKG2D, NKp30/NCR3, 4-1 BB или OX40.

2. Полипептид по п.1, где

(a) указанный первый набор из шести CDR содержится в первом scFv-фрагменте; и/или

(b) (ba) указанный второй набор из шести CDR содержится во втором scFv-фрагменте.

3. Полипептид по п.1 или 2, где указанный первый набор из шести CDR связывает

эпитоп указанного первого антигена, причем эпитоп расположен

(a) в указанном малом поверхностном антигене HBV;

(b) в части указанного большого поверхностного антигена HBV, которая не содержится в указанном малом поверхностном антигене HBV; или

(c) в части указанного большого поверхностного антигена HBV, структура которой отличается от указанного малого поверхностного антигена HBV.

4. Полипептид по п.1 или 2, где указанный поверхностный антиген, презентруемый иммунными эффекторными клетками, выбран из CD3, CD28, 4-1 BB, OX40, CD16, CD56, NKG2D и NKp30/NCR3.

5. Полипептид по п. 1 или 2, где указанный полипептид дополнительно содержит область димеризации, где указанная область димеризации обеспечивает ковалентную и/или нековалентную димеризацию.

6. Полипептид по п.1 или 2, где указанный полипептид дополнительно содержит спейсерную область, причем указанная спейсерная область предпочтительно содержит СН2-домен и СН3-домен, при этом указанная спейсерная область расположена между

(i) указанным первым scFv-фрагментом и

(ii) указанным вторым scFv-фрагментом или указанным рекомбинантным лигандом в аминокислотной последовательности указанного полипептида,

и в указанный СН2-домен и/или указанный СН3-домен предпочтительно внесены мутации в одном или нескольких положениях для снижения или устранения связывания Fc-рецепторов.

7. Полипептид по п. 1 или 2, где указанный полипептид содержит или состоит из аминокислотной последовательности по любому из SEQ ID NO: 43-46 или аминокислотной последовательности, которая проявляет по меньшей мере 80%

идентичность с любой из SEQ ID NO: 43-46 при условии, что CDR указанной аминокислотной последовательности, проявляющей по меньшей мере 80% идентичность, идентичны SEQ ID NO: 1-6, 7-12, 13-18, 19-24, 25-30, 31-36 или 37-42, соответственно.

8. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из предшествующих пунктов.

9. Комплекс для лечения или предупреждения инфекции HBV и/или состояния, вызываемого указанной инфекцией HBV, причем указанное состояние, вызванное указанной инфекцией HBV, выбрано из цирроза печени, печеночно-клеточной карциномы и рака печени, причем указанный рак печени характеризуется экспрессией одного или нескольких поверхностных антигенов HBV, содержащий или состоящий из двух полипептидов, причем указанные полипептиды определены в любом из пп.1-7, где

(а) между указанными полипептидами существует по меньшей мере ковалентная связь, предпочтительно по меньшей мере один дисульфидный мостик между остатками Cys указанных полипептидов; или

(b) указанные полипептиды связаны друг с другом нековалентно.

10. Комплекс по п.9, где указанный комплекс содержит или состоит из четырехвалентного антитела, которое является биспецифическим, триспецифическим или тетраспецифическим.

11. Композиция для лечения или предупреждения инфекции HBV и/или состояния, вызываемого указанной инфекцией HBV, причем указанное состояние, вызванное указанной инфекцией HBV, выбрано из цирроза печени, печеночно-клеточной карциномы и рака печени, причем указанный рак печени характеризуется экспрессией одного или более поверхностных антигенов HBV, содержащая в эффективном количестве один или более полипептидов по любому из пп.1-7 и/или один или более комплексов по п.9 при условии, что по меньшей мере два полипептида содержатся в указанной композиции, причем эти два полипептида отличаются друг от друга в отношении первого антигена и/или второго антигена, с которым они связываются.

12. Композиция по п.11, где указанные два полипептида представляют собой

(а) (i) полипептид, связывающийся с малым или большим поверхностным антигеном HBV и CD3; и

(ii) полипептид, связывающийся с малым или большим поверхностным антигеном HBV и CD28;

или

(b) (i) полипептид, связывающийся с малым или большим поверхностным антигеном HBV и CD16; и

(ii) полипептид, связывающийся с малым или большим поверхностным антигеном HBV и CD56.

13. Композиция по п.11 или 12, где указанная композиция содержит четырехвалентное антитело, которое является биспецифическим, триспецифическим или тетраспецифическим.

14. Фармацевтическая композиция для лечения или предупреждения инфекции HBV и/или состояния, вызываемого указанной инфекцией HBV, причем указанное состояние, вызванное указанной инфекцией HBV, выбрано из цирроза печени, печеночно-клеточной карциномы и рака печени, причем указанный рак печени характеризуется экспрессией одного или более поверхностных антигенов HBV, содержащая в эффективном количестве один или более полипептидов по любому из пп.1-7, один или более комплексов по п.9 или 10 и/или один или более композиций по любому из пп.11-13.

15. Применение одного или нескольких полипептидов по любому из пп.1-7, одного

или нескольких комплексов по п.9 или 10 и/или одной или нескольких композиций по любому из пп.11-13 для лечения или предупреждения инфекции HBV и/или состояния, вызываемого указанной инфекцией HBV, причем указанное состояние, вызванное указанной инфекцией HBV, выбрано из цирроза печени, печеночно-клеточной карциномы и рака печени, причем указанный рак печени характеризуется экспрессией одного или нескольких поверхностных антигенов HBV.

16. Иммунная эффекторная клетка *in vitro* или *ex vivo* для лечения или предупреждения инфекции HBV и/или состояния, вызываемого указанной инфекцией HBV, причем указанное состояние, вызванное указанной инфекцией HBV, выбрано из цирроза печени, печеночно-клеточной карциномы и рака печени, причем указанный рак печени характеризуется экспрессией одного или более поверхностных антигенов HBV, которая имеет полипептид по любому из пп.1-7, или комплекс по п.9 или 10, связанные с поверхностным антигеном указанной иммунной эффекторной клетки.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Helmholtz Zentrum München - Deutsches Forschungszentrum für  
Gesundheit und Umwelt (GmbH) et al.

<120> Новые средства и способы для лечения инфекции HBV и  
ассоциированных с ней состояний

<130> W2662 PCT

<150> EP 13 18 4635.4

<151> 2013-09-16

<160> 49

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 тяжелой цепи scFv C8

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala

1

5

<210> 2

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи scFv C8

<400> 2

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr

1 5

<210> 3

<211> 21

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 тяжелой цепи scFv C8

<400> 3

Ala Lys Pro Pro Gly Arg Gln Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Ile Tyr Tyr

