

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491154 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.09

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.11.18

(54) МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, СОДЕРЖАЩИЕ PD-1- И TGF- β RII-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ДОМЕНЫ

(31) 2029844

(32) 2021.11.19

(33) NL

(86) PCT/EP2022/082377

(87) WO 2023/089083 2023.05.25

(71) Заявитель:
МЕРИУС Н.В. (NL); ИНСАЙТ
КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
Гейхен Сесилия Анна Вильгельмина
(NL), Майес Патрик, Стюарт Шон М.,
Ван Лян-Чуань (US)

(74) Представитель:
Абильманова К.С. (KZ)

(57) Настоящее изобретение относится к мультиспецифической связывающей молекуле, содержащей PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где PD-1-связывающий домен блокирует PD-1-опосредованную передачу сигналов, а TGF- β RII-связывающий домен блокирует TGF- β RII-опосредованную передачу сигналов. Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции, содержащей такую мультиспецифическую связывающую молекулу, к способу лечения с применением такой мультиспецифической связывающей молекулы и к клетке, продуцирующей такую мультиспецифическую связывающую молекулу.

202491154

A1

A1

202491154

МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, СОДЕРЖАЩИЕ PD-1- И TGF-βRII-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ДОМЕНЫ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области антител. В частности, оно относится к области терапевтических антител для лечения заболеваний, в которых задействованы аберрантные клетки. Более конкретно, оно относится к мультиспецифическим связывающим молекулам, содержащим связывающий домен, который связывается с PD-1, и связывающий домен, который связывается с TGF-βRII.

Уровень техники

Хотя Т-лимфоциты и известны своей ролью в иммунонадзоре за опухолями, раковые клетки способны ускользать от иммунного контроля путем индукции ингибирующих иммунных путей. И поэтому блокировка иммунных контрольных точек (ICB), при которой антитела применяют для блокирования ингибирующих иммунных путей, стала многообещающим терапевтическим вариантом и была продемонстрирована в доклинических и клинических исследованиях для усиления и поддержания эндогенного иммунитета против определенных форм рака.

Белок запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1) и лиганд запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-L1) являются компонентами иммуносупрессивной сети, которая подавляет активность Т-клеток при нормальной физиологии, но которая может быть использована опухолями для супрессии опосредованных Т-клетками противоопухолевых иммунных ответов. Антитела к PD-1 и PD-L1 привели к улучшению ответов и выживаемости у некоторых пациентов, страдающих несколькими различными формами рака. Однако, несмотря на многообещающую клиническую активность, лишь меньшинство пациентов дают ответ на терапию антителами к PD-1/PD-L1 с

ограниченной длительностью. Таким образом, существует острая потребность в разработке новых, безопасных и эффективных средств для терапии для лечения рака.

Белок запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1) представляет собой рецептор на клеточной поверхности, который принадлежит к семейству рецепторов CD28 и экспрессируется на Т-клетках и про-В-клетках. В настоящее время известно, что PD-1 связывает два лиганда: PD-L1 и PD-L2. PD-1, который выполняет функцию иммунной контрольной точки, играет важную роль в даунрегуляции иммунной системы путем ингибирования активации Т-клеток, что, в свою очередь, при наличии на соматических клетках, уменьшает аутоиммунитет и способствует ауто толерантности. Считается, что ингибирующий эффект PD-1 достигается за счет двойного механизма стимулирования апоптоза (запрограммированной клеточной гибели) в антигенспецифичных Т-клетках в лимфатических узлах при одновременном уменьшении апоптоза в регуляторных Т-клетках (супрессорных Т-клетках). PD-1 также известен под различными альтернативными названиями, такими как PDCD1, рецептор запрограммированной клеточной гибели 1, фактор восприимчивости к системной красной волчанке 2, белок PD-1, HPD-1, PD1, белок запрограммированной клеточной гибели 1, антиген CD279, CD279, HPD-L, HSLE1, SLEB2 и PD-1. Внешние идентификаторы для PD-1: HGNC: 8760; Entrez Gene: 5133; Ensembl: ENSG00000188389; OMIM: 600244; и UniProtKB: Q15116. Новые классы лекарственных средств, которые блокируют активность PD-1, т.е. ингибиторы PD-1, активируют иммунную систему, заставляя ее атаковать опухоли, и по этой причине их применяют для лечения некоторых типов рака.

Моноклональные антитела, нацеленные на PD-1, были одобрены для лечения различных злокачественных новообразований. Например, частота ответа у пациентов с меланомой, которых лечили антителом к PD-1 (пембролизумабом), составляет 33% через 3 года, несмотря на то, что первоначально на него давали ответ 70-80% пациентов (Ribas A. et al. Association of Pembrolizumab With Tumor

Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. JAMA. 2016 Apr 19;315(15):1600-9).

Передача сигналов TGF- β регулирует множество физиологических и патологических процессов, в том числе блокировку клеточного цикла в эпителиальных и гематопозитических клетках, контроль за пролиферацией и дифференцировкой мезенхимальных клеток, заживление ран, продуцирование внеклеточного матрикса, иммуносупрессию и канцерогенез (Massagué J. TGF β signalling in context. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012 Oct;13(10):616-30). Кроме того, передача сигналов TGF- β регулирует многочисленные функции раковых клеток, в том числе прогрессирование клеточного цикла, апоптоз, адгезию и дифференцировку (Liu S et al, Signal Transduction and targeted Therapy, 2021). TGF- β характеризуется двухфазной функцией, так что в нормальных и предраковых клетках он преимущественно регистрируется в роли супрессора опухоли, тогда как в опухолевых клетках он обеспечивает функции, стимулирующие рост, и эпителиально-мезенхимальный переход, что, в свою очередь, делает возможной миграцию, инвазию, интравазацию и экстравазацию опухолевым клеткам.

TGF- β RII является представителем семейства серин/треониновых протеинкиназ и подсемейства рецепторов TGF β . Он известен под различными синонимами, в том числе TGFBR2, AAT3, FAA3, LDS1B, LDS2, LDS2B, MFS2, RIIC, TAAD2, TGFR-2, TGFbeta-RII, рецептор трансформирующего фактора роста бета 2, TBR-ii и TBRII. TGF- β RII образует гетеродимерный комплекс с другим рецепторным белком и связывает TGF- β . Данный комплекс рецептор/лиганд фосфорилирует белки, которые затем попадают в ядро и регулируют транскрипцию субпопуляции генов, связанных с пролиферацией клеток.

Несколько ингибиторов, нацеленных на путь TGF- β , находятся в стадии доклинической и клинической разработки и ингибируют TGF- β на разных уровнях; т. е. на уровне лиганда, на уровне лиганда-рецептора или внутриклеточном уровне. К ингибиторам относятся, например, TGF- β -

нейтрализующие моноклональные антитела, антитела к TGF- β RII, растворимые рецепторы, ловушки лигандов антител (например, молекулы к PD-L1-TGF- β RII/ECF), антисмысловые олигонуклеотиды для предупреждения синтеза TGF- β , аллогенная раковая клеточная вакцина, модифицированная антисмысловым геном TGF- β 2, и низкомолекулярные соединения, нацеленные на домен киназы TGF- β RI.

Сообщается, что при нацеливании на путь TGF- β с помощью моноспецифического антитела наблюдается противоопухолевая активность *in vitro* и *in vivo*, однако все еще сохраняются плохие клинические результаты, низкая эффективность и неприемлемая токсичность, в том числе основной синдром высвобождения цитокинов (CRS). Было предпринято комбинированное целенаправленное воздействие на путь TGF- β и ингибирование иммунных контрольных точек с помощью бинтрафуса альфа, бифункционального слитого белка к PD-L1 – TGFBR2, но при этом не наблюдали сильного клинического эффекта.

Сохраняется потребность в новых терапевтических вмешательствах, которые позволяют селективно ингибировать передачу сигналов TGF- β в активированных опухолеспецифичных PD-1-экспрессирующих Т-клетках локально в микроокружении опухоли для стимуляции инфильтрации Т-клеток в опухоль, а также восстановления и поддержки активности противоопухолевых Т-клеточных эффекторов. Такое целенаправленное воздействие облегчит воздействие на иммуносупрессивные пути, эффективно стимулируя функцию CTL и память Т-клеток для эффективного и долгосрочного устранения онкологии, одновременно минимизируя токсичность, связанную с системной блокировкой TGF- β .

Краткое описание изобретения

Одной из целей настоящего изобретения является создание нового фармацевтического средства для лечения заболевания человека, в частности, для лечения рака. Данная задача решается путем создания мультиспецифических

связывающих молекул, например, биспецифических антител, которые связывают PD-1 и TGF- β RII. Целью PD-1-связывающего домена мультиспецифических связывающих молекул является управление специфичностью мультиспецифической связывающей молекулы в отношении активированных/истощенных эффекторных Т-клеток в опухолях и дренирующих опухолевые клетки лимфатических узлов, при этом TGF- β RII-связывающий домен может локально блокировать связывание TGF- β с TGF- β RII для снижения системной токсичности ингибирования TGF- β на клетках, отличных от Т-клеток. Кроме того, мультиспецифические связывающие молекулы облегчают как PD1-, так и TGF- β -опосредованные иммуносупрессивные пути, способствуя цитотоксической активности Т-лимфоцитов в микроокружении опухоли.

Настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где PD-1-связывающий домен блокирует PD-1-опосредованную передачу сигналов, а TGF- β RII-связывающий домен блокирует TGF- β RII-опосредованную передачу сигналов.

Настоящим изобретением также предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где PD-1-связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, которые описаны далее в данном документе.

Настоящим изобретением также предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где TGF- β RII-связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, которые описаны далее в данном документе.

Настоящим изобретением дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество мультиспецифической связывающей молекулы, которая описана в данном документе.

Настоящим изобретением дополнительно предложена мультиспецифическая связывающая молекула, которая описана в данном документе, и фармацевтическая композиция, которая описана в данном документе, для применения в терапии.

Настоящим изобретением дополнительно предложена мультиспецифическая связывающая молекула, которая описана в данном документе, и фармацевтическая композиция, которая описана в данном документе, для применения при лечении рака.

Настоящим изобретением дополнительно предложен способ лечения заболевания, предусматривающий введение эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы, которая описана в данном документе, или фармацевтической композиции, которая описана в данном документе, нуждающемуся в этом индивидууму.

Настоящим изобретением дополнительно предложен способ лечения рака, предусматривающий введение эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы, которая описана в данном документе, или фармацевтической композиции, которая описана в данном документе, нуждающемуся в этом индивидууму.

Настоящим изобретением дополнительно предложена клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи PD-1-связывающего домена, который описан в данном документе, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи TGF- β RII-связывающего домена, который описан в данном документе.

Настоящим изобретением дополнительно предложена клетка, продуцирующая мультиспецифическую связывающую молекулу, которая описана в данном документе.

Подробное описание

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где PD-1-связывающий домен блокирует PD-1-опосредованную передачу сигналов, а TGF- β RII-связывающий домен блокирует TGF- β RII-опосредованную передачу сигналов.

В контексте данного документа «блокировать» или «блокирование» означает вмешательство или изменение взаимодействия между лигандом и рецептором или приведение к полному или частичному снижению каскада передачи сигналов. В контексте настоящего изобретения в определенных вариантах осуществления эффективность в блокировании индуцированной лигандом передачи сигналов PD-1 определяют с помощью анализа рекрутирования SHP, который описан в примере 2, или анализа NFAT по гену-репортеру, который описан в примере 3. В определенных вариантах осуществления эффективность в блокировании индуцированной лигандом передачи сигналов PD-1 определяют с помощью анализа рекрутирования SHP, который описан в примере 2. В определенных вариантах осуществления эффективность в блокировании индуцированной лигандом передачи сигналов PD-1 определяют с помощью анализа NFAT по гену-репортеру, который описан в примере 3. В контексте настоящего изобретения в определенных вариантах осуществления эффективность в блокировании индуцированной лигандом передачи сигналов TGF- β RII определяют с помощью анализа SMAD, который описан в примере 4 или 5. В определенных вариантах осуществления эффективность в блокировании индуцированной лигандом передачи сигналов TGF- β RII определяют с помощью анализа SMAD, который описан в примере 4. В определенных вариантах осуществления эффективность в блокировании

индуцированной лигандом передачи сигналов TGF- β RII определяют с помощью анализа SMAD, который описан в примере 5.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению связывает PD-1 человека. В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению блокирует связывание PD-L1 с PD-1, например, по результатам измерения в анализе, описанном в примере 2 или 3.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению связывается с TGF- β RII человека. TGF- β RII человека представляет собой трансмембранный белок, у которого существуют различные изоформы. Аминокислотная последовательность изоформы А TGF- β RII человека представлена под SEQ ID NO: 82, аминокислотная последовательность внеклеточного домена изоформы А TGF- β RII человека представлена под SEQ ID NO: 83. Изоформа В TGF- β RII человека представляет собой сплайс-вариант, кодирующий более длинную изоформу вследствие вставки во внеклеточный домен. Аминокислотная последовательность изоформы В TGF- β RII человека представлена под SEQ ID NO: 84, аминокислотная последовательность внеклеточного домена изоформы В TGF- β RII человека изложена под SEQ ID NO: 85.

«Связывающая молекула» относится к белковой молекуле и включает, например, все форматы антител, доступные в данной области техники, такие как, например, полноразмерное антитело IgG, иммуноконъюгаты, диатела, BiTE, Fab-фрагменты, scFv, тандемные scFv, однодоменное антитело (такое как VHH и VH), минитела, scFab, scFv-зиппер, нанотела, молекулы DART, тандемное антитело (TandAb), Fab-scFv, F(ab)'₂, F(ab)'₂-scFv₂ и интратела.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула представляет собой мультиспецифическое антитело. Мультиспецифическое антитело согласно настоящему изобретению

представляет собой антитело, которое содержит по меньшей мере два связывающих домена, которые характеризуются специфичностью по меньшей мере к двум различным мишеням или эпитопам. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой биспецифическое антитело. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению может дополнительно содержать Fc-участок или его часть. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой антитело IgG1. Константные участки связывающей молекулы по настоящему изобретению могут содержать одну или несколько модификаций, которые модулируют свойства связывающей молекулы, отличные от ее свойств связывания с целевыми антигенами. Например, константные участки могут содержать одну или несколько модификаций, которые способствуют гетеродимеризации тяжелых цепей PD-1 и TGF- β RII в результате гомодимеризации двух тяжелых цепей PD-1 и/или двух тяжелых цепей TGF- β RII, и/или константные участки могут содержать одну или несколько модификаций, которые снижают или улучшают эффекторную функцию, в частности, одну или несколько модификаций, которые снижают эффекторную функцию.

«Fab» обычно означает связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, переменный участок легкой цепи, CH1 и участок CL.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит один Fab-домен, который связывается с PD-1, один Fab-домен, который связывается с TGF- β RII, и Fc-участок. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению состоит из одного Fab-домена, который связывается с PD-1, одного Fab-домена, который связывается с TGF- β RII, и Fc-участка. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению

фактически состоит из одного Fab-домена, который связывается с PD-1, одного Fab-домена, который связывается с TGF- β RII, и Fc-участка.

«Fc-участок» обычно содержит шарнирный участок, участок CH2 и CH3. К подходящему шарнирному участку относится без ограничения шарнирный участок, аминокислотная последовательность которого изложена под SEQ ID NO: 68. К подходящим участкам CH2 и CH3 относятся без ограничения участок CH2, аминокислотная последовательность которой изложена под SEQ ID NO: 70 или 71, и участок CH3, аминокислотная последовательность которой изложена под SEQ ID NO: 72 или 73 и 74.

Участок CL, CH1, CH2 и/или CH3 можно модифицировать в соответствии с известными из уровня техники способами с целью получения благоприятных характеристик антитела, в том числе, например, для стимуляции гетеродимеризации различных тяжелых цепей, для улучшения образования пары тяжелая-легкая цепь и для усиления или снижения эффекторной функции иммунных клеток.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы блокирует PD-1-опосредованную передачу сигнала, а TGF- β RII-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы блокирует TGF- β RII-опосредованную передачу сигнала в активированных Т-клетках, в частности, в активированных опухолеспецифических Т-клетках.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению характеризуется более высокой эффективностью в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих как PD-1, так и TGF- β RII, нежели в клетках, экспрессирующих TGF- β RII и не экспрессирующих, практически не экспрессирующих или характеризующихся низкими уровнями экспрессии PD-1.

Таким образом, настоящим изобретением также предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где мультиспецифическая связывающая молекула характеризуется более высокой эффективностью в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих как PD-1, так и TGF- β RII, нежели в клетках, экспрессирующих TGF- β RII и не экспрессирующих, практически не экспрессирующих или характеризующихся низкими уровнями экспрессии PD-1.

В определенных вариантах осуществления клетки, экспрессирующие как PD-1, так и TGF- β RII, представляют собой клетки Jurkat-PD-1⁺, такие как, например, Т-клетки Jurkat, экспрессирующие PD-1 человека и люциферазный репортер под управлением элементом ответа с NFAT (NFAT-RE), а клетки, экспрессирующие TGF- β RII и не экспрессирующие PD-1, представляют собой клетки Jurkat-PD-1^{null}, такие как, например, Jurkat-PD-1^{null}. Т-клетки Jurkat, экспрессирующие PD-1 человека и люциферазный репортер под управлением NFAT-RE, коммерчески доступны, например, от компании Promega (кат. № CS187105 - часть набора CS187106 и CS187107); клетки Jurkat-PD-1^{null} общедоступны, например, в ATCC (кат. № TIB-152).

В определенных вариантах осуществления клетки, экспрессирующие как PD-1, так и TGF- β RII, являются простимулированными CD4⁺ или CD8⁺ клетками, а клетки, экспрессирующие TGF- β RII и низкие уровни PD-1, являются непростимулированными CD4⁺ или CD8⁺ клетками. В определенных вариантах осуществления простимулированные CD4⁺ или CD8⁺ клетки являются простимулированными рекомбинантным TGF- β 1 человека.

В определенных вариантах осуществления клетки, экспрессирующие как PD-1, так и TGF- β RII, представляют собой клетки HEK-Blue™ TGF- β -PD-1⁺, такие как, например, описанные в примере 7, а клетки, экспрессирующие TGF- β RII и не экспрессирующие PD-1, представляют собой клетки HEK-Blue™ TGF- β , такие как, например, клетки HEK-Blue™ TGF- β . Клетки HEK-Blue™ TGF- β ,

коммерчески доступные, например, от компании Invivogen (кат. № hkb-tgfb), представляют собой стабильно трансфицированные клетки HEK 293 эмбриональных почек человека, содержащие гены TGFBR1, Smad3 и Smad4 человека. Дополнительно они экспрессируют репортерный ген SEAP, индуцируемый Smad3/4-связывающими элементами (SBE).

В определенных вариантах осуществления отсутствие, практически отсутствие или низкий уровень PD-1 относится к уровню PD-1 на поверхности клетки, который не поддается детекции в подходящем анализе, который изложен в данном документе. В определенных вариантах осуществления низкий уровень PD-1 означает, что на поверхности клетки присутствует менее 100 молекул PD-1. В определенных вариантах осуществления уровень PD-1 измеряют с помощью методологии с микроносителями Quantibrite.

В контексте настоящего изобретения определение того, характеризуется ли мультиспецифическая связывающая молекула более высокой эффективностью в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих как PD-1, так и TGF- β RII, нежели в клетках, экспрессирующих TGF- β RII и не экспрессирующих, практически не экспрессирующих или характеризующихся низкими уровнями экспрессии PD-1, осуществляют с помощью одного из анализов, описанных в данном документе.

Данные об эффективности мультиспецифических связывающих молекул, представленных в данном документе, получены с помощью анализа фосфо-SMAD2/3, который описан в примерах 4 и 5, и анализа изогенных HEK-BLUE-PD-1 TGF- β -клеток по гену-репортеру, который описан в примере 7. Следовательно, в определенных вариантах осуществления эффективность в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов измеряют с помощью анализа фосфо-SMAD2/3, который описан в примере 4 или примере 5.

Если вкратце: анализ фосфо-SMAD2/3, который описан в примере 4, проводят с применением клеток Jurkat-PD-1^{null} и Jurkat-PD-1⁺, культивированных в среде RPMI/10% FBS. Клетки инкубируют с тестируемыми или контрольными

антителами в 6-ступенчатых серийных разведениях (от 100 мкг/мл до 0,001 мкг/мл) в течение одного часа в условиях 37°C/5% CO₂. Через один час вносят рекомбинантный TGF-β1 человека в конечной концентрации 10 нг/мл и инкубируют клетки еще два часа в условиях 37°C/5% CO₂. После инкубации клетки осторожно промывают посредством PBS. Клеточные лизаты получают с применением лизирующего буфера, содержащего ингибиторы фосфатаз и ингибиторы протеаз. Уровни фосфо-SMAD2/3 определяют с помощью ELISA.

Если вкратце: анализ фосфо-SMAD2/3, который описан в примере 5, проводят с применением PBMC от здоровых доноров, которые простимулированы посредством 1 мкг/мл антитела к CD3 в течение 48 часов с последующей 16-часовой депривацией сыворотки крови в 0,1% FBS. Простимулированные и непростимулированные PBMC инкубируют с тестируемыми и контрольными антителами в течение 30 минут при комнатной температуре. Вносят рекомбинантный TGF-β1 человека в конечной концентрации 1 нг/мл и клетки инкубируют еще 30 минут. Наконец, клетки дважды промывают посредством PBS и окрашивают на маркеры клеточной поверхности с последующим внутриклеточным окрашиванием фосфо-SMAD2. Проточную цитометрию проводят для гейтирования CD4⁺ и CD8⁺ клеток. Сигнал фосфо-SMAD2 измеряют по средней геометрической интенсивности флуоресценции (GMFI) в данных клетках.

В определенных вариантах осуществления эффективность в блокировании TGF-βRII-опосредованной передачи сигналов измеряют с помощью анализа изогенных HEK-BLUE-PD-1 TGF-β-клеток по гену-репортеру, который описан в примере 7.

Если вкратце: анализ HEK-BLUE-PD-1 TGF-β-клеток по гену-репортеру проводят с применением клеток HEK-Blue™ TGF-β и клеток HEK-Blue™ TGF-β-PD-1⁺ в количестве 25000 клеток на лунку. Вносят серийные разведения тестируемых и контрольных антител и клетки инкубируют в течение одного часа при комнатной температуре с последующим внесением рекомбинантного TGF-

$\beta 1$ в конечной концентрации 1 нг/мл. Клетки инкубируют в условиях 37°C/ 5% CO₂ в течение ночи. После инкубации 40 мкл супернатантаов и 160 мкл ресуспендированного раствора QUANTI-Blue™ инкубируют в условиях 37°C/5% CO₂ в течение 40 минут. Количество секретированного SEAP в супернатанте оценивают с использованием раствора QUANTI-Blue™. Уровни SEAP определяют с помощью спектрофотометра при длине волны 650 нм.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению характеризуется эффективностью в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих как PD-1, так и TGF- β RII, по меньшей мере приблизительно в 10 раз, предпочтительно приблизительно в 10-100000 раз выше, чем в клетках, экспрессирующих TGF- β RII и не экспрессирующих PD-1. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению характеризуется эффективностью в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих как PD-1, так и TGF- β RII, по меньшей мере в 10 раз, предпочтительно в 10-100000 раз выше, чем в клетках, экспрессирующих TGF- β RII и не экспрессирующих PD-1. В определенных вариантах осуществления эффективность в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов определена по IC₅₀ (мкг/мл) в анализе фосфо-SMAD2/3 или анализе HEK-BLUE-PD-1 TGF- β по гену-репортеру. В определенных вариантах осуществления эффективность в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов определена по IC₅₀ (мкг/мл) в анализе фосфо-SMAD2/3. В определенных вариантах осуществления эффективность в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов определена по IC₅₀ (мкг/мл) в анализе HEK-BLUE-PD-1 TGF- β по гену-репортеру.

В определенных вариантах осуществления эффективность мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов в клетках,

экспрессирующих TGF- β RII и не экспрессирующих, практически не экспрессирующих или характеризующихся низкими уровнями экспрессии PD-1, ниже, чем эффективность эталонного антитела к TGF- β RII, нацеленного на те же клетки, а эффективность мультиспецифической связывающей молекулы блокирования TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих как TGF- β RII, так и PD-1, выше, чем эффективность эталонного антитела к TGF- β RII, нацеленного на те же клетки, где эталонное антитело к TGF- β RII представляет собой бивалентное моноспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 77.

В определенных вариантах осуществления клетки, экспрессирующие как PD-1, так и TGF- β RII, представляют собой клетки Jurkat-PD-1⁺, простимулированные CD4⁺ или CD8⁺ клетки или клетки HEK-Blue™ TGF- β -PD-1⁺; клетки, экспрессирующие TGF- β RII и не экспрессирующие или практически не экспрессирующие PD-1, представляют собой клетки Jurkat-PD-1^{null} или клетки HEK-Blue™ TGF- β ; а клетки, экспрессирующие TGF- β RII и характеризующиеся низкими уровнями PD-1, представляют собой непростимулированные CD4⁺ или CD8⁺ клетки, которые описаны далее в данном документе.

В определенных вариантах осуществления эффективность мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих как TGF- β RII, так и PD-1, по меньшей мере в 10 раз, предпочтительно в 10-100000 раз выше, чем эффективность эталонного антитела к TGF- β RII. В определенных вариантах осуществления эффективность мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих как TGF- β RII, так и PD-1, по меньшей мере приблизительно в

10 раз, предпочтительно приблизительно в 10-100000 раз выше, чем эффективность эталонного антитела к TGF- β RII. В определенных вариантах осуществления эталонное антитело TGF- β RII представляет собой бивалентное моноспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 77. В определенных вариантах осуществления эффективность в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов определена по IC50 (мкг/мл) в анализе фосфо-SMAD2/3.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению характеризуется более высокой активностью в уменьшении объема опухоли, чем комбинация эталонных антител. В определенных вариантах осуществления комбинация эталонных антител представляет собой два бивалентных моноспецифических антитела, нацеленных на PD-1 и TGF- β RII, где бивалентное моноспецифическое антитело, нацеленное на PD-1, содержит тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 78, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 79, а бивалентное моноспецифическое антитело, нацеленное на антитело к TGF- β RII, содержит тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 77.

Таким образом, настоящим изобретением также предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где мультиспецифическая связывающая молекула характеризуется более высокой активностью в уменьшении объема опухоли, чем комбинация эталонных антител. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическую связывающую молекулу вносят дозой с количеством PD-1 и TGF- β RII-связывающих доменов в два - двадцать раз ниже

количества, чем в случае каждого из бивалентных моноспецифических антител из комбинации эталонных антител. Например, мультиспецифическая связывающая молекула, которая является моновалентной в отношении связывания с PD-1 и моновалентной в отношении связывания с TGF- β RII, при введении в дозе 1 мг/кг характеризуется более высокой активностью в уменьшении объема опухоли, чем комбинация эталонных антител, каждое из которых является бивалентным в отношении связывания с PD-1 или TGF- β RII и каждое из которых вводят в дозе 10 мг/кг. Также, мультиспецифическая связывающая молекула, которая является моновалентной в отношении связывания с PD-1 и моновалентной в отношении связывания с TGF- β RII, при введении в дозе 10 мг/кг характеризуется более высокой активностью в уменьшении объема опухоли, чем комбинация эталонных антител, каждое из которых является бивалентным в отношении связывания с PD-1 или TGF- β RII и каждое из которых вводят в дозе 10 мг/кг.