1 5 10 15

Phe Pro Leu Gly Asn

20

<210> 4

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 легкой цепи scFv C8

<400> 4

Asn Ile Gly Ser Lys Ser

1 5

<210> 5

<211> 3

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 легкой цепи scFv C8

<400> 5

Asp Asp Ser

1

<210> 6

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 легкой цепи scFv C8

<400> 6

Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Leu Val Val

1

5

10

<210> 7

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 тяжелой цепи scFv 5F9

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala

1

5

<210> 8

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи scFv 5F9

<400> 8

Ile Asn Ser Asp Gly Arg Ser Thr

1 5

<210> 9

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 тяжелой цепи scFv 5F9

<400> 9

Ala Arg Thr Phe Tyr Ala Asp Tyr

1 5

<210> 10

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 легкой цепи scFv 5F9

<400> 10

Gln Asn Val Asp Thr Thr

1 5

<210> 11

<211> 3

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 легкой цепи scFv 5F9

<400> 11

Trp Ala Ser

1

<210> 12

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 легкой цепи scFv 5F9

<400> 12

Gln Gln Tyr Ser Ile Phe Pro Tyr Thr

1

5

<210> 13

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 тяжелой цепи scFv 5A19

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1

5

<210> 14

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность



<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи scFv 5A19

<400> 14

Val Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 тяжелой цепи scFv 5A19

<400> 15

Ala Ser Phe Asn Trp Asp Val Ala Tyr

1 5

<210> 16

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 легкой цепи scFv 5A19

<400> 16

Gln Ser Leu Leu Asn Thr Arg Thr Arg Lys Ser Tyr

1 5 10

<210> 17

<211> 3

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 легкой цепи scFv 5A19

<400> 17

Trp Ala Ser

1

<210> 18

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 легкой цепи scFv 5A19

<400> 18

Lys Gln Ser Tyr Ser Leu Tyr Thr

1

5

<210> 19

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 тяжелой цепи scFv OKT3

<400> 19

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr

1

5

<210> 20

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи scFv OKT3

<400> 20

Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr

1 5

<210> 21

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 тяжелой цепи scFv OKT3

<400> 21

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 22

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 легкой цепи scFv OKT3

<400> 22

Ser Ser Val Ser Tyr

1 5

<210> 23

<211> 3

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 легкой цепи scFv OKT3

<400> 23

Asp Thr Ser

1

<210> 24

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 легкой цепи scFv OKT3

<400> 24

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr

1

5

<210> 25

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 тяжелой цепи scFv 9.3

<400> 25

Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Gly

1

5

<210> 26

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи scFv 9.3

<400> 26

Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr

1 5

<210> 27

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 тяжелой цепи scFv 9.3

<400> 27

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 легкой цепи scFv 9.3

<400> 28

Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu

1 5 10

<210> 29

<211> 3

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 легкой цепи scFv 9.3

<400> 29

Ala Ala Ser

1

<210> 30

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 легкой цепи scFv 9.3

<400> 30

Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr

1

5

<210> 31

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 тяжелой цепи scFv A9

<400> 31

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp

1

5

<210> 32

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи scFv A9

<400> 32

Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr

1 5

<210> 33

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 тяжелой цепи scFv A9

<400> 33

Ala Arg Ser Ala Ser Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 34

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 легкой цепи scFv A9

<400> 34

Thr Gly Thr Val Thr Thr Ser Asn Tyr

1 5

<210> 35

<211> 3

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 легкой цепи scFv A9

<400> 35

His Thr Asn

1

<210> 36

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 легкой цепи scFv A9

<400> 36

Ala Leu Trp Tyr Asn Asn His Trp Val

1

5

<210> 37

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 тяжелой цепи scFv NCAM29.2

<400> 37

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly

1

5

<210> 38

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность



<220>

<223> CDR2 тяжелой цепи scFv NCAM29.2

<400> 38

Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Ala Ile

1 5

<210> 39

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 тяжелой цепи scFv NCAM29.2

<400> 39

Val Arg Gly Arg Arg Leu Gly Glu Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 40

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR1 легкой цепи scFv NCAM29.2

<400> 40

Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 41

<211> 3

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR2 легкой цепи scFv NCAM29.2

<400> 41

Trp Ala Ser

1

<210> 42

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CDR3 легкой цепи scFv NCAM29.2

<400> 42

Gln Gln Tyr Ser Ser Trp Thr

1

5

<210> 43

<211> 794

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> scFv против HBsAg [C8]^Glycin-Serin-Linker^hIgG1-Fc[C245S,L259F,L260E,G262A,A355T]^StrepTag^Glycin-Linker^anti-CD3 scFv [OKT3]

<400> 43

Met Asp Phe Glu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1

5

10

15

Val Ile Met Ser Arg Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly

20

25

30

Gly Leu Leu Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

	35					40					45						
Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Gly	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro		
	50					55					60						
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser		
65						70					75					80	
Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp		
	85					90					95						
Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu		
	100					105					110						
Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Pro	Pro	Gly	Arg	Gln	Glu	Tyr		
	115					120					125						
Tyr	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Phe	Pro	Leu	Gly	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly		
	130					135					140						
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Lys	Leu	Glu		
145						150					155					160	
Glu	Gly	Glu	Phe	Ser	Glu	Ala	Arg	Val	Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro		
	165					170					175						
Ala	Ser	Val	Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Gly		
	180					185					190						
Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro		
	195					200					205						
Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Val	Tyr	Asp	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ser		
	210					215					220						
Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr		
225						230					235					240	
Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys		
	245					250					255						
Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr		
	260					265					270						
Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Asn	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly		
	275					280					285						
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys		
	290					295					300						
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Ala	Pro		
305						310					315					320	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser		

325								330					335				
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp		
340								345					350				
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		
355								360					365				
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val		
370								375					380				
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu		
385								390					395				
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Thr	Pro	Ile	Glu	Lys		
405								410					415				
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr		
420								425					430				
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr		
435								440					445				
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu		
450								455					460				
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu		
465								470					475				
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys		
485								490					495				
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu		
500								505					510				
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
515								520					525				
Lys	Asp	Pro	Gly	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe	Glu	Lys	Ser	Arg	Gly	Gly		
530								535					540				
Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro		
545								550					555				
Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr		
565								570					575				
Arg	Tyr	Thr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu		
580								585					590				
Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln		
595								600					605				
Lys	Phe	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr		

```

        610                615                620
Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
625                630                635                640
Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly
        645                650                655
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Asn Ser Gly Gly Gly Gly
        660                665                670
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Gln Ile Val
        675                680                685
Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val
        690                695                700
Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
705                710                715                720
Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
        725                730                735
Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly
        740                745                750
Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala
        755                760                765
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser
        770                775                780
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Gly Asn Ser
785                790

```

<210> 44

<211> 793

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> scFv против HBsAg [C8]^Glycin-Serin-Linker^hIgG1-Fc[C245S,L259F,L260E,G262A,A355T]^StrepTag^Glycin-Linker^ anti-CD28 scFv [9.3]

<400> 44

Met Asp Phe Glu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1		5		10		15
Val	Ile	Met	Ser	Arg	Met	Glu
		20		25		30
Gly	Leu	Leu	Gln	Pro	Gly	Gly
		35		40		45
Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Gly	Tyr
		50		55		60
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
65			70		75	80
Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		85		90		95
Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
		100		105		110
Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
		115		120		125
Tyr	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Tyr
		130		135		140
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
145			150		155	160
Glu	Gly	Glu	Phe	Ser	Glu	Ala
		165		170		175
Ala	Ser	Val	Ser	Val	Ala	Pro
		180		185		190
Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys
		195		200		205
Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val
		210		215		220
Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser
225			230		235	240
Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu
		245		250		255
Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser
		260		265		270
Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Asn
		275		280		285
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser

```

290                295                300
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Ala Pro
305                310                315                320
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                325                330                335
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
                340                345                350
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
                355                360                365
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
                370                375                380
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
385                390                395                400
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Thr Pro Ile Glu Lys
                405                410                415
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
                420                425                430
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
                435                440                445
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
                450                455                460
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
465                470                475                480
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                485                490                495
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
                500                505                510
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                515                520                525
Lys Asp Pro Gly Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Ser Ser Gly Gly
                530                535                540
Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro
545                550                555                560
Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
                565                570                575
Asp Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu

```

580							585					590				
Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	
595							600					605				
Leu	Met	Ser	Arg	Lys	Ser	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	
610							615					620				
Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Ala	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	
625							630					635				
Cys	Ala	Arg	Asp	Lys	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	
645							650					655				
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
660							665					670				
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	
675							680					685				
Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	
690							695					700				
Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Glu	Tyr	Tyr	Val	Thr	Ser	Leu	Met	Gln	Trp	
705							710					715				
Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Phe	Ala	Ala	
725							730					735				
Ser	Asn	Val	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	
740							745					750				
Gly	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Asp	Glu	Asp	Asp	Val	
755							760					765				
Ala	Met	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Arg	Lys	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	
770							775					780				
Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg								
785							790									