В определенных вариантах осуществления комбинация эталонных антител представляет собой два бивалентных моноспецифических антитела, нацеленных на PD-1 и TGF- β RII, где бивалентное моноспецифическое антитело, нацеленное на PD-1, содержит тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 78, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 79, и где бивалентное моноспецифическое антитело, нацеленное на TGF- β RII, содержит тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 77.

В определенных вариантах осуществления активность в уменьшении объема опухоли определена путем измерения уменьшения объема опухоли в исследовании *in vivo* на мышах, в частности, в исследовании *in vivo* на мышах с применением мышей huCD34 NSG с ксенотрансплантатом MDA-MB-231.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению обеспечивает уменьшение объема опухоли по меньшей мере в 1,5 раза, предпочтительно в 1,5-100 раз, или в 2-80 раз, или в 5-80 раз, или в 10-80 раз, или в 15-80раз, или в 20-80 раз, или в 30-80 раз, или в 40-80 раз, или в 50-80 раз, или в 2-60 раз, или в 5-60 раз, или в 10-60 раз, или в 15-60 раз, или в 20-60 раз, или в 30-60 раз, или в 40-60 раз, чем уменьшение объема опухоли при использовании комбинации эталонных антител. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению обеспечивает уменьшение объема опухоли по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, предпочтительно приблизительно в 1,5-100 раз, или в 2-80 раз, или в 5-80 раз, или в 10-80 раз, или в 15-80раз, или в 20-80 раз, или в 30-80 раз, или в 40-80 раз, или в 50-80 раз, или в 2-60 раз, или в 5-60 раз, или в 10-60 раз, или в 15-60 раз, или в 20-60 раз, или в 30-60 раз, или в 40-60 раз, чем уменьшение объема опухоли при использовании комбинации эталонных антител. Другими словами, мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению обеспечивает большее уменьшение объема опухоли, чем комбинация эталонных антител. В определенных вариантах осуществления комбинация эталонных антител представляет собой два бивалентных моноспецифических антитела, нацеленных на PD-1 и TGF- β RII, где бивалентное моноспецифическое антитело, нацеленное на PD-1, содержит тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 78, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 79, а бивалентное моноспецифическое антитело, нацеленное на TGF- β RII, содержит тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 77.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению уменьшает объем опухоли при введении в виде одного средства.

Таким образом, настоящим изобретением также предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где мультиспецифическая связывающая молекула индуцирует уменьшение объема опухоли в виде одного средства.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложено несколько биспецифических антител к PD-1xTGF- β RII в качестве иллюстративных мультиспецифических связывающих молекул, PD-1-связывающие домены которых содержат вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из последовательностей под SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 14, 18 или 19, и TGF- β RII-связывающие домены, которые содержат вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из последовательностей под SEQ ID NO: 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 88 и 89, и как PD-1-, так и TGF- β RII-связывающие домены, содержащие одну и ту же легкую цепь.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий следующее:

a) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно;

b) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, соответственно;

с) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно;

d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно; или

e) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно.

Вариабельные участки тяжелой цепи PD-1-связывающих доменов мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению могут содержать ограниченное количество, такое как, например, одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять, неконсервативных аминокислотных замен или неограниченное количество консервативных аминокислотных замен.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению также охватывает варианты PD-1-связывающего домена, где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации. В определенных вариантах осуществления лишь один или два HCDR могут содержать не более трех, двух или одной неконсервативной аминокислотной модификации. В определенных вариантах осуществления такие варианты не содержат аминокислотных модификаций в HCDR3. В определенных вариантах осуществления аминокислотная модификация представляет собой консервативную аминокислотную замену.

Обычно консервативная аминокислотная замена предусматривает модификацию аминокислоты на гомологичный аминокислотный остаток, который представляет собой остаток, имеющий схожие характеристики или свойства. Из уровня техники известны гомологичные аминокислоты, а также стандартные способы осуществления аминокислотных замен в связывающих доменах антитела без существенного влияния на связывание или функцию антитела, см., например, такие справочники, как Lehninger (Nelson, David L., and Michael M. Cox. 2017. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7th ed. New York, NY: W.H. Freeman) или Stryer (Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L. and Stryer, L., 2007. *Biochemistry*. New York: W.H. Freeman), включенные в данный документ во всей своей полноте. При определении того, можно ли заменить аминокислоту консервативной аминокислотой, оценку обычно можно проводить с учетом таких факторов, как без ограничения (а) структура полипептидного остова в области замены, например, листовая или спиральная конформация, (b) заряд или гидрофобность молекулы в целевом сайте и/или (c) масса боковой(-ых) цепи(-ей). Если остаток может быть заменен остатком, который имеет аналогичные характеристики, такие как схожая боковая цепь или схожий заряд или гидрофобность, то такой остаток является предпочтительным в качестве замены. Например, можно выделить следующие группы: (1) неполярные: Ala (A), Gly (G), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) незаряженные полярные: Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) кислые: Asp (D), Glu (E); и (4) основные: Lys (K), Arg (R), His (H). Альтернативно, аминокислоты можно поделить на группы следующим образом: (1) ароматические: Phe (F), Trp (W), Tyr (Y); (2) неполярные: Leu (L), Val (V), Ile (I), Ala (A), Met (M); (3) алифатические: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I); (4) кислые: Asp (D), Glu (E); (5) основные: His (H), Lys (K), Arg (R); и (6) полярные: Gln (Q), Asn (N), Ser (S), Thr (T), Tyr (Y). Альтернативно, аминокислотные остатки можно разделить на группы по общим свойствам боковой цепи: (1) гидрофобные: Met (M), Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I); (2) нейтральные гидрофильные: Cys (C), Ser (S), Thr (T), Asn (N), Gln (Q); (3) кислые: Asp (D), Glu (E); (4) основные: His (H), Lys (K), Arg

R); (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly (G), Pro (P); и (6) ароматические: Trp (W), Tyr (Y), Phe (F).

Предпочтительной будет замена аминокислотного остатка другим, присутствующим в той же группе. Соответственно, консервативная аминокислотная замена может предусматривать замену представителя одного из этих классов на другого представителя того же класса. Как правило, модификация не приводит или практически не приводит к потере специфичности связывания связывающего домена с предполагаемой мишенью.

Дополнительные типы аминокислотных модификаций включают модификации, возникающие в результате соматической гипермутации или созревания аффинности. PD-1-связывающие варианты, охватываемые настоящим изобретением, включают подвергнутые соматической гипермутации или созреванию аффинности переменные участки тяжелой цепи, которые представляют собой переменные участки тяжелой цепи, полученные из тех же генных сегментов VH, что и переменные участки тяжелой цепи, описанные представленной в данном документе последовательностью, при этом варианты характеризуются аминокислотными модификациями, в том числе неконсервативными и/или консервативными аминокислотными заменами в одном, двух или всех трех HCDR. Стандартные способы созревания аффинности доменов связывания антител широко известны в данной области техники, см., например, Tabasinezhad M. et al. (Trends in therapeutic antibody affinity maturation: From in-vitro towards next-generation sequencing approaches. Immunol Lett. 2019 Aug; 212:106-113).

Примеры подходящих для введения модификации аминокислоты включают без ограничения первую, вторую и/или четвертую аминокислоту HCDR1, третью, седьмую, восьмую, девятую, десятую, одиннадцатую, тринадцатую, четырнадцатую и/или шестнадцатую аминокислоту HCDR2 и/или шестую и/или тринадцатую аминокислоту HCDR3.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления настоящим изобретением также предложена мультиспецифическая связующая молекула, PD-1-связывающий домен которой содержит следующее:

- HCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью $X_1X_2FX_3S$, где

X_1 может представлять собой F, Y, T или H;

X_2 может представлять собой Y, Q, E, H или D;

X_3 может представлять собой W или Y; и/или

- HCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью $YIX_1YSGX_2X_3X_4X_5X_6PX_7X_8KX_9$, где

X_1 может представлять собой Y, V или I;

X_2 может представлять собой S или G;

X_3 может представлять собой T, Y, S, H, N, W, L или Q;

X_4 может представлять собой S или N;

X_5 может представлять собой F, V или L;

X_6 может представлять собой N или S;

X_7 может представлять собой S или A;

X_8 может представлять собой F или L;

X_9 может представлять собой S, T, G, D, R или N; и/или

- HCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью $GGYTGX_1GGDWFDX_2$, где

X_1 может представлять собой Y, H, V или A;

X₂ может представлять собой P, V, Y, W, F, T, Q, H или S.

Другие подходящие положения для введения аминокислотной модификации включают без ограничения вторую, третью, четвертую и/или пятую аминокислоту HCDR1, третью, четвертую, пятую, шестую, восьмую, девятую, десятую, одиннадцатую, двенадцатую, тринадцатую, четырнадцатую, пятнадцатую, шестнадцатую и/или семнадцатую аминокислоту HCDR2 и/или первую, вторую, шестую, седьмую, девятую, десятую, четырнадцатую, пятнадцатую, шестнадцатую и/или восемнадцатую аминокислоту HCDR3.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления настоящим изобретением также предложена мультиспецифическая связующая молекула, PD-1-связывающий домен которого содержит следующее:

- HCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью RX₁X₂X₃X₄, где

X₁ может представлять собой F или Y;

X₂ может представлять собой T, A или V;

X₃ может представлять собой M, L или V;

X₄ может представлять собой S, H, N, V или T; и/или

- HCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью WIX₁X₂X₃X₄GX₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄, где

X₁ может представлять собой N или D;

X₂ может представлять собой P, S или T;

X₃ может представлять собой N или Q;

X₄ может представлять собой T или D;

X₅ может представлять собой N, S, T, K, L или E;

X₆ может представлять собой P, Y, A, H или F;

X₇ может представлять собой T или S;

X₈ может представлять собой Y, F или H;

X₉ может представлять собой A, G, V или F;

X₁₀ может представлять собой Q, R, N, L, T или S;

X₁₁ может представлять собой D, A, G или S;

X₁₂ может представлять собой F, V или A;

X₁₃ может представлять собой T, K, H, G;

X₁₄ может представлять собой G, N, E или D; и/или

- HCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью X₁X₂GYCX₃X₄DX₅CYPNX₆X₇X₈DX₉, где

X₁ может представлять собой I, S или V;

X₂ может представлять собой L, Q или N;

X₃ может представлять собой N, G, S или D;

X₄ может представлять собой T, S, P, N или E;

X₅ может представлять собой N или I;

X₆ может представлять собой W, G, Q, H, W, A или L;

X₇ может представлять собой I, V или L;

X₈ может представлять собой F, L или I;

X₉ может представлять собой Y, S, N, I, R, H, V, T, K, A или L.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 14, 18, 19, или его вариант. В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 14, 18, 19, или вариант, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним.

«Процент (%) идентичности» применительно к последовательностям нуклеиновой кислоты или аминокислотным последовательностям в данном документе определяют как процент остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны остаткам в выбранной последовательности после выравнивания последовательностей с целью оптимального сравнения. С целью оптимизации выравнивания двух последовательностей в любую из двух сравниваемых последовательностей можно вводить гэпы. Такое выравнивание можно осуществлять по всей длине сравниваемых последовательностей. Альтернативно, выравнивание можно проводить по более короткой длине, например, по приблизительно 20, приблизительно 50, приблизительно 100 или более нуклеиновым кислотам/на основе такого количества аминокислот. Идентичность последовательности представляет собой процент идентичных совпадений между двумя последовательностями в указанном выровненном участке.

Сравнение последовательностей и определение процента идентичности последовательностей между двумя последовательностями можно осуществить с помощью математического алгоритма. Специалисту в данной области техники будет известен тот факт, что для выравнивания двух последовательностей и определения идентичности между двумя последовательностями доступно

несколько различных компьютерных программ (Kruskal, J. B. (1983) An overview of sequence comparison In D. Sankoff and J. B. Kruskal, (ed.), Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, pp. 1 -44 Addison Wesley). Процент идентичности последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот можно определить с помощью алгоритма Нидлмана и Вунша для выравнивания двух последовательностей. (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). Алгоритм Нидлмана - Вунша был реализован в компьютерной программе NEEDLE. В контексте настоящего изобретения для определения процента идентичности последовательностей аминокислот и нуклеиновых кислот применяют программу NEEDLE из пакета EMBOSS (версии 2.8.0, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden J. and Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp276—277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Для белковых последовательностей в качестве матрицы замен применяют EBLOSUM62. Для последовательностей ДНК применяют DNAFULL. Применяемые параметры: штраф за открытие гэпа — 10, и штраф за продление гэпа — 0,5.

После выравнивания с помощью программы NEEDLE, которая описана выше, процент идентичности последовательностей между запрашиваемой последовательностью и последовательностью по настоящему изобретению рассчитывают следующим образом: Количество соответствующих положений в выравнивании, в которых видна идентичная аминокислота или идентичный нуклеотид в обеих последовательностях, деленное на общую длину выравнивания после вычитания общего количества гэпов в выравнивании.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению также охватывает варианты PD-1-связывающего домена, которые, в дополнение к упомянутым выше модификациям в HCDR, содержат одну или несколько модификаций каркасных участков. Модификация может представлять собой любой тип аминокислотной модификации, описанный в данном документе,

такой как, например, консервативная аминокислотная замена или неконсервативная аминокислотная замена, возникающая в результате соматической гипермутации или созревания аффинности. В определенных вариантах осуществления вариант PD-1-связывающего домена в мультиспецифической связывающей молекуле по настоящему изобретению не содержит модификаций в CDR-участках, но содержит одну или несколько модификаций в каркасных участках. Такие варианты характеризуются по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностями, раскрытыми в данном документе, и, согласно ожиданиям, они сохраняют специфичность связывания с PD-1. Таким образом, в определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит следующее:

- вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, при этом вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 3, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 4;

- вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 5, при этом вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 6, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 7, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 8;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 9, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 11, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 12;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 13, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 11, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 12;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 16, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 17;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 18, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена

под SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 16, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 17; или

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 19, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 20, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 21, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 22.