<210> 45

<211> 792

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

 $\langle 220 \rangle$



<223> scFv против HBsAg [C8]^Glycin-Serin-Linker^hIgG1-Fc[C245S,L259F,L260E,G262A,A355T]^StrepTag^Glycin-Linker^StrepTag^anti-CD16 scFv [A9]

<400> 45

```

Met Asp Phe Glu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1           5           10           15
Val Ile Met Ser Arg Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
          20           25           30
Gly Leu Leu Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
          35           40           45
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
          50           55           60
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser
65           70           75           80
Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
          85           90           95
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
          100          105          110
Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Pro Gly Arg Gln Glu Tyr
          115          120          125
Tyr Gly Ser Ser Ile Tyr Tyr Phe Pro Leu Gly Asn Trp Gly Gln Gly
          130          135          140
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Lys Leu Glu
145          150          155          160
Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro
          165          170          175
Ala Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
          180          185          190
Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
          195          200          205
Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
          210          215          220
Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
225          230          235          240
Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

```

				245					250				255				
Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr		
				260					265					270			
Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Asn	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly		
				275					280					285			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys		
				290					295					300			
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Ala	Pro		
305						310				315					320		
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser		
				325						330					335		
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp		
				340						345					350		
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		
				355						360					365		
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val		
				370						375					380		
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu		
385						390					395				400		
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Thr	Pro	Ile	Glu	Lys		
				405						410					415		
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr		
				420						425					430		
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr		
				435						440					445		
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu		
				450						455					460		
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu		
465						470					475				480		
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys		
				485						490					495		
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu		
				500						505					510		
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
				515						520					525		
Lys	Asp	Pro	Gly	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe	Glu	Lys	Ser	Arg	Gly	Gly		

530		535		540	
Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro					
545		550		555	560
Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr					
	565		570		575
Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu					
	580		585		590
Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu					
	595		600		605
Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Ser Arg Thr					
	610		615		620
Ala Tyr Val Gln Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr					
625		630		635	640
Phe Cys Ala Arg Ser Ala Ser Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly					
	645		650		655
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly					
	660		665		670
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Gln Ala Val Val Thr					
	675		680		685
Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr					
	690		695		700
Cys Arg Ser Asn Thr Gly Thr Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp					
705		710		715	720
Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly His Thr					
	725		730		735
Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile					
	740		745		750
Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu					
	755		760		765
Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Asn His Trp Val Phe Gly					
	770		775		780
Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu					
785		790			

<210> 46

<211> 799

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> scFv против HBsAg [C8]^Glycin-Serin-Linker^hIgG1-Fc[C245S,L259F,L260E,G262A,A355T]^StrepTag^Glycin-Linker^StrepTag^anti-CD56 scFv [NCAM29.2]

<400> 46

```

Met Asp Phe Glu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1              5              10              15
Val Ile Met Ser Arg Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
              20              25              30
Gly Leu Leu Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
              35              40              45
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
              50              55              60
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser
65              70              75              80
Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
              85              90              95
Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
              100             105             110
Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Pro Gly Arg Gln Glu Tyr
              115             120             125
Tyr Gly Ser Ser Ile Tyr Tyr Phe Pro Leu Gly Asn Trp Gly Gln Gly
              130             135             140
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Lys Leu Glu
145             150             155             160
Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro
              165             170             175
Ala Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
              180             185             190
Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
              195             200             205
Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser

```

210	215	220																	
Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr				
225						230				235					240				
Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys				
				245					250					255					
Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr				
			260					265					270						
Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Asn	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly				
	275						280					285							
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys				
	290					295					300								
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Ala	Pro				
305					310					315					320				
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser				
				325					330				335						
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp				
			340						345				350						
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn				
	355					360				365									
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val				
	370					375				380									
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu				
385					390					395					400				
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Thr	Pro	Ile	Glu	Lys				
			405						410				415						
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr				
	420							425				430							
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr				
	435						440					445							
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu				
	450					455				460									
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu				
465					470					475					480				
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys				
			485						490				495						
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu				

			500					505					510			
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
			515					520					525			
Lys	Asp	Pro	Gly	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe	Glu	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly	
			530					535					540			
Gly	Gly	Asp	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	
545						550					555					560
Gly	Gly	Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	
				565					570					575		
Ser	Phe	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	
			580					585					590			
Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Ser	Tyr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	
			595					600					605			
Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Pro	Glu	Asn	Thr	
			610					615					620			
Leu	Phe	Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Met	Tyr	
625						630					635					640
Tyr	Cys	Val	Arg	Gly	Arg	Arg	Leu	Gly	Glu	Gly	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	
			645					650					655			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Asn	Ser	Gly	Gly	
			660					665					670			
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Asp	
			675					680					685			
Ile	Val	Met	Ser	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Val	Gly	Glu	
			690					695					700			
Lys	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser	Ser	
705						710					715					720
Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	
			725					730					735			
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Lys	Ser	Gly	Val	Pro	
			740					745					750			
Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	
			755					760					765			
Ser	Ser	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	
			770					775					780			
Ser	Ser	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg		