Связывающие домены мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению были получены с использованием общей легкой цепи, в частности, с использованием общей легкой цепи под названием VK1-39/JK1. Связывающие домены мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению могут содержать любую подходящую легкую цепь, в том числе без ограничения общие легкие цепи, известные из уровня техники. В определенных вариантах осуществления связывающие домены мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержат общую легкую цепь VK1-39/JK1 или ее вариант, которые несут ограниченное количество, такое как одна, две или три, неконсервативных аминокислотных замен или неограниченное количество консервативных аминокислотных замен.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или его вариант. В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему

изобретению содержит вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или вариант, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51. В определенных вариантах осуществления вариабельный участок легкой цепи PD-1-связывающего домена мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению также охватывает его варианты, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации. В определенных вариантах осуществления аминокислотная модификация представляет собой консервативную аминокислотную замену.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению также охватывает варианты PD-1-связывающего домена, которые, в дополнение к упомянутым выше модификациям в LCDR, содержат одну или несколько модификаций каркасных участков. Модификация предпочтительно представляет собой консервативную аминокислотную замену. В определенных вариантах осуществления вариант PD-1-связывающего домена в мультиспецифической связывающей молекуле по настоящему изобретению не содержит модификаций в LCDR-участках, но содержит одну или несколько модификаций в каркасных участках. Такие варианты характеризуются по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностями, раскрытыми в данном документе. Таким образом, в определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий

домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит следующее:

- вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, при этом вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность LCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 49, аминокислотную последовательность LCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 50, и аминокислотную последовательность LCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 51.

Легкая цепь или вариабельный участок легкой цепи, включающие данные LCDR и/или вариабельный участок легкой цепи может, например, представлять собой легкую цепь, называемую в данной области техники VK1-39/JK1. Это общая легкая цепь. Термин «общая легкая цепь» согласно настоящему изобретению относится к легкой цепи, которая способна образовывать пары с множеством различных тяжелых цепей, такими как, например, тяжелые цепи, характеризующиеся различными специфичностями связывания антигена или эпитопа. Общая легкая цепь особенно полезна при создании, например, биспецифических или мультиспецифических антител, при этом получение антител более эффективно, когда все связывающие домены содержат одинаковую легкую цепь. Термин «общая легкая цепь» охватывает легкие цепи, которые идентичны или имеют некоторые различия в аминокислотных последовательностях, при этом не затрагивается специфичность связывания полноразмерного антитела. Например, в рамках объема определения общих легких цепей, используемого в данном документе, можно получить или найти легкие цепи, которые не идентичны, но все же функционально эквивалентны, например, с использованием хорошо известных модификаций, которые вводят консервативные аминокислотные изменения, изменения аминокислот в участках, о которых известно или для которых продемонстрировано, что они не

способствуют или лишь частично способствуют специфичности связывания при сочетании с тяжелой цепью и т. п.

Помимо общей легкой цепи, содержащей упомянутые выше LCDR и/или переменный участок легкой цепи, можно применять и другие общие легкие цепи, известные в данной области техники. Примеры таких общих легких цепей включают без ограничения следующее: VK1-39/JK5, содержащий переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) из переменного участка легкой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 52. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) из переменного участка легкой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 52, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 52, или характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 55, VK3-15/JK1, содержащий переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) из переменного участка легкой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 56. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) из переменного участка легкой цепи,

характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 56, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 56, или характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, VK3-20/JK1, содержащий переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) из переменного участка легкой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 60. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) из переменного участка легкой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 60, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 60, или характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63, и VL3-21/JL3, содержащий переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи

(LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 64. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) из переменного участка легкой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 64, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 64, или характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 67.

VK1-39 является сокращением от гена переменного домена цепи каппа 1-39. Ген также известен как ген переменного домена цепи каппа 1-39 иммуноглобулина, IGKV139, IGKV1-39, IgV κ 1-39. Внешними идентификаторами гена являются HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. Аминокислотная последовательность VK1-39 изложена под SEQ ID NO: 93. Это последовательность V-участка. V-участок можно комбинировать с одним из пяти J-участков. Подходящие последовательности VJ-участка обозначены как VK1-39/JK1 (SEQ ID NO: 94) и VK1-39/JK5 (SEQ ID NO: 95), альтернативные названия: IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 или IgV κ 1-39*01/IGJ κ 5*01 (номенклатура согласно доступной во всемирной сети базе данных IMGT на imgt.org). Данные названия являются иллюстративными и охватывают аллельные варианты генных сегментов.

VK3-15 является сокращением от гена варибельного домена цепи каппа 3-15. Ген также известен как ген варибельного домена цепи каппа 3-15 иммуноглобулина, IGKV315, IGKV3-15, IgV κ 3-15. Внешними идентификаторами гена являются HGNC: 5816; Entrez Gene: 28913; Ensembl: ENSG00000244437. Аминокислотная последовательность VK3-15 изложена под SEQ ID NO: 98. Это последовательность V-участка. V-участок можно комбинировать с одним из пяти J-участков. Подходящая последовательность VJ-участка обозначена как VK3-15/JK1 (SEQ ID NO: 99); альтернативное название: V κ 3-15*01/IGJ κ 1*01 (номенклатура согласно доступной во всемирной сети базе данных IMGT на imgt.org). Данное название является иллюстративным и охватывает аллельные варианты генных сегментов.

VK3-20 является сокращением от гена варибельного домена цепи каппа 3-20. Ген также известен как ген варибельного домена цепи каппа 3-20 иммуноглобулина, IGKV320, IGKV3-20, IgV κ 3-20. Внешними идентификаторами гена являются HGNC: 5817; Entrez Gene: 28912; Ensembl: ENSG00000239951. Аминокислотная последовательность VK3-20 обозначена как SEQ ID NO: 100. Это последовательность V-участка. V-участок можно комбинировать с одним из пяти J-участков. Подходящая последовательность VJ-участка обозначена как VK3-20/JK1 (SEQ ID NO: 101); альтернативное название: IgV κ 3-20*01/IGJ κ 1*01 (номенклатура согласно доступной во всемирной сети базе данных IMGT на imgt.org). Данное название является иллюстративным и охватывает аллельные варианты генных сегментов.

VL3-21 является сокращением от гена варибельного домена цепи лямбда 3-21. Ген также известен как ген варибельного домена цепи лямбда 3-21 иммуноглобулина, IGLV321, IGLV3-21, IgV λ 3-21. Внешними идентификаторами гена являются HGNC: 5905; Entrez Gene: 28796; Ensembl: ENSG00000211662.2. Аминокислотная последовательность VL3-21 изложена под SEQ ID NO: 102. Это последовательность V-участка. V-участок можно комбинировать с одним из пяти J-участков. Подходящая последовательность VJ-участка обозначена как VL3-21/JL3 (SEQ ID NO: 103); альтернативное название: IgV λ 3-21/IGJ λ 3

(номенклатура согласно доступной во всемирной сети базе данных IMGT на imgt.org). Данное название является иллюстративным и охватывает аллельные варианты генных сегментов.

Дополнительно можно применять любой вариабельный участок легкой цепи антитела к PD-1, доступного в данной области техники, как и любой другой вариабельный участок легкой цепи, который можно легко получить, такой как, например, из библиотеки дисплея антител, по проявлению антигенсвязывающей активности в паре с PD-1-связывающим доменом мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению может дополнительно содержать участок CH1 и CL. Можно применять любой домен CH1, в частности, домен CH1 человека. Примером подходящего домена CH1 является аминокислотная последовательность, представленная под SEQ ID NO: 69. Можно применять любой домен CL, в частности, CL человека. Примером подходящего домена CL является аминокислотная последовательность, представленная под SEQ ID NO: 75.

В определенных вариантах осуществления TGF- β RII-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий следующее:

a) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно;

b) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, соответственно;

c) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, соответственно;

d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38, соответственно;

e) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, соответственно;

f) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46, соответственно; или

g) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 92, соответственно.

Вариабельные участки тяжелой цепи TGF- β RII-связывающих доменов мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению могут содержать ограниченное количество, такое как, например, одну, две или три, неконсервативных аминокислотных замен или неограниченное количество консервативных аминокислотных замен.

В определенных вариантах осуществления TGF- β RII-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению также охватывает варианты TGF- β RII-связывающего домена, где каждый из

HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации. В определенных вариантах осуществления лишь один или два HCDR могут содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации. В определенных вариантах осуществления такие варианты не содержат аминокислотных модификаций в HCDR3. В определенных вариантах осуществления аминокислотная модификация представляет собой консервативную аминокислотную замену. Консервативная аминокислотная замена описана в данном документе далее.

TGF- β RII-связывающие варианты, охватываемые настоящим изобретением, включают подвергнутые соматической гипермутации или созреванию аффинности переменные участки тяжелой цепи, которые представляют собой переменные участки тяжелой цепи, полученные из того же генного сегмента VH, что и переменные участки тяжелой цепи, описанные представленной в данном документе последовательностью, при этом варианты характеризуются аминокислотными модификациями, в том числе неконсервативными и/или консервативными аминокислотными заменами в одном, двух или всех трех HCDR.

В определенных вариантах осуществления TGF- β RII-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 88, 89, или его вариант. В определенных вариантах осуществления TGF- β RII-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 23, 27, 31, 35, 39; 43, 47, 88, 89, или характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним.

В определенных вариантах осуществления TGF- β RII-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению также охватывает варианты TGF- β RII-связывающего домена, которые, в дополнение к упомянутым выше модификациям в HCDR, содержат одну или несколько модификаций каркасных участков. Модификация может представлять собой любой тип аминокислотной модификации, описанный в данном документе, такой как, например, консервативная аминокислотная замена или неконсервативная аминокислотная замена, возникающая в результате соматической гипермутации или созревания аффинности. В определенных вариантах осуществления вариант TGF- β RII-связывающего домена в мультиспецифической связывающей молекуле по настоящему изобретению не содержит модификаций в CDR-участках, но содержит одну или несколько модификаций в каркасных участках. Такие варианты характеризуются по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностями, раскрытыми в данном документе, и, согласно ожиданиям, они сохраняют специфичность связывания с TGF- β RII. Таким образом, в определенных вариантах осуществления TGF- β RII-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит следующее:

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 23, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 24, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 25, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 26;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью,

которая изложена под SEQ ID NO: 27, при этом вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 28, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 29, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 30;

- вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 31, при этом вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 32, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 33, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 34;

- вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35, при этом вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 36, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 37, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 38;

- вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 39, при этом вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 40, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 41, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 42;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 43, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 44, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 45, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 46;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 47, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 90, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 91, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 92;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 88, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 44, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 45, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 46; или

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 89, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена

под SEQ ID NO: 90, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 91, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 92.

Можно применять любой переменный участок легкой цепи антитела к TGF- β RII, доступного в данной области техники, например, который описан в данном документе, как и любой другой переменный участок легкой цепи, который можно легко получить, такой как, например, из библиотеки дисплея антител, по проявлению антигенсвязывающей активности в паре с TGF- β RII-связывающим доменом мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления TGF- β RII-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит ту же или практически ту же легкую цепь, что и PD-1-связывающий домен.

В определенных вариантах осуществления TGF- β RII-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или его вариант. В определенных вариантах осуществления TGF- β RII-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или вариант, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним.

В определенных вариантах осуществления TGF- β RII-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению содержит переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена

под SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51, соответственно. В определенных вариантах осуществления вариабельный участок легкой цепи TGF- β RII-связывающего домена мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению также охватывает его варианты, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной консервативной или неконсервативной аминокислотной модификации. В определенных вариантах осуществления аминокислотная модификация представляет собой консервативную аминокислотную замену.

В определенных вариантах осуществления TGF- β RII-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению может дополнительно содержать участок CH1 и CL. Можно применять любой домен CH1, в частности, домен CH1 человека. Примером подходящего домена CH1 является аминокислотная последовательность, представленная под SEQ ID NO: 69. Можно применять любой домен CL, в частности, CL человека. Примером подходящего домена CL является аминокислотная последовательность, представленная под SEQ ID NO: 75.

Таким образом, настоящим изобретением также предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где PD-1-связывающий домен содержит вариабельный участок тяжелой цепи и, необязательно, вариабельный участок легкой цепи, а также участки CH1 и CL, которые описаны в данном документе. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула дополнительно содержит TGF- β RII-связывающий домен, который содержит вариабельный участок тяжелой цепи и, необязательно, вариабельный участок легкой цепи и участки CH1 и CL, которые описаны в данном документе.

Таким образом, настоящим изобретением также предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где TGF- β RII-связывающий домен содержит вариабельный участок тяжелой цепи и, необязательно, вариабельный

участок легкой цепи, а также участки CH1 и CL, которые описаны в данном документе. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула дополнительно содержит PD-1-связывающий домен, который содержит вариабельный участок тяжелой цепи и, необязательно, вариабельный участок легкой цепи и участки CH1 и CL, которые описаны в данном документе.

В определенных вариантах осуществления для получения мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению любой раскрываемый в данном документе PD-1-связывающий домен можно комбинировать с любым раскрываемым в данном документе TGF- β RII-связывающим доменом. Таким образом, настоящим изобретением предложены иллюстративные мультиспецифические связывающие молекулы PB1-PB18, которые представлены в таблице 1.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, соответственно,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и

CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, соответственно,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38, соответственно,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью,

которая изложена под SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38, соответственно,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38, соответственно,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, соответственно,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 92, соответственно,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46, соответственно,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 50, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 51, и

где каждый из HCDR и/или LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR и/или LCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 50, и CDR3 легкой цепи (LCDR3),

характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 51, и

где каждый из HCDR и/или LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR и/или LCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 50, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 51, и

где каждый из HCDR и/или LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных

вариантах осуществления HCDR и/или LCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, соответственно,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 50, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 51, и

где каждый из HCDR и/или LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR и/или LCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, соответственно,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 50, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 51, и

где каждый из HCDR и/или LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR и/или LCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38, соответственно,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 50, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 51, и

где каждый из HCDR и/или LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR и/или LCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38, соответственно,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 50, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 51, и

где каждый из HCDR и/или LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR и/или LCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38, соответственно,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 50, и CDR3 легкой цепи (LCDR3),

характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 51, и

где каждый из HCDR и/или LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR и/или LCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, соответственно,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 50, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 51, и

где каждый из HCDR и/или LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных

вариантах осуществления HCDR и/или LCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 92, соответственно,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 50, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 51, и

где каждый из HCDR и/или LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR и/или LCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46, соответственно,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 50, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 51, и

где каждый из HCDR и/или LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации, например, замен. В определенных вариантах осуществления HCDR и/или LCDR не содержат аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 9, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей

мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 23, или вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи содержит HCDR, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 18, или вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 23, или вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи содержит HCDR, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных

вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 19, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 23, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи содержит HCDR, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 31, или вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи содержит HCDR, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 9, или вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 39, или вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи содержит HCDR, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 9, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и
- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи содержит HCDR, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и
- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся

аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35, или вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи содержит HCDR, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 19, или вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35, или вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи содержит HCDR, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 9, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 27, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи содержит HCDR, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 13, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 47, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%

идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи содержит HCDR, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 19, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 43, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи содержит HCDR, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 9, или переменный

участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 23, или вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи и вариабельных участков легкой цепи содержит HCDR и LCDR, соответственно, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи и вариабельных участков легкой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 18, или вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 23, или вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи и вариабельных участков легкой цепи содержит HCDR и LCDR, соответственно, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи и вариабельных участков легкой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 19, или вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 23, или вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере

80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или переменный участок легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи содержит HCDR и LCDR, соответственно, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и
- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 31, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или переменный участок легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи содержит HCDR и LCDR, соответственно, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 9, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и
- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 39, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или переменный участок легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей

мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи содержит HCDR и LCDR, соответственно, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 9, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или переменный участок легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи содержит HCDR и LCDR, соответственно, которые не содержат аминокислотных

модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и
- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или переменный участок легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи содержит HCDR и LCDR, соответственно, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 19, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или переменный участок легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи содержит HCDR и LCDR, соответственно, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 9, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 27, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или переменный участок легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи содержит HCDR и LCDR, соответственно, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 13, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей

мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 47, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или переменный участок легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи содержит HCDR и LCDR, соответственно, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из переменных участков тяжелой цепи и переменных участков легкой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая следующее:

- PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 19, или переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним; и

- TGF- β RII-связывающий домен, который описан в данном документе, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 43, или вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним,

где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности с ним. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи и вариабельных участков легкой цепи содержит HCDR и LCDR, соответственно, которые не содержат аминокислотных модификаций. В определенных вариантах осуществления каждый из вариабельных участков тяжелой цепи и вариабельных участков легкой цепи не содержит аминокислотных модификаций.

Дополнительно в данном документе предложены нуклеиновые кислоты, пригодные для получения мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления такие нуклеиновые кислоты содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи PD-1-связывающего домена, описанного в данном документе, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи TGF- β RII-связывающего домена, описанного в данном документе. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может дополнительно содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую участок CH1 и предпочтительно шарнирный участок, участок CH2 и CH3. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере

одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок легкой цепи и предпочтительно участок CL. В определенных вариантах осуществления переменный участок легкой цепи может представлять собой переменный участок общей легкой цепи, описанный в данном документе.

В данном документе дополнительно предложены векторы, содержащие нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению, пригодные для получения мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления такие векторы содержат последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи PD-1-связывающего домена, описанного в данном документе, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи TGF- β RII-связывающего домена, описанного в данном документе. В определенных вариантах осуществления вектор по настоящему изобретению может дополнительно содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую участок CH1 и предпочтительно шарнирный участок, участок CH2 и CH3. В определенных вариантах осуществления вектор по настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок легкой цепи и предпочтительно участок CL. В определенных вариантах осуществления переменный участок легкой цепи может представлять собой переменный участок общей легкой цепи, описанный в данном документе.

Настоящим изобретением также предложена клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, например вектор, кодирующую переменный участок тяжелой цепи PD-1-связывающего домена, который описан в данном документе, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи TGF- β RII-связывающего домена, который описан в данном документе. В определенных вариантах осуществления клетка по настоящему изобретению может дополнительно содержать последовательность нуклеиновой кислоты, например вектор, кодирующую участок CH1 и предпочтительно шарнирный участок, участок CH2

и СНЗ. В определенных вариантах осуществления клетка по настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, например вектор, кодирующую переменный участок легкой цепи и предпочтительно участок СL. В определенных вариантах осуществления переменный участок легкой цепи может представлять собой переменный участок общей легкой цепи, описанный в данном документе.

Настоящим изобретением также предложена клетка, продуцирующая мультиспецифическую связывающую молекулу, которая описана в данном документе. В определенных вариантах осуществления такая клетка может представлять собой рекомбинантную клетку, которая была трансформирована нуклеиновой кислотой, например вектором, по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления клетка по настоящему изобретению содержит последовательность нуклеиновой кислоты, например вектор, кодирующую переменный участок тяжелой цепи PD-1-связывающего домена, который описан в данном документе, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи TGFTGF- β RII-связывающего домена, который описан в данном документе. В определенных вариантах осуществления клетка по настоящему изобретению дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, например вектор, кодирующую участок СН1 и предпочтительно шарнирный участок, участок СН2 и СНЗ. В определенных вариантах осуществления клетка по настоящему изобретению дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, например вектор, кодирующую переменный участок легкой цепи, в частности переменный участок легкой цепи, который описан в данном документе, и предпочтительно участок СL.

Настоящим изобретением дополнительно предложена клетка, продуцирующая мультиспецифическую связывающую молекулу, которая описана в данном документе.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество мультиспецифической связывающей молекулы, которая описана в данном документе, и, необязательно, фармацевтически приемлемый носитель.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, которая описана в данном документе, и фармацевтическая композиция, которая описана в данном документе, для применения в терапии.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, которая описана в данном документе, или фармацевтическая композиция, которая описана в данном документе, для применения при лечении рака.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложен способ лечения заболевания, предусматривающий введение эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы, которая описана в данном документе, или фармацевтической композиции, которая описана в данном документе, нуждающемуся в этом индивидууму.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложен способ лечения рака, предусматривающий введение эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы, которая описана в данном документе, или фармацевтической композиции, которая описана в данном документе, нуждающемуся в этом индивидууму.

В данном документе термины «индивидуум», «субъект» и «пациент» используются взаимозаменяемо и относятся к млекопитающему, такому как человек, мышь, крыса, хомяк, морская свинка, кролик, кошка, собака, обезьяна, корова, лошадь, свинья и др., и, в частности, субъекту-человеку, у которого имеется рак.

Термины «лечить», «осуществлять лечение» и «лечение» в контексте данного документа относятся к любому типу вмешательства или процесса, выполняемого на субъекте или к введению активного средства или комбинации активных средств субъекту с целью излечения заболевания или его симптома или улучшения состояния при заболевании или его симптоме или производящего положительный терапевтический ответ. В контексте данного документа «положительный терапевтический ответ» относится к лечению, дающему благоприятный эффект, например, обращение вспять, смягчение, облегчение, ингибирование или замедление симптома, осложнения, патологического состояния или биохимических признаков, которые связаны с заболеванием, а также предупреждение возникновения, прогрессирования, развития, ухудшения степени тяжести или повторного появления симптома, осложнения, патологического состояния или биохимических признаков, которые связаны с заболеванием, такой как, например, облегчение по меньшей мере одного симптома заболевания или нарушения, например рака. Положительный эффект может принимать форму улучшения по сравнению с исходным уровнем, в том числе улучшения по сравнению с результатами измерения или наблюдения, проведенного до начала терапии согласно данному способу. Например, благоприятный эффект может принимать форму замедления, стабилизации, остановки или обращения вспять прогрессирования рака у субъекта на любой клинической стадии, о чем свидетельствует уменьшение или устранение клинического или диагностического симптома заболевания или маркера рака. Эффективное лечение может, например, уменьшить размер опухоли, уменьшить присутствие опухолевых клеток в кровотоке, уменьшить или предупредить метастазы опухоли, замедлить или заблокировать рост опухоли и/или предупредить или задержать повторное появление или рецидив опухоли.

Термин «терапевтическое количество» или «эффективное количество» относится к количеству средства или комбинации средств, которое лечит от заболевания, такого как рак. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое количество представляет собой количество, достаточное для задержки развития опухоли. В некоторых вариантах осуществления

терапевтическое количество представляет собой количество, достаточное для предупреждения или задержки повторного появления опухоли.

В контексте данного документа эффективным количеством средства или композиции является такое количество, которое, например, может: (i) уменьшить количество раковых клеток, (ii) уменьшить размер опухоли, (iii) ингибировать, задержать, в некоторой степени замедлить и может остановить инфильтрацию раковых клеток в периферические органы, (iv) ингибировать метастазирование опухоли, (v) ингибировать рост опухоли, (vi) предупредить или задержать возникновение и/или повторное возникновение опухоли и/или (vii) избавить в некоторой степени от одного или нескольких симптомов, связанных с раком.

Эффективное количество может варьировать в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса подлежащего лечению индивидуума, а также способность средства или комбинации средств вызывать требуемый ответ у индивидуума, который может быть легко оценен рядовым врачом или другим медицинским работником.

Эффективное количество можно вводить субъекту за одно или несколько введений.

Эффективное количество может также включать количество, которое уравнивает любые токсические или вредные эффекты средства или комбинации средств и полезные эффекты.

Термин «средство» относится к терапевтически активному веществу, в данном случае к мультиспецифической связывающей молекуле по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В контексте данного документа термин «содержать» и сочетания с ним используются в неограничивающем смысле для обозначения, что включены предметы, следующие за данным словом, но не исключены и предметы, которые конкретно не упомянуты.

Формы единственного числа в данном документе используются для обозначения одного или нескольких грамматических объектов в форме единственного числа. Например, «элемент» означает один или несколько элементов.

В данном документе ссылка на патентный документ или другой материал не должна рассматриваться как признание того, что данный документ или материал был известен или что содержащаяся в нем информация была частью общеизвестных сведений на дату приоритета любого из пунктов формулы изобретения.

Все ссылки на патенты и литературу, упомянутые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Следует обратить внимание, что в настоящем описании, если не указано иное, положения аминокислот, присвоенные CDR и каркасным участкам в переменном участке антитела или фрагмента антитела, указаны в соответствии с нумерацией по Kabat (см. Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987 и 1991)). Аминокислоты в константных участках указаны согласно системе нумерации EU.

Регистрационные номера в первую очередь приведены для обеспечения дополнительного способа идентификации мишени, фактическая последовательность связанного белка может варьировать, например, по причине мутации в кодирующем гене, такой как мутация, возникающая при некоторых формах рака, или др. Сайт связывания антигена мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению может связывать антиген и ряд его вариантов, таких как варианты, которые экспрессируются некоторыми антиген-положительными иммунными или опухолевыми клетками. HGNC означает номенклатурный комитет HUGO Gene. Число, идущее после аббревиатуры, представляет собой регистрационный номер, с помощью которого из базы данных HGNC можно получить информацию о гене и белке, кодируемом данным геном. Entrez Gene предоставляет регистрационный номер или идентификатор гена, с помощью которого из базы данных NCBI

(Национальный центр биотехнологической информации) можно получить информацию о гене или белке, кодируемом данным геном. Ensembl предоставляет регистрационный номер, с помощью которого из базы данных Ensembl можно получить информацию о гене или белке, кодируемом данным геном. Ensembl представляет собой совместный проект EMBL-EBI и Wellcome Trust Sanger Institute по разработке системы программного обеспечения, которая создает и поддерживает автоматическую аннотацию на выбранных эукариотических геномах.

При отсылке в данном документе к гену или белку отсылка предпочтительно делается к человеческой форме гена или белка. При отсылке в данном документе к гену или белку отсылка делается как к природному гену или белку, так и к вариантам форм гена или белка, которые можно детектировать в опухолях, различных формах рака и др., предпочтительно, которые можно детектировать в человеческих опухолях, различных формах рака и др.

Пункты

1. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где PD-1-связывающий домен блокирует PD-1-опосредованную передачу сигналов, а TGF- β RII-связывающий домен блокирует TGF- β RII-опосредованную передачу сигналов.
2. Мультиспецифическая связывающая молекула по пункту 1, где PD-1-связывающий домен блокирует PD-1-опосредованную передачу сигналов, а TGF- β RII-связывающий домен блокирует TGF- β RII-опосредованную передачу сигналов в активированных Т-клетках.
3. Мультиспецифическая связывающая молекула по пункту 1 или 2, где PD-1-связывающий домен блокирует PD-1-опосредованную передачу сигналов, а TGF- β RII-связывающий домен блокирует TGF- β RII-опосредованную передачу сигналов в активированных Т-клетках.

4. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая Fab-домен, который специфически связывается с PD-1, и Fab-домен, который специфически связывается с TGF- β RII.
5. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где мультиспецифическая связывающая молекула состоит из одного Fab-домена, который специфически связывается с PD-1, одного Fab-домена, который специфически связывается с TGF- β RII, и Fc-участка.
6. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где мультиспецифическая связывающая молекула характеризуется более высокой эффективностью в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих как PD-1, так и TGF- β RII, нежели в клетках, экспрессирующих TGF- β RII и не экспрессирующих, практически не экспрессирующих или характеризующихся низкими уровнями экспрессии PD-1
7. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где мультиспецифическая связывающая молекула характеризуется более высокой эффективностью блокирования TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих как PD-1, так и TGF- β RII, нежели в клетках, экспрессирующих TGF- β RII и не экспрессирующих, практически не экспрессирующих или характеризующихся низкими уровнями экспрессии PD-1.
8. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где мультиспецифическая связывающая молекула характеризуется более высокой активностью в уменьшении объема опухоли, чем комбинация эталонных антител, где комбинация эталонных антител представляет собой два бивалентных моноспецифических антитела, нацеленных на PD-1 и TGF- β RII, где бивалентное моноспецифическое антитело, нацеленное на PD-1, содержит тяжелую цепь,

характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 78, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 79, а бивалентное моноспецифическое антитело, нацеленное на TGF- β RII, содержит тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 77.