785

790

795

<210> 47

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Линкер

<400> 47

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15

<210> 48

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Линкер

<400> 48

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg

1

5

10

15

Val

<210> 49

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Линкер

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

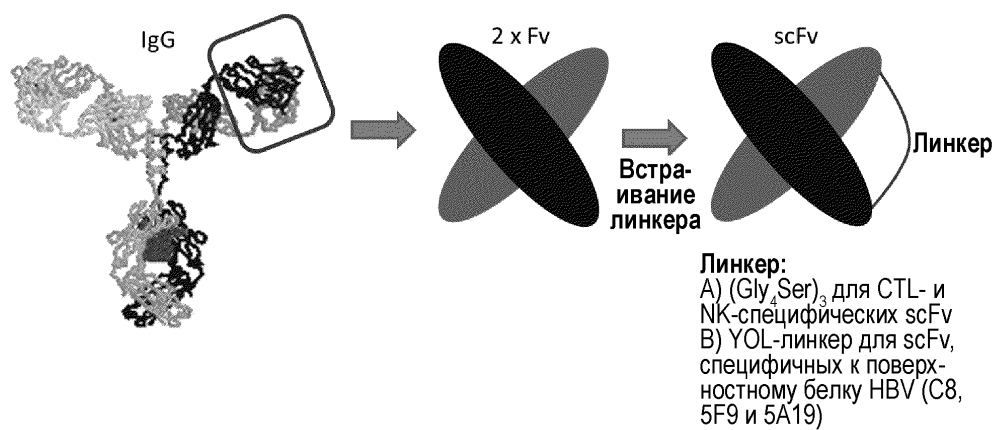
Gly Gly Gly Ser

20

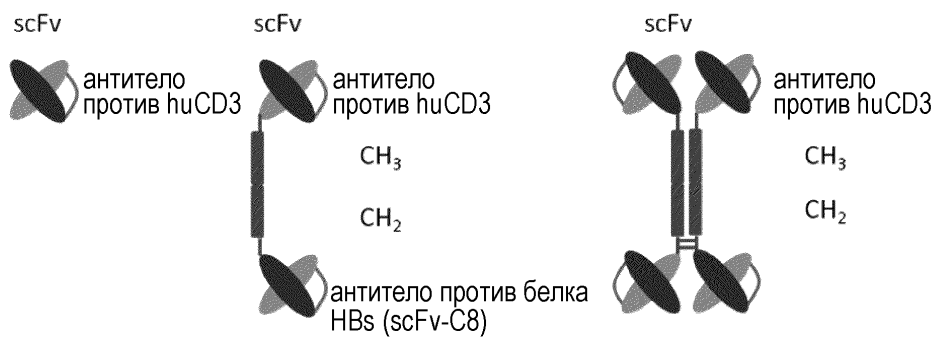