9. Мультиспецифическая связывающая молекула по пункту 8, где активность в уменьшении объема опухоли определена путем измерения уменьшения объема опухоли в исследовании *in vivo* на мышах, в частности, в исследовании *in vivo* на мышах с применением мышей huCD34 NSG с ксенотрансплантатом MDA-MB-231.

10. Мультиспецифическое антитело или его вариант по пункту 8 или 9, где более высокая активность в уменьшении объема опухоли заключается в уменьшении объема опухоли по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, предпочтительно приблизительно в 1,5-100 раз, по сравнению с уменьшением объема опухоли при применении комбинации эталонных антител.

11. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где клетки, экспрессирующие как PD-1, так и TGF- β RII, представляют собой активированные Т-клетки.

12. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где клетки, экспрессирующие как PD-1, так и TGF- β RII, представляют собой активированные опухолеспецифические Т-клетки.

13. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где клетки, экспрессирующие как PD-1, так и TGF- β RII, представляют собой клетки Jurkat-PD-1⁺, а клетки, экспрессирующие TGF- β RII и не экспрессирующие, практически не экспрессирующие или характеризующиеся низкими уровнями экспрессии PD-1, представляют собой клетки Jurkat-PD-1^{null}.

14. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где клетки, экспрессирующие как PD-1, так и TGF- β RII, представляют собой активированные CD4⁺ и/или CD8⁺ клетки, а клетки, экспрессирующие TGF- β RII и не экспрессирующие, практически не экспрессирующие или характеризующиеся низкими уровнями экспрессии PD-1, представляют собой неактивированные CD4⁺ и/или CD8⁺ клетки.

15. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где клетки, экспрессирующие как PD-1, так и TGF- β RII, представляют собой клетки HEK-Blue-TGF- β -PD-1⁺, а клетки, экспрессирующие TGF- β RII и не экспрессирующие, практически не экспрессирующие или характеризующиеся низкими уровнями экспрессии PD-1, представляют собой клетки HEK-Blue-TGF- β .

16. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где эффективность в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов измерена с помощью анализа фосфо-SMAD2/3.

17. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где эффективность блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов измерена с помощью анализа изогенных PD-1-TGF- β -клеток по гену-репортеру.

18. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где эффективность блокировании TGF- β RII-опосредованную передачу сигналов в клетках, экспрессирующих как PD-1, так и TGF- β RII, по меньшей мере приблизительно в 200 раз, или в 500 раз, или в 1000 раз, или в 5000 раз, или в 10000 раз, или в 15000 раз, или 20000 раз, или 30000 раз, или приблизительно в 200-30000 раз, или в 500-30000 раз, или в 1000-30000 раз, или в 5000-30000 раз или в 10000-30000 раз, или в 200-20000 раз, или в 200-15000 раз выше, чем в клетках, экспрессирующих TGF- β RII и не экспрессирующих, или практически

не экспрессирующих, или характеризующихся низкими уровнями экспрессии PD-1.

19. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где эффективность мультиспецифической связывающей молекулы в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих TGF- β RII и не экспрессирующих PD-1, ниже, чем эффективность эталонного антитела к TGF- β RII, а эффективность мультиспецифической связывающей молекулы в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих как TGF- β RII, так и PD-1, выше, чем эффективность эталонного антитела к TGF- β RII, где эталонное антитело к TGF- β RII представляет собой бивалентное моноспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 77.

20. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где эффективность мультиспецифической связывающей молекулы в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих как TGF- β RII, так и PD-1, по меньшей мере приблизительно в 100 раз или в 200 раз, предпочтительно приблизительно в 100-20000 раз, или в 100-15000 раз, или в 100-12000 раз, или в 200-20000 раз или в 200-15000 раз или в 200-12000 раз выше, чем эффективность эталонного антитела к TGF- β RII.

21. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен представляют собой Fab-домены.

22. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где мультиспецифическая связывающая молекула представляет собой биспецифическое антитело.

23. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где мультиспецифическая связывающая молекула представляет собой биспецифическое антитело IgG1.

24. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где каждый из PD-1-связывающего домена и TGF- β RII-связывающего домена содержит легкую цепь, содержащую вариабельный участок легкой цепи из легкой цепи, которая способна образовывать пары с множеством тяжелых цепей, характеризующихся специфичностью к различным эпитопам.

25. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен содержат одну и ту же легкую цепь.

26. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где PD-1-связывающий домен содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий следующее:

a) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно;

b) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, соответственно;

c) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно;

d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно; или

e) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно;

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации.

27. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где TGF- β RII-связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий следующее:

a) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно;

b) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, соответственно;

c) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, соответственно;

d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью,

которая изложена под SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38, соответственно;

e) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, соответственно;

f) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46, соответственно; или

g) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 92, соответственно,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации.

28. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где PD-1-связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий следующее:

a) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно;

b) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, соответственно;

c) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно;

d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно; или

e) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно;

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации.

29. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где TGF- β RII-связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий следующее:

a) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно;

b) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, соответственно;

c) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, соответственно;

d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38, соответственно;

e) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, соответственно;

f) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46, соответственно; или

g) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 92, соответственно,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации.

30. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где PD-1-связывающий домен содержит вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 14, 18, 19, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более

предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

31. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где PD-1-связывающий домен содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51, соответственно, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации.

32. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где PD-1-связывающий домен содержит вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

33. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где TGF- β RII-связывающий домен содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий следующее:

a) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно;

b) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, соответственно;

c) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью,

которая изложена под SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, соответственно;

d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38, соответственно;

e) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, соответственно;

f) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46, соответственно; или

g) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 92, соответственно,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации.

34. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где TGF- β RII-связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 88, 89, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

35. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где TGF- β RII-связывающий домен содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51, соответственно, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации.

36. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из предыдущих пунктов, где TGF- β RII-связывающий домен содержит вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

37. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, которая конкурирует с мультиспецифической связывающей молекулой по любому из предыдущих пунктов за связывание с PD-1 и/или TGF- β RII.

38. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество мультиспецифической связывающей молекулы по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель.

39. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пунктов 1-37 или фармацевтическая композиция по пункту 38 для применения в терапии.

40. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пунктов 1-37 или фармацевтическая композиция по пункту 38 для применения при лечении заболевания, связанного с подавленной иммунной системой.

41. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пунктов 1-37 или фармацевтическая композиция по пункту 38 для применения при лечении рака.

42. Применение мультиспецифической связывающей молекулы по любому из пунктов 1-37 или фармацевтической композиции по пункту 38 для производства лекарственного препарата для применения при лечении заболевания, связанного с подавленной иммунной системой.

43. Применение мультиспецифической связывающей молекулы по любому из пунктов 1-37 или фармацевтической композиции по пункту 38 для производства лекарственного препарата для применения при лечении рака.

44. Способ лечения заболевания, предусматривающий введение эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы по любому из пунктов 1-37 или фармацевтической композиции по пункту 38 нуждающемуся в этом субъекту-человеку.

45. Способ лечения заболевания, связанного с подавленной иммунной системой, предусматривающий введение эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы по любому из пунктов 1-37 или фармацевтической композиции по пункту 38 нуждающемуся в этом субъекту-человеку.

46. Способ лечения рака, предусматривающий введение эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы по любому из пунктов 1-37 или фармацевтической композиции по пункту 38 нуждающемуся в этом субъекту-человеку.

47. Клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи PD-1-связывающего домена по пункту 28 или 30, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи TGF- β RII-связывающего домена по пункту 29 или 34.

48. Клетка по пункту 47, где клетка дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую участок CH1 и предпочтительно шарнирный участок, участок CH2 и CH3.

49. Клетка по пункту 47 или 48, где клетка дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок легкой цепи, в частности переменный участок легкой цепи по пункту 34 или 35, и предпочтительно участок CL.

50. Клетка, продуцирующая мультиспецифическую связывающую молекулу по любому из пунктов 1-37.

Краткое описание графических материалов

В данном документе применяют следующие способы наименования. На фигурах бивалентные моноспецифические антитела указаны в формате SEQ ID NO: A/SEQ ID NO: B, где SEQ ID NO: A относится к тяжелой цепи обоих связывающих доменов, а SEQ ID NO: B относится к легкой цепи обоих связывающих доменов.

Бивалентные биспецифические антитела указаны в формате SEQ ID NO: A x SEQ ID NO: B, где как SEQ ID NO: A, так и SEQ ID NO: B относятся к переменным последовательностям тяжелой цепи. Каждый связывающий домен биспецифических антител содержит одну и ту же легкую цепь.

Бивалентные моноспецифические эталонные антитела пембролизумаб, ниволумаб и аналог TGF1 указаны в формате SEQ ID NO: A/SEQ ID NO: B, где SEQ ID NO: A относится к соответствующей последовательности тяжелой цепи, а SEQ ID NO: B относится к соответствующей последовательности легкой цепи. Комбинация пембролизумаба и аналога TGF1 указана в формате SEQ ID NO: A/SEQ ID NO: B + SEQ ID NO: C/SEQ ID NO: D, где SEQ ID NO: A относится к последовательности тяжелой цепи и SEQ ID NO: B относится к последовательности легкой цепи либо пембролизумаба, либо аналога TGF1, а SEQ ID NO: C относится к последовательности тяжелой цепи и SEQ ID NO: D относится к последовательности легкой цепи другого.

Аналог эталонной молекулы PD-L1-TGF- β TRAP, который представляет собой аналог бинтрафуспа альфа, указан в формате SEQ ID NO: A/SEQ ID NO: B, где

SEQ ID NO: A относится к последовательности тяжелой цепи, включающей линкер (G₄S)₄G и внеклеточный домен TGF-βRII, а SEQ ID NO: B относится к последовательности легкой цепи. Аналог эталонной молекулы PD-L1-TGF-β TRAP содержит два PD-L1-связывающих домена и два внеклеточных домена TGF-βRII.

Фигура 1. Процент ингибирования PD-1-опосредованного рекрутинга SHP биспецифическими антителами и контрольными антителами по результатам измерения в анализе рекрутинга PD-1-SHP. А) Биспецифические антитела представляют собой следующие: SEQ ID NO: 39 × SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 5. Контрольные антитела представляют собой следующие: аналог пембролизумаба – SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79, аналог молекулы PD-L1-TGF-β TRAP – SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81, и аналог TGF1 – SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77. В) Биспецифические антитела представляют собой следующие: SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 47 × SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 88 × SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 89 × SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 43 × SEQ ID NO: 9. Контрольные антитела представляют собой следующие: аналог пембролизумаба – SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79, и IgG1 к RSV – SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87.

Фигура 2. Кратность индукции активации Т-клеток биспецифическими антителами и контрольными антителами по результатам измерения с помощью анализа PD-1-NFAT по гену-репортеру. А) Биспецифические антитела представляют собой следующие: SEQ ID NO: 39 × SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 5. Контрольные антитела представляют собой следующие: аналог пембролизумаба – SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79, аналог молекулы PD-L1-TGF-β TRAP – SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81, и аналог TGF1 – SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77. В) Биспецифические антитела представляют собой следующие: SEQ ID NO: 47 × SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 88 × SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 89 × SEQ ID NO: 13. Контрольные антитела представляют собой следующие: аналог пембролизумаба – SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79, и IgG1 к RSV – SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87. С) Биспецифические антитела

представляют собой следующие: SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 43 × SEQ ID NO: 9. Контрольные антитела представляют собой следующие: аналог пембролизумаба – SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79, и IgG1 к RSV – SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87.

Фигура 3. Ингибирование фосфо-SMAD2/3 биспецифическими антителами и контрольными антителами на клетках Jurkat-PD-1^{null} (A-G) и клетках Jurkat-PD-1⁺ (H-N). На данных графиках представлены уровни фосфо-SMAD2/3 в лизатах клеток Jurkat-PD-1^{null} и клеток Jurkat-PD-1⁺, инкубированных с биспецифическими антителами или контрольными антителами. Фразой «без TGF-β1» указан фоновый уровень фосфо-SMAD2/3 без добавления лиганда TGF-β по результатам измерений в отсутствие биспецифических антител, фразой «10 нг/мл TGF-β1» указан максимальный уровень фосфо-SMAD2/3 при добавлении 10 нг/мл лиганда TGF-β в отсутствие биспецифических антител. Контрольные антитела представляют собой следующие: IgG1 к RSV – SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87, аналог TGF1 – SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77 и антитела TGF-βRIIхRSV, содержащие TGF-βRII-связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность переменного участка тяжелой цепи, которая изложена под SEQ ID NO: 23, 31, 39, 27, 35 или 43, RSV-связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность переменного участка тяжелой цепи, которая изложена под SEQ ID NO: 86, и общую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность переменного участка легкой цепи, которая изложена под SEQ ID NO: 48, и аминокислотную последовательность константного участка легкой цепи, которая изложена под SEQ ID NO: 75. Каждой точкой данных представлено среднее поглощение соответствующих дубликатов. А и Н: биспецифические антитела, содержащие PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, 5, 9, 14 или 19, и TGF-βRII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 23; В

и I: биспецифические антитела, содержащие PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, 5, 9, 14 или 19, и TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 31; С и J: биспецифические антитела, содержащие PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, 5, 9, 14 или 19, и TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 39; D и K: биспецифические антитела, содержащие PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, 5, 9, 14 или 19, и TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 27, E и L: биспецифические антитела, содержащие PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, 5, 9, 14 или 19, и TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35; F и M: биспецифические антитела, содержащие PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, 5, 9, 14 или 19, и TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 43; G и N: биспецифические антитела представляют собой следующие: SEQ ID NO: 23 \times SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23 \times SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 43 \times SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23 \times SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 23 \times SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 47 \times SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO:

88 × SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 89 × SEQ ID NO: 13. Контрольные антитела представляют собой следующие: IgG1 к RSV – SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87, аналог TGF1 – SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77, и пембролизумаб – SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79.