1/14

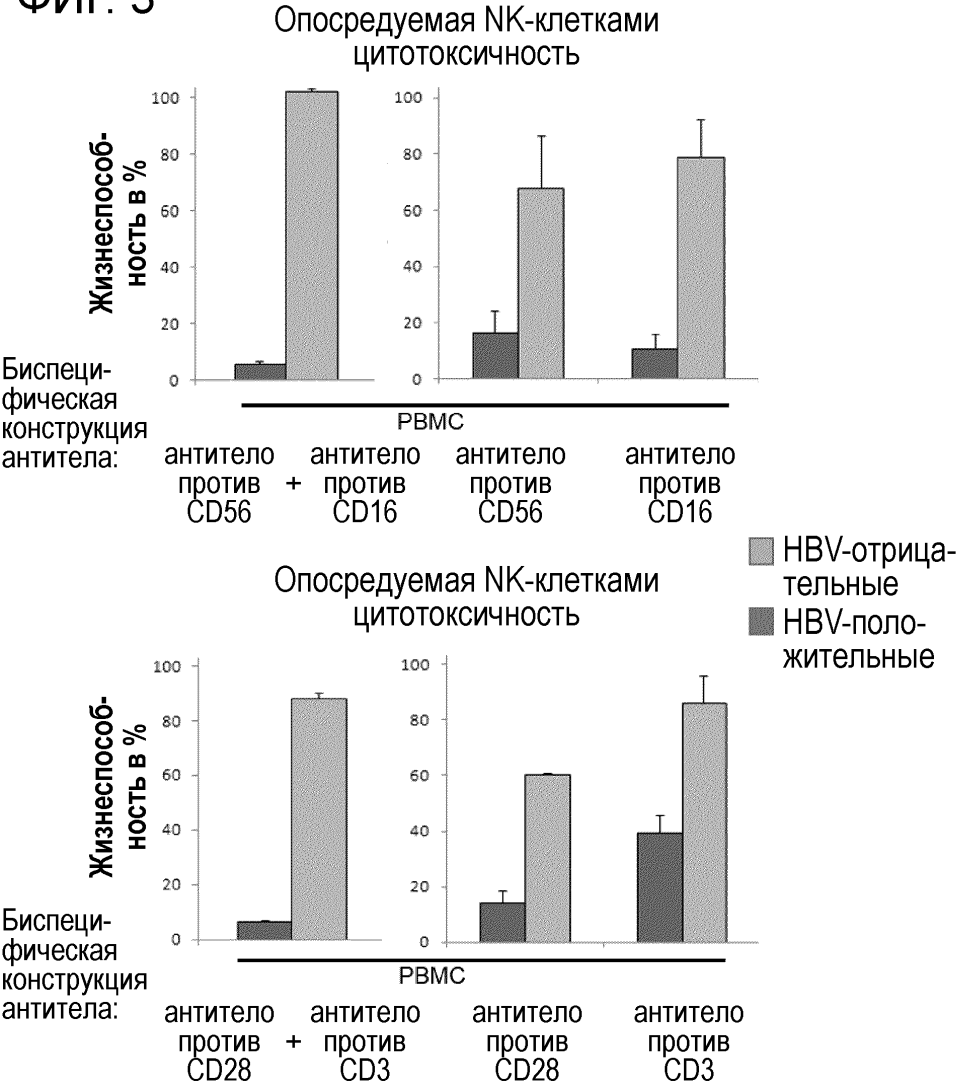
ФИГ. 1



ФИГ. 2

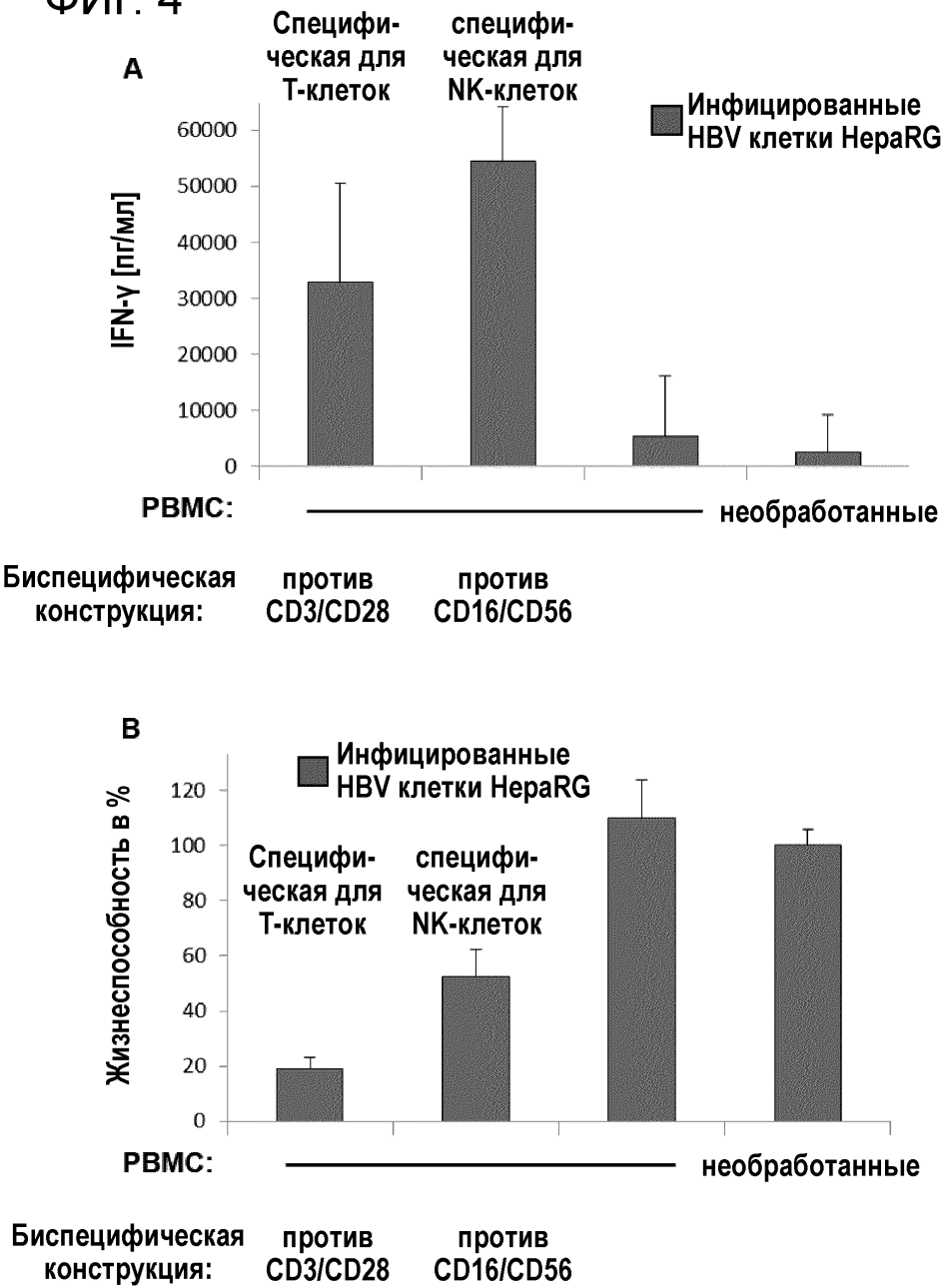


ФИГ. 3



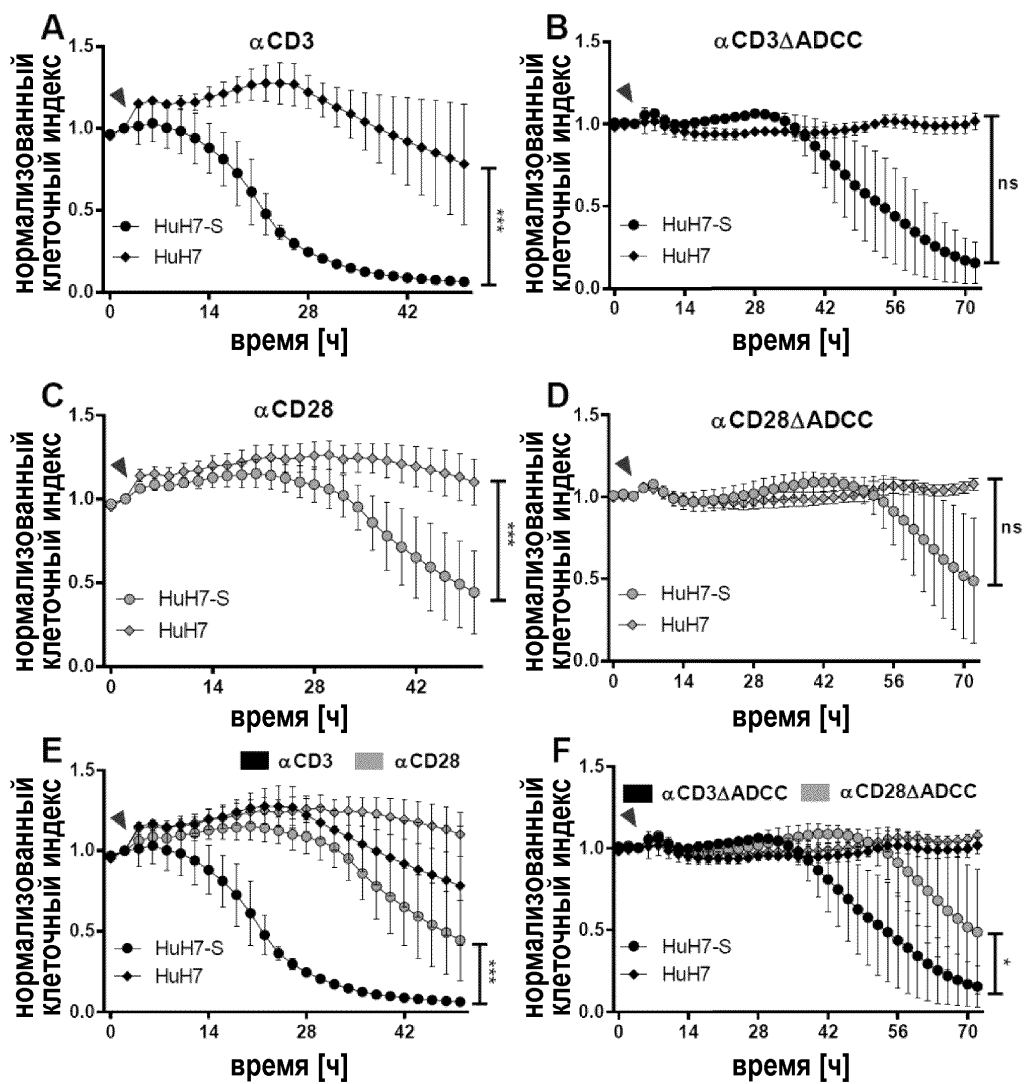
3/14

ФИГ. 4



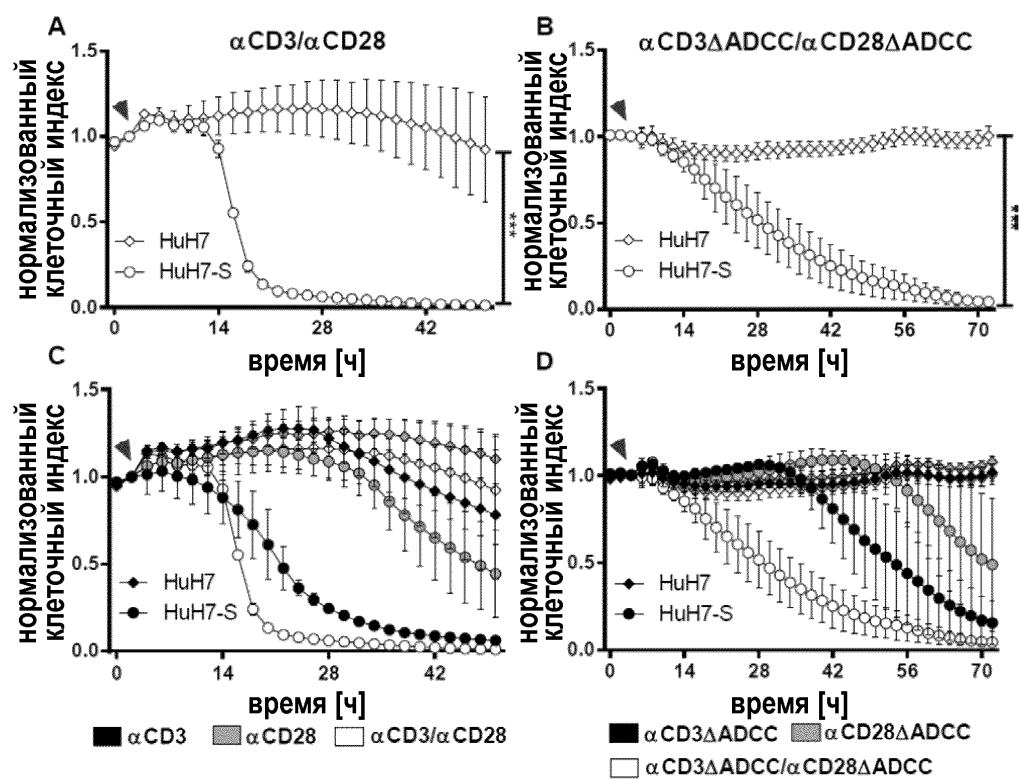
4/14

ФИГ. 5



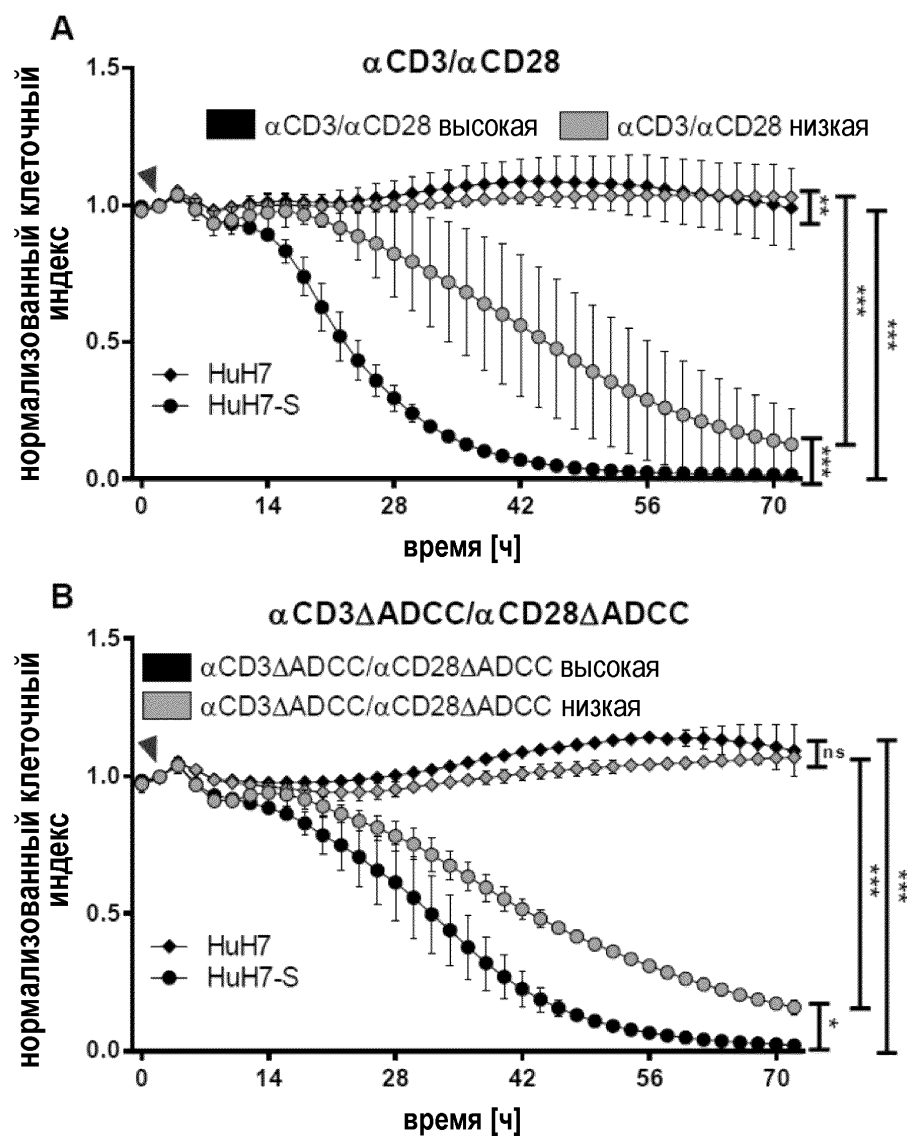
5/14

ФИГ. 6



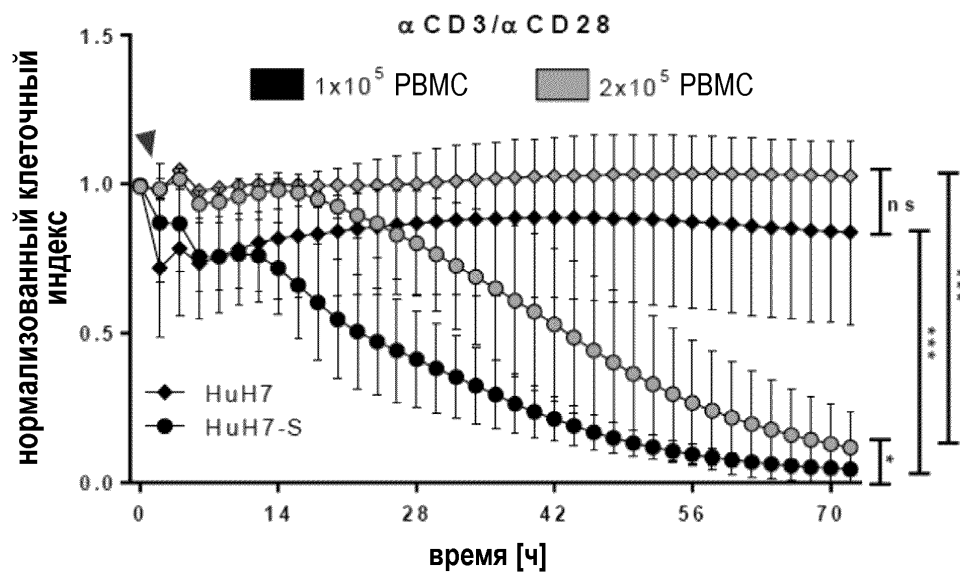
6/14

ФИГ. 7

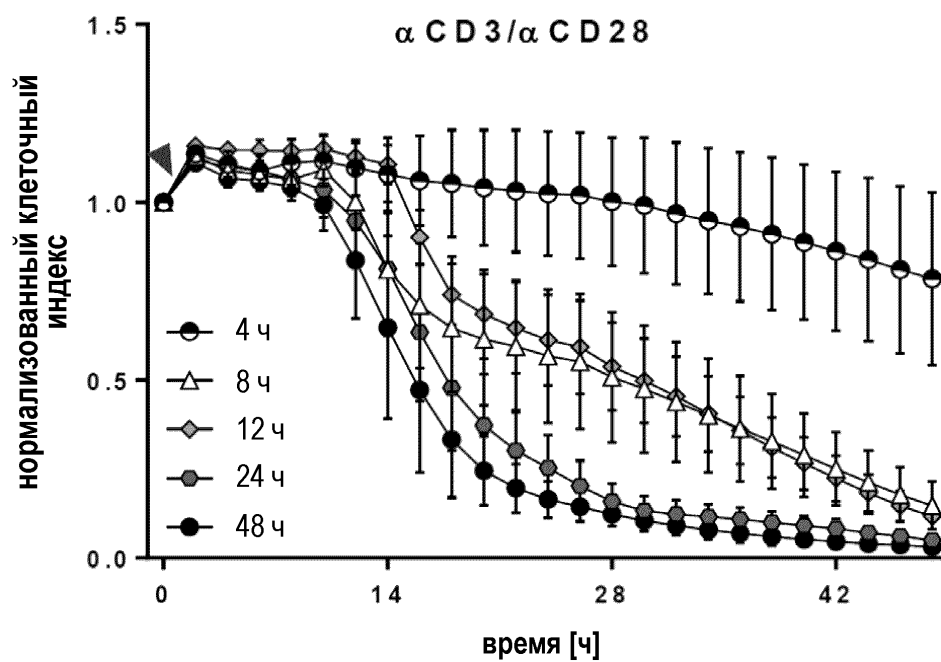


7/14

ФИГ. 8

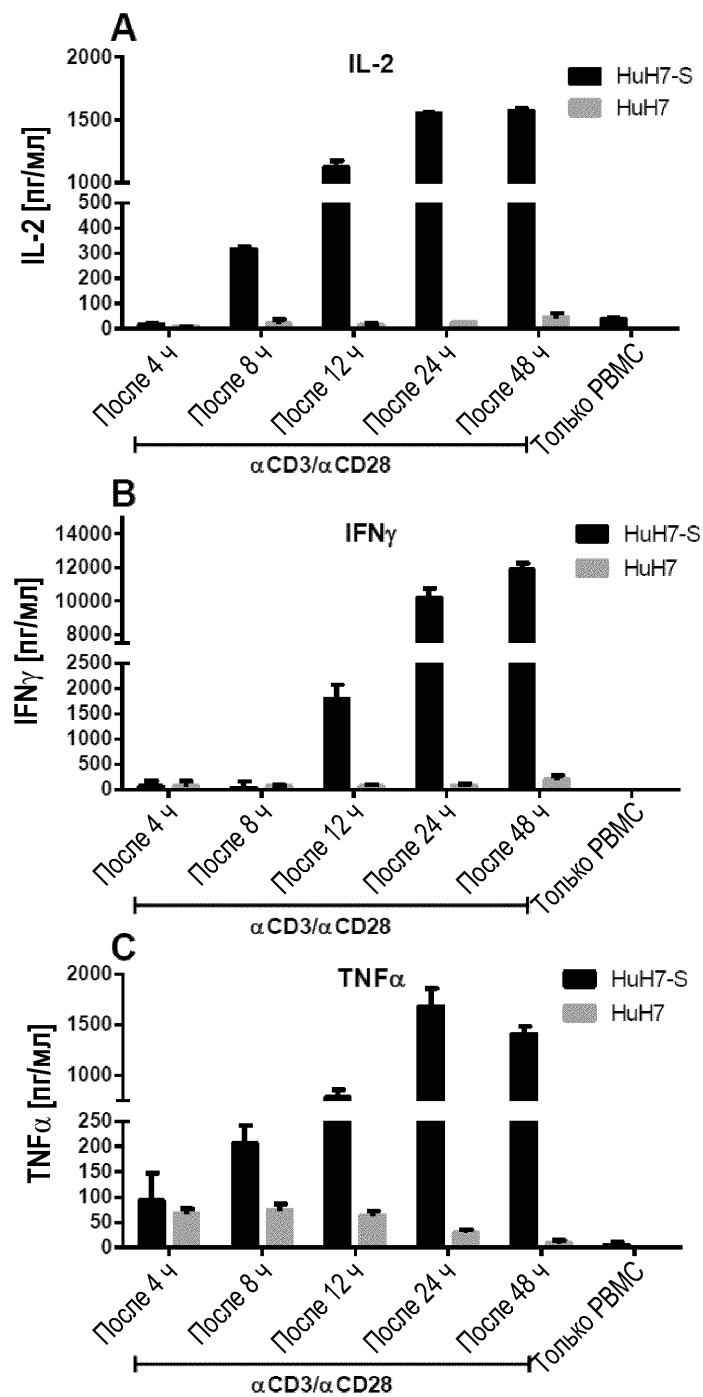


ФИГ. 9



8/14

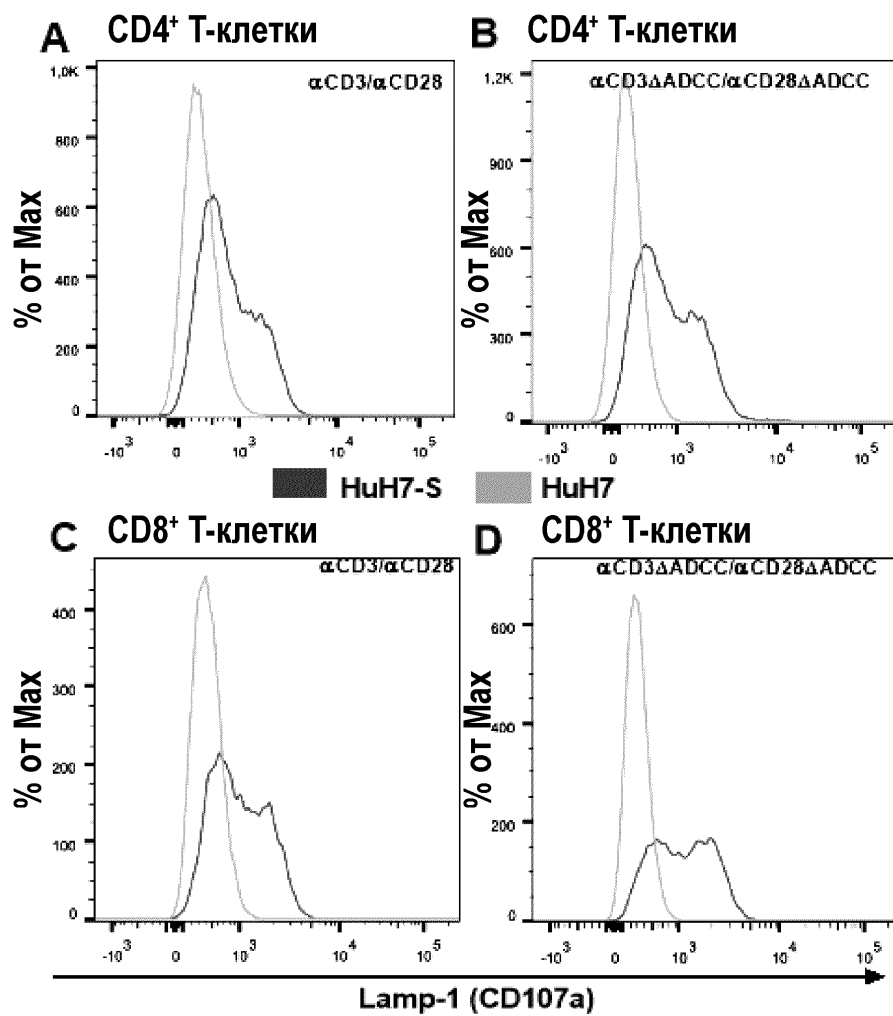
ФИГ. 10