Фигура 4. Измерение внутриклеточного фосфо-SMAD2 методом проточной цитометрии. На данных графиках представлены уровни внутриклеточного фосфо-SMAD2 простимулированных и непростимулированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, инкубированных с биспецифическими антителами или контрольными антителами. Биспецифические антитела представляют собой следующие: SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 47 × SEQ ID NO: 13. Контрольные антитела представляют собой следующие: IgG1 к RSV – SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87, аналог TGF1 – SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77, и пембролизумаб – SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79. А: простимулированные CD4⁺ Т-клетки от донора А; В: простимулированные CD8⁺ Т-клетки от донора А; С: непростимулированные CD4⁺ Т-клетки от донора А; D: непростимулированные CD8⁺ Т-клетки от донора А; Е: простимулированные CD4⁺ Т-клетки от донора В; F: простимулированные CD8⁺ Т-клетки от донора В; G: непростимулированные CD4⁺ Т-клетки от донора В; H: непростимулированные CD8⁺ Т-клетки от донора В.

Фигура 5. Результаты измерения продуцирования цитокинов, индуцируемого биспецифическими антителами или контрольными антителами, в анализе MLR с истощенными лимфоцитами. Протестированные биспецифические антитела представляют собой следующие: SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 31 × SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 39 × SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 27 × SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 43 × SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 43 × SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 47 × SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 88 × SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO:

89 × SEQ ID NO: 13. Контрольные антитела представляют собой следующие: IgG1 к RSV – SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87, аналог TGF1 – SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77, комбинация пембролизумаба и аналога TGF1 – SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79 + SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77, аналог молекулы PD-L1-TGF-β TRAP – SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81, и пембролизумаб – SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79. А: на данном графике представлена индукция секреции цитокина IFN-γ истощенными Т-клетками от одного репрезентативного донора. В: на данном графике представлена индукция секреции цитокина IFN-γ истощенными Т-клетками от одного репрезентативного донора. С: на данном графике представлена индукция секреции цитокина IL-2 истощенными Т-клетками от одного репрезентативного донора. D: на данном графике представлена индукция секреции цитокина TNF-α истощенными Т-клетками у одного репрезентативного донора. E: на данном графике представлена индукция секреции цитокина TNF-α истощенными Т-клетками у одного репрезентативного донора.

Фигура 6. Результаты измерения % ингибирования TGF-β-индуцируемой передачи сигналов, которая индуцирована биспецифическими антителами или контрольными антителами. Биспецифические антитела представляют собой следующие: SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 39 × SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 27 × SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 43 × SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 43 × SEQ ID NO: 19. Контрольные антитела представляют собой следующие: IgG1 к RSV – SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87, аналог TGF1 – SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77, и пембролизумаб – SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79. А и В: на данных графиках представлено ингибирование передачи сигналов TGF-β биспецифическими антителами или контрольными антителами в клетках HEK-Blue™ TGF-β. С и D: на данных графиках представлено ингибирование передачи сигналов TGF-βR биспецифическими антителами или контрольными антителами в клетках HEK-Blue™ TGF-β-PD-1⁺.

Фигура 7. Результаты измерения продуцирования цитокинов, индуцируемого биспецифическими или контрольными антителами, в анализе подавления Трег-клеток. Биспецифические антитела представляют собой следующие: SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 31 × SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 39 × SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 27 × SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 43 × SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 43 × SEQ ID NO: 19. Контрольные антитела представляют собой следующие: IgG1 к RSV – SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87, аналог TGF1 – SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77, комбинация пембролизумаба и аналога TGF1 – SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79 + SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77, и пембролизумаб – SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79. А: на данном графике представлена индукция секреции цитокина IFN-γ в совместной культуре Трег-клеток с PBMC от одного репрезентативного донора. В: на данном графике представлена индукция секреции цитокина TNF-α в совместной культуре Трег-клеток с PBMC от одного репрезентативного донора.

Фигура 8. Результаты измерения продуцирования цитокинов, индуцируемого биспецифическими или контрольными антителами, в анализе подавления макрофагов. Биспецифические антитела представляют собой следующие: SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 23 × SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 43 × SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 39 × SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 43 × SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 35 × SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 31 × SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 27 × SEQ ID NO: 9. Контрольные антитела представляют собой следующие: IgG1 к RSV – SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87, аналог TGF1 – SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77, опдиво, LILRB2, аналог молекулы PD-L1-TGF-β TRAP – SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81, пембролизумаб – SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79, и аналог ниволумаба – SEQ ID NO: 96/SEQ ID NO: 97. А: на данных графиках представлена экспрессия CD163, CD209, CD206 и CD86 на макрофагах M2, полученных из PBMC от трех разных доноров. В: на данных графиках представлена индукция секреции цитокинов

IFN- γ посредством CD4⁺ Т-клеток в присутствии макрофагов M2, полученных из РВМС от трех разных доноров.

Фигура 9. *In vivo* эффективность биспецифических антител. А: на данном графике представлено уменьшение объема опухоли в мм³, индуцированное контрольными и эталонными антителами. В-Е: на данных графиках представлено уменьшение объема опухоли в мм³, индуцированное биспецифическими антителами в сравнении с контрольными и эталонными антителами. Биспецифические антитела представляют собой следующие: SEQ ID NO: 43 \times SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 43 \times SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 23 \times SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 23 \times SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 39 \times SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 27 \times SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23 \times SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 47 \times SEQ ID NO: 13. Контрольные антитела представляют собой следующие: IgG1 к RSV – SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87, аналог TGF1 – SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77, пембролизумаб – SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79, аналог молекулы PD-L1-TGF- β TRAP – SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81, и комбинация пембролизумаба и аналога TGF1 – SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79 + SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77. Биспецифические антитела вводили в дозе 1 мг/кг (1) и/или 10 мг/кг (10) (А-С) и только 10 мг/кг (D-F). F: на левом графике представлена степень занятости рецепторов TGF- β RII, а на правом графике — степень занятости рецепторов PD-1 после обработки биспецифическими или контрольными антителами.

Фигура 10. Карта вектора

Фигура 11. *In vivo* эффективность биспецифических антител. На данном графике представлено уменьшение объема опухоли в мм³, индуцированное иллюстративным биспецифическим антителом при двух различных уровнях доз: 1 мг/кг и 10 мг/кг в сравнении с контрольным антителом в дозе 10 мг/кг. Биспецифическое антитело представляет собой следующее: SEQ ID NO: 23 \times SEQ ID NO: 18, а контрольное антитело представляет собой следующее: SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87.

Примеры

В примерах, которые используются для иллюстрации настоящего изобретения, но не предназначены для какого-либо его ограничения, каждый связывающий домен биспецифических антител содержит вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, и константный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 75. Биспецифические антитела предпочтительно представляют собой антитела IgG1, содержащие CH1, шарнирный участок, CH2 и CH3. В примерах, которые используются для иллюстрации настоящего изобретения, но не предназначены для какого-либо его ограничения, биспецифические антитела были подвергнуты скринингу в формате IgG1, где PD-1-связывающая тяжелая цепь содержит CH1, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 69, CH2, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 71, и CH3, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 73, а TGF- β RII-связывающая тяжелая цепь содержит CH1, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 69, CH2, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 71, и CH3, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 74.

К эталонным антителам и молекулам, а также контрольным антителам, используемым в примерах, относятся описанные ниже.

- Аналог эталонного антитела к PD-1 под названием «пембролизумаб», который представляет собой бивалентное моноспецифическое антитело, содержащее две тяжелые цепи, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 78, и две легкие цепи, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 79.

- Эталонное антитело к PD-1 под названием «пембролизумаб» (производства компании Merck, распространяемое компанией Myonex).
- Эталонное антитело TGF1 к TGF- β RII, которое представляет собой бивалентный моноспецифический аналог TGF1 и содержит две тяжелые цепи, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 76, и две легкие цепи, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 77.
- Эталонная молекула PD-L1-TGF- β TRAP, которая представляет собой аналог бивалентного бинтрафуса альфа, моноспецифического в отношении связывания с PD-L1, и содержит две тяжелые цепи, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 80, и две легкие цепи, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 81, с внеклеточным доменом TGF- β RII, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 104, связанным с С-концом каждой тяжелой цепи посредством линкера (G₄S)₄G.
- Отрицательный контроль в форме антитела IgG1 (RSV-G), которое представляет собой бивалентное моноспецифическое антитело, содержащее две тяжелые цепи, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 86, и две легкие цепи, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 87.
- Контрольные антитела TGF- β RIIxRSV, которые представляют собой бивалентные биспецифические антитела, содержащие TGF- β RII-связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность переменного участка тяжелой цепи, которая изложена под SEQ ID NO: 23, 31, 39, 27, 35 или 43, RSV-связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность переменного участка тяжелой цепи, которая изложена под SEQ ID NO: 86, и общую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность переменного участка легкой цепи, которая изложена под SEQ ID NO: 48, и

аминокислотную последовательность константного участка легкой цепи, которая изложена под SEQ ID NO: 75.

- Положительный контроль в форме LILRB2 (BioLegend; кат. № 338714).
- Коммерческое эталонное антитело к PD-1 под названием «опдиво» (производства Bristol Myers Squibb (BMS)).

ПРИМЕР 1. Получение биспецифических антител PD-1xTGF-βRII

Связывающие домены, антитела, а также переменные участки тяжелой цепи со специфичностью связывания с PD-1 человека и переменные участки тяжелой цепи со специфичностью связывания с TGF-βRII человека получали путем иммунизации трансгенных мышей, характеризующихся наличием общей легкой цепи IGKV1-39 (мыши MeMo®), антигенными молекулами PD-1 или TGF-βRII человека, в том числе с помощью различных форм доставки ДНК, белков и клеточных антигенов.

Для получения биспецифических антител были отобраны переменные участки тяжелой цепи со специфичностью связывания с PD-1 человека, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 14, 18 и 19, и переменные участки тяжелой цепи со специфичностью связывания с TGF-βRII человека, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, изложенной под SEQ ID NO: 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 88 и 89. Последовательности связывающего домена, представленные в данном документе, после того, как они были охарактеризованы и секвенированы с помощью методик, приведенных в данном документе, впоследствии можно получить с помощью любого способа, известного из уровня техники.

TGF- β RII										
PD-1		SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 89
	SEQ ID NO: 1	PB1	PB2	PB3	PB4	PB5	PB6	PB7	PB50	PB57
	SEQ ID NO: 5	PB8	PB9	PB10	PB11	PB12	PB13	PB14	PB51	PB58
	SEQ ID NO: 9	PB15	PB16	PB17	PB18	PB19	PB20	PB21	PB52	PB59
	SEQ ID NO: 13	PB22	PB23	PB24	PB25	PB26	PB27	PB28	PB53	PB60
	SEQ ID NO: 14	PB29	PB30	PB31	PB32	PB33	PB34	PB35	PB54	PB61
	SEQ ID NO: 18	PB36	PB37	PB38	PB39	PB40	PB41	PB42	PB55	PB62
	SEQ ID NO: 19	PB43	PB44	PB45	PB46	PB47	PB48	PB49	PB56	PB63

Таблица 1. Комбинация переменных участков тяжелой цепи к PD-1 и переменных участков тяжелой цепи к TGF- β RII, которые можно применять для получения биспецифических антител

Биспецифические антитела IgG получали путем временной совместной трансфекции двух плазмидных векторов: одного, кодирующего тяжелую цепь IgG с PD-1-связывающим участком VH, и другого, кодирующего тяжелую цепь IgG с TGF- β RII-связывающим участком VH. Для обеспечения эффективной гетеродимеризации и образования биспецифических антител использовали технологию конструирования CH3, описанную в WO 2013/157954 и WO 2013/157953. Оба вектора дополнительно кодируют общую легкую цепь, содержащую переменный участок легкой цепи IGKV1-39/Jk1. Трансфекцию клеток, культивирование клеток, а также сбор и очистку антител осуществляли способами, известными из уровня техники.

ПРИМЕР 2. Анализ рекрутинга PD-1-SHP

Характеристики биспецифических антител изучали с помощью анализа рекрутинга PD-1-SHP для определения их способности блокировать связывание лиганда с PD-1 и тем самым ингибировать передачу сигналов PD-1/PD-L1 в Т-клетках. Анализ рекрутинга PD-1-SHP предусматривает использование двухклеточной системы, включающей клетки U2OS, сконструированные для экспрессии рецептора PD-1, меченного донором-ферментом (ED) (например, PD-L1 или PD-L2), и Т-клеток Jurkat, экспрессирующих PD-1 и сконструированных для экспрессии SHP1, слитого с акцептором-ферментом (EA). Индуцируемая лигандом или агонистическим антителом активация PD-1 у Т-клеток Jurkat приводит к рекрутингу SHP1, усилению взаимодействия ED и EA и восстановлению активного фермента β -gal (β -галактозидазы). Восстановленная β -gal производит хемилюминесцентный сигнал в присутствии субстрата.

Образцы антител включали несколько биспецифических антител, отрицательный контроль в форме антитела IgG1 (RSV), аналог эталонного антитела к PD-1 под названием «пембролизумаб», аналог эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII и аналог эталонной молекулы PD-L1-TGF- β TRAP.