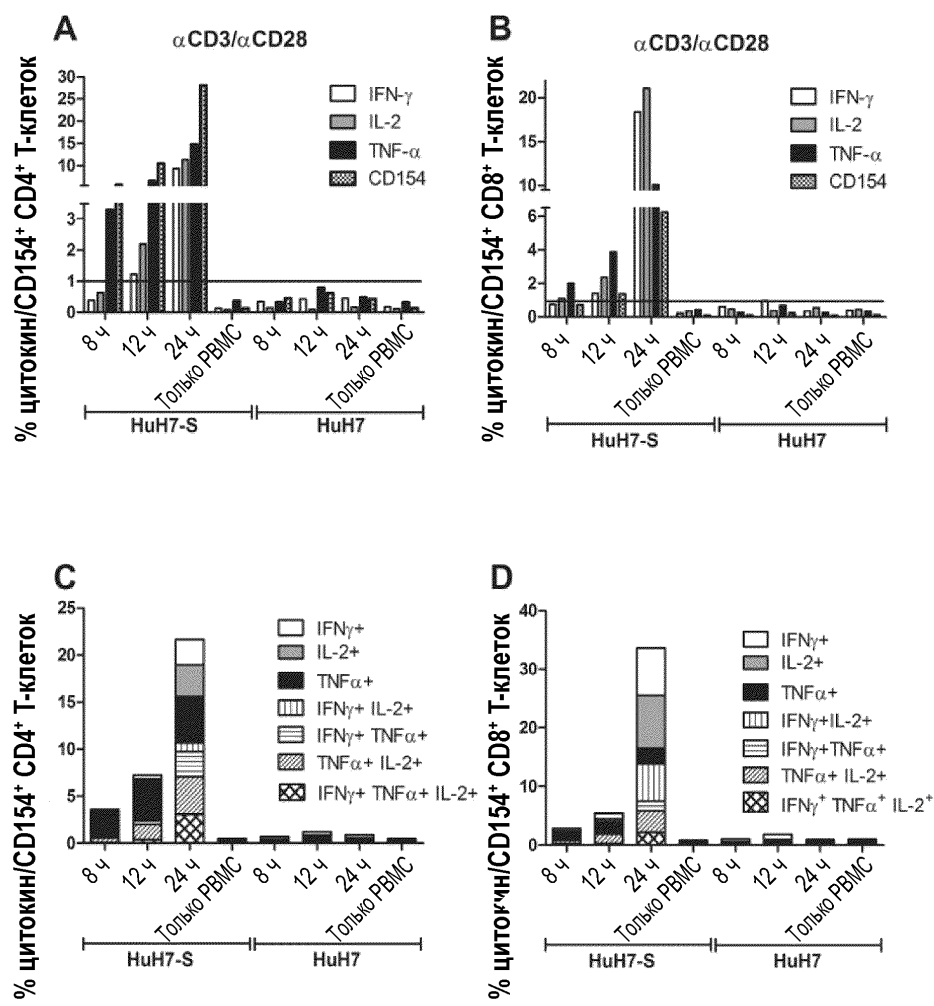
9/14

ФИГ. 11

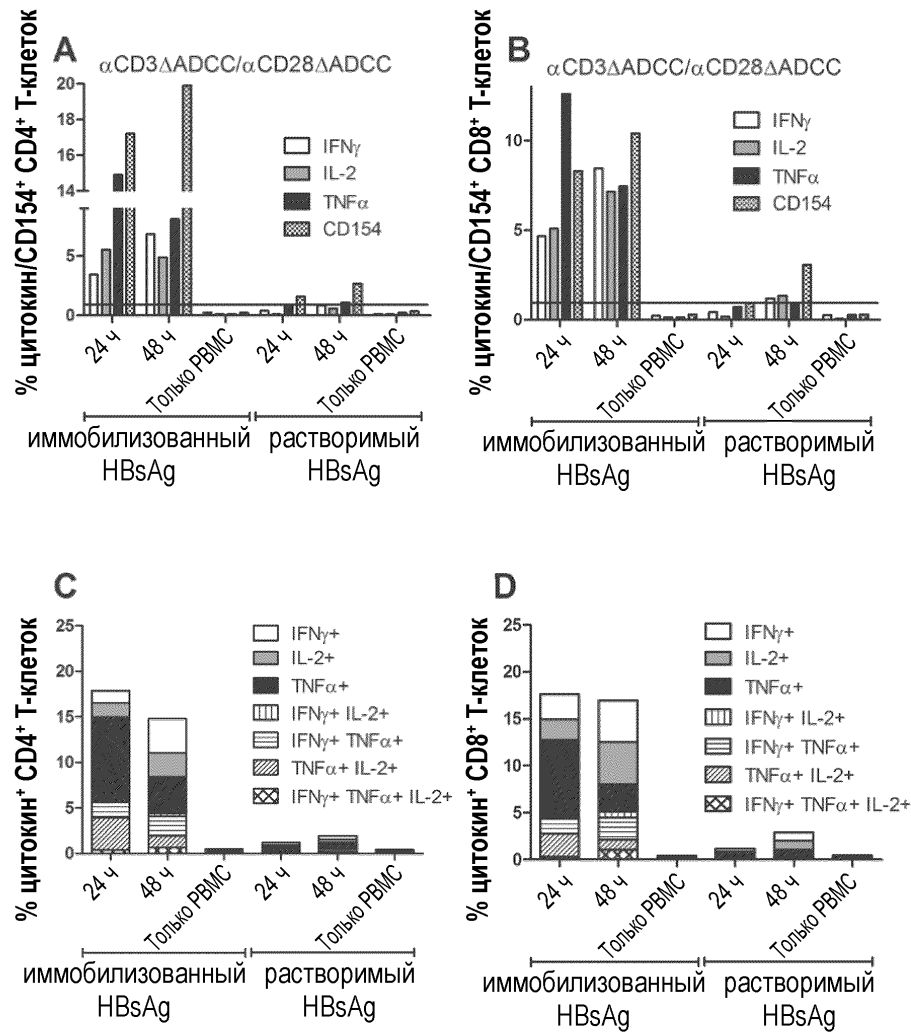


10/14

ФИГ. 12

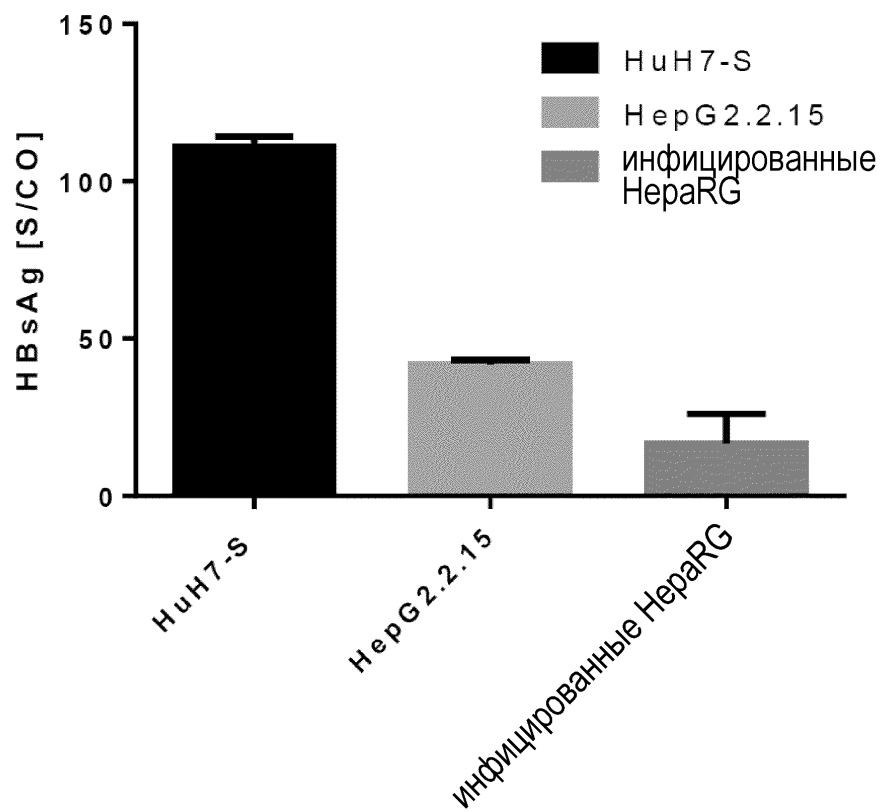


ФИГ. 13



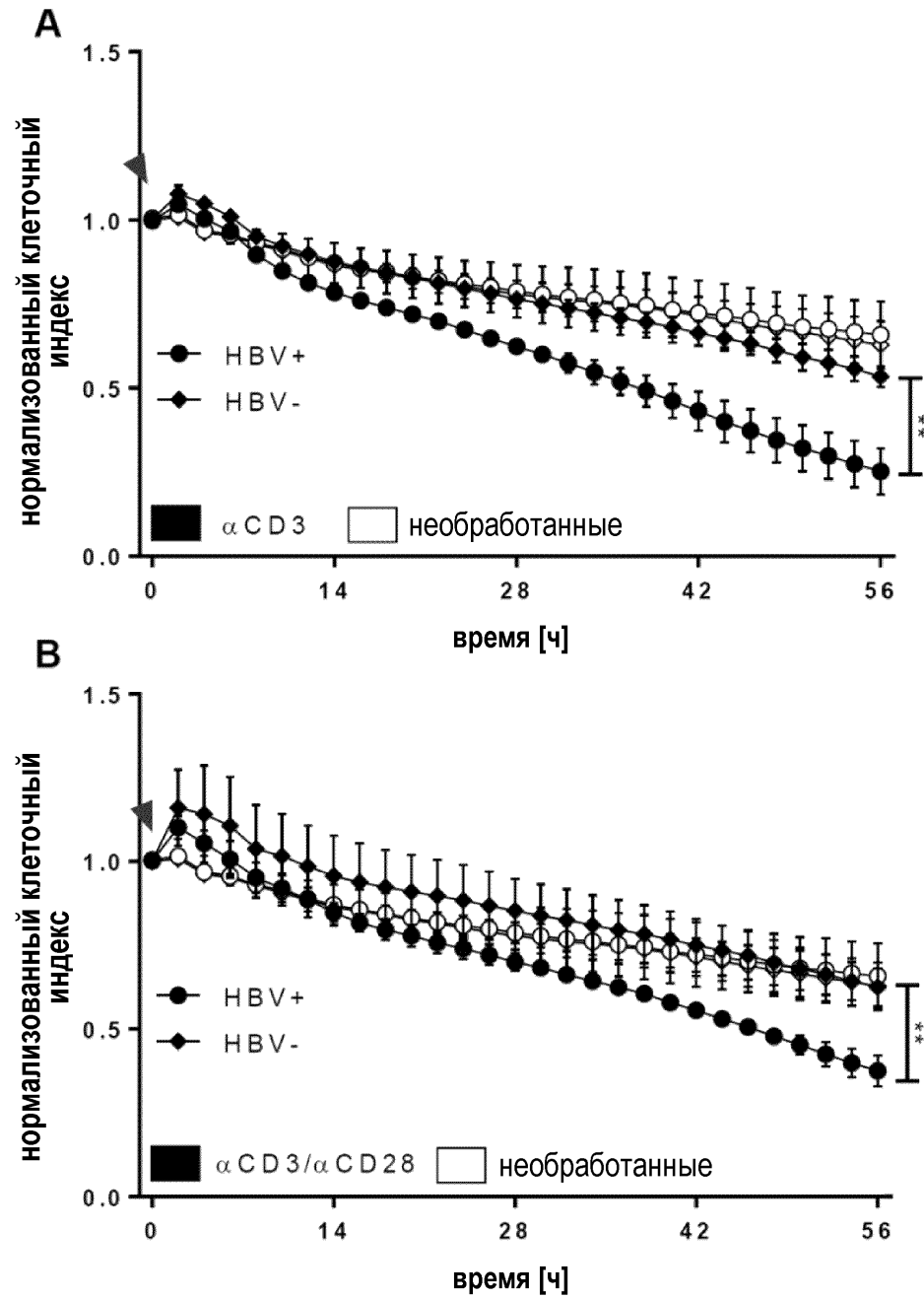
12/14

ФИГ. 14



13/14

ФИГ. 15



14/14

ФИГ. 16