Клетки U2OS/PD-L1 (DiscoverX Corporation) поддерживали в среде Маккоя 5A (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 10% FBS + 0,25 мкг/мл пуромицина (Thermo Fisher Scientific). Клетки Jurkat-PD-1-SHP (SHP: фосфатаза, содержащая домен с гомологичным участком 2 Src; DiscoverX Corporation) культивировали в среде RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific), дополненной 10% FBS, 250 мкг/мл гигромицина В (Thermo Fisher Scientific) и 500 мкг/мл G418 (Thermo Fisher Scientific). Клетки U2OS/PD-L1 и Jurkat-PD-1-SHP сначала центрифугировали в конической пробирке для удаления культуральной среды, а затем промывали и ресуспендировали в среде для анализа (среда RPMI1640 с 1% FBS) перед высевом клеток. Клетки U2OS/PD-L1 вносили в 384-луночный черный аналитический планшет с прозрачным дном (планшеты для культивирования тканей CELLCOAT®, Greiner Bio-One) в количестве 5000 клеток на лунку в 20 мкл среды для анализа. Образцы антител получали путем серийного разведения в фосфатно-солевом буфере (PBS) с 1% FBS и 5 мкл/лунка

переносили в планшет для клеток и инкубировали при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение одного часа. Затем в планшет для клеток вносили клетки Jurkat-PD-1-SHP в количестве 5000 клеток на лунку в 20 мкл среды для анализа и инкубировали их при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение двух часов перед внесением в каждую лунку 2,5 мкл реагента 1 PathHunter (DiscoverX Corporation). Затем аналитический планшет встряхивали в течение 1 минуты на скорости 350 об./мин. и выдерживали в темноте в течение 15 минут при комнатной температуре с последующим внесением 10 мкл реагента 2 PathHunter (DiscoverX Corporation). После инкубации при комнатной температуре в течение одного часа с помощью ридера TopCount (Perkin Elmer) регистрировали хемилюминесцентный сигнал. Положительными контролями служили лунки только с PBS, а в качестве отрицательных контролей использовали лунки, не содержащие клеток. Определение IC₅₀ осуществляли путем аппроксимации кривой процента активности контроля в зависимости от логарифма концентрации соединения с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7.0.

Результаты представлены в таблице 2 и на фигуре 1. Все биспецифические антитела ингибировали PD-1-опосредованный рекрутинг SHP. Ряд биспецифических антител, которые являются моновалентными в отношении связывания PD-1, в анализе рекрутинга PD-1-SHP равноэффективны бивалентному моноспецифическому аналогу эталонного антитела к PD-1 под названием «пембролизумаб» и эталонной молекуле PD-L1-TGF- β TRAP, которая является бивалентной в отношении связывания PD-L1.

IC ₅₀ (нг/мл)	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 43
SEQ ID NO: 86	-	-	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 1	271	277	390	428	410	415	278
SEQ ID NO: 5	126	141	160	158	118	78	312

SEQ ID NO: 9	101	120	137	94	122	130	226
SEQ ID NO: 14	202	257	337	251	167	255	238
SEQ ID NO: 19	207	234	400	237	232	220	267

Таблица 2. Результаты анализа рекрутинга PD-1-SHP

ПРИМЕР 3. Анализ PD-1-NFAT по гену-репортеру

Характеристики биспецифических антител изучали с помощью анализа PD-1-NFAT по гену-репортеру для определения их способности блокировать передачу сигналов PD-1/PD-L1 в активированных Т-клетках. Анализ PD-1-NFAT по гену-репортеру предусматривает использование системы из двух трансгенных линий клеток с PD-L1⁺ клетками аAPC/CHO-K1, совместно экспрессирующими когнатный белок TCR, и PD-1⁺ эффекторными Т-клетками Jurkat, управляющими люциферазным репортером под контролем цис-элемента NFAT-RE. Эффекторные Т-клетки Jurkat активируют передачу сигналов TCR антиген-независимым способом. Взаимодействие PD-1/PD-L1 ингибирует TCR-опосредованную люминесценцию. Блокировка взаимодействия PD-1/PD-L1 делает возможной передачу сигналов TCR, тем самым индуцируя люминесценцию, поддающуюся детекции при добавлении субстрата.

Образцы антител включали несколько биспецифических антител, отрицательный контроль в форме антитела IgG1 (RSV), аналог эталонного антитела к PD-1 под названием «пембролизумаб», аналог эталонного антитела TGF1 к TGF-βRII и аналог эталонной молекулы PD-L1-TGF-β TRAP.

Клетки аAPC/CHO-K1 с PD-L1 (клетки аAPC (искусственная антигенпрезентирующая клетка) / CHO (яичника китайского хомячка)-K1; Promega) поддерживали в среде F-12 (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 10% FBS, 200 мкг/мл гидромицина В (Thermo Fisher Scientific) и 250 мкг/мл генетицина (G418; Thermo Fisher Scientific). Эффекторные клетки Jurkat-PD-1-NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток; Promega) культивировали в

среде RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific), дополненной 10% FBS, 100 мкг/мл гистромицина В (Thermo Fisher Scientific) и 500 мкг/мл G418 (Thermo Fisher Scientific). Как клетки aAPC/CHO-K1 с PD-L1, так и эффекторные клетки Jurkat-PD-1-NFAT сначала центрифугировали для удаления культуральной среды, затем промывали и ресуспендировали в среде для анализа (среда RPMI1640 с 1% FBS) перед высевом клеток. Клетки aAPC/CHO-K1 с PD-L1 вносили в 384-луночный белый аналитический планшет с прозрачным дном (планшеты для культивирования тканей CELLCOAT®, Greiner Bio-One) в количестве 8000 клеток на лунку в 10 мкл аналитической среды. Образцы антител получали путем серийного разведения в фосфатно-солевом буфере (PBS) с 1% FBS и 5 мкл/лунка переносили в планшет для клеток. Затем эффекторные клетки Jurkat-PD-1-NFAT распределяли в каждую лунку в количестве 10000 клеток на лунку в 5 мкл среды для анализа. Аналитический планшет инкубировали при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 часов. После уравнивания аналитического планшета до комнатной температуры в течение 15 минут вносили 20 мкл/лунка реагента Bio-Glo™ (Promega). После 8 минут инкубации при комнатной температуре с помощью микропланшет-ридера Pherastar (BMG Labtech) считывали люминесценцию. В качестве отрицательных контролей (0% индукции) служили лунки с PBS, а в качестве положительных контролей (100% индукции) использовали лунки, содержащие 12,5 мкг/мл аналога пембролизумаба. Определение EC₅₀ осуществляли путем аппроксимации кривой процента активности контроля в зависимости от логарифма концентрации соединения с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7.0.

Результаты представлены в таблице 3 и на фигуре 2. Все биспецифические антитела ингибировали PD-1-опосредованное ингибирование Т-клеток. Ряд биспецифических антител, которые являются моновалентными в отношении связывания PD-1, в анализе PD-1-NFAT по гену-репортеру равноэффективны бивалентному моноспецифическому аналогу эталонного антитела к PD-1 под названием «пембролизумаб».

EC ₅₀	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID
(нг/мл)	NO: 86	NO: 23	NO: 31	NO: 39	NO: 27	NO: 35	NO: 43
SEQ ID NO: 86	-	-	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 1	1352	1828	3569	1775	756	2030	1236
SEQ ID NO: 5	545	444	535	299	369	533	555
SEQ ID NO: 9	346	448	325	287	317	664	257
SEQ ID NO: 14	1513	869	868	904	772	686	790
SEQ ID NO: 19	791	771	2900	1019	741	936	681

Таблица 3. Результаты анализа PD-1-NFAT по гену репортеру

ПРИМЕР 4. Анализ фосфо-SMAD2/3 в клетках Jurkat

Характеристики биспецифических антител изучали с помощью анализа фосфо-SMAD2/3 в клетках Jurkat для определения их способности блокировать передачу сигналов TGF- β RII в T-клетках. Анализ фосфо-SMAD2/3 в клетках Jurkat предусматривал сравнение активности биспецифических антител на клетках Jurkat-PD-1^{null} и клетках Jurkat-PD-1⁺ для определения того, ингибируют ли биспецифические антитела TGF- β -индуцированное фосфорилирование SMAD2/3 в корреляции с PD-1. В качестве контрольных антител были включены аналог эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII, биспецифическое антитело TGF- β RIIxRSV и отрицательный контроль в форме бивалентного моноспецифического антитела IgG1, содержащего тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 86, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 87.

Клетки Jurkat-PD-1^{null} (ATCC, кат. № TIB-152) и Jurkat-PD-1⁺ (Promega, кат. № CS187105) в RPMI/10%FBS высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты. В случае клеток Jurkat-PD-1^{null} экспрессия PD-1 не поддавалась детекции; количество молекул PD-1 на клетках Jurkat-PD-1⁺ с помощью методологии с микроносителями Quantibrite было определено как равное приблизительно 4000. Вносили биспецифические и контрольные антитела в 6-ступенчатых серийных разведениях (от 100 мкг/мл до 0,001 мкг/мл) и

инкубировали клетки в течение одного часа в условиях $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Через один час вносили рекомбинантный TGF- β 1 человека (R&D Systems, кат. № 7754-BH) в конечной концентрации 10 нг/мл и инкубировали клетки еще два часа в условиях $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$. После инкубации клетки осторожно промывали посредством PBS. Клеточные лизаты получали с применением лизирующего буфера (MSD, № R60TX-2), содержащего ингибиторы фосфатаз (Sigma, № P0044 и № P-5726) и ингибиторы протеаз (Pierce Biotechnology, № 87785). Образцы нормализовали к общему белку с использованием набора для анализа белка BCA (Pierce, № 23227). Уровни фосфо-SMAD2/3 определяли с помощью набора для ELISA (Cell Signaling, № 12001) в соответствии с инструкциями производителя. Для построения графиков использовали GraphPad Prism (8.2.0).

Результаты представлены в таблицах 4, 5 и 6 и на фиг. 3. В таблице 6 представлена кратная разница для 10 биспецифических антител в эффективности ингибирования передачи сигналов TGF- β RII в клетках Jurkat-PD-1^{null} в сравнении с клетками Jurkat-PD-1⁺. Кратная разница в случае биспецифических антител в данном анализе находится в диапазоне 200-11000 раз в сторону повышения, чем у аналога эталонного антитела TGF1.

Все биспецифические антитела ингибировали передачу сигналов TGF- β RII как в клетках Jurkat-PD-1^{null}, так и в клетках Jurkat-PD-1⁺. Биспецифические антитела более эффективны в ингибировании передачи сигналов TGF- β RII в клетках Jurkat-PD-1⁺, нежели в клетках Jurkat-PD-1^{null}, что свидетельствует о том, что они ингибируют TGF- β -индуцированное фосфорилирование SMAD2/3 в корреляции с экспрессией PD-1. В случае всех биспецифических антител необходима более высокая концентрация для ингибирования передачи сигналов TGF- β RII в клетках Jurkat-PD-1^{null}, чем в случае аналога эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII. Многие биспецифические антитела, которые моновалентны в отношении связывания с TGF- β RII, превосходят бивалентный моноспецифический аналог эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII в ингибировании передачи сигналов TGF- β RII в клетках Jurkat-PD-1⁺.

	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 43
SEQ ID NO: 86	-	54560	19170	14190	31510	15700	21600
SEQ ID NO: 1	-	60540	38700	17200	42960	23030	15240
SEQ ID NO: 5	-	41320	43600	30640	64230	24590	18080
SEQ ID NO: 9	-	70920	32920	29670	55380	16400	13100
SEQ ID NO: 14	-	55380	13620	21750	46580	19850	15380
SEQ ID NO: 19	-	41450	15250	8383	40960	26050	22760

Таблица 4. Значения IC_{50} для клеток *Jurkat-PD-1^{null}* в анализе фосфо-SMAD2/3 в клетках *Jurkat*

IC_{50} (нг/мл)	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 43
SEQ ID NO: 86	-	37100	18160	10010	6118	31580	10130
SEQ ID NO: 1	-	182	27	9	7	577	16
SEQ ID NO: 5	-	3	15	24	35	10	7
SEQ ID NO: 9	-	128	10	101	7	13	17
SEQ ID NO: 14	-	4	1	10	10	11	53
SEQ ID NO: 19	-	3	11	56	6	21	11

Таблица 5. Значения IC_{50} для клеток *Jurkat-PD-1⁺* в анализе фосфо-SMAD2/3 в клетках *Jurkat*

TGF- β RII	PD-1	Кратная разница pSMAD для PD-1 ^{null} в сравнении с PD-1 ⁺
SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 14	13845
SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 19	13817
SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 14	13620
SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 9	294
SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 9	1262
SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 14	1805

SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 19	1240
SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 9	7911
SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 9	771
SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 19	2069
	SEQ ID NO: 78/ SEQ ID NO: 79	Н/Д
SEQ ID NO: 76/ SEQ ID NO: 77		1,3

Таблица 6. Кратная разница в эффективности ингибирования передачи сигналов TGF- β RII в клетках Jurkat-PD-1^{null} в сравнении с клетками Jurkat-PD-1⁺

ПРИМЕР 5. Анализ фосфо-SMAD2 с простимулированными и непростимулированными CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками

Характеристики биспецифических антител изучали с помощью анализа фосфо-SMAD2 для определения их специфичности блокирования передачи сигналов TGF- β RII в PD-1-положительных Т-клетках. Анализ фосфо-SMAD2 предусматривал сравнение активности биспецифических антител на непростимулированных Т-клетках, характеризующихся низкими уровнями экспрессии PD-1, и простимулированных Т-клетках, характеризующихся высокими уровнями экспрессии PD-1, для определения того, ингибируют ли биспецифические антитела TGF- β -индуцированное фосфорилирование SMAD2 в корреляции с экспрессией PD-1. В качестве положительных контролей и отрицательного контроля были включены соответственно аналог эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII, эталонное антитело к PD-1 под названием «пембролизумаб» и отрицательный контроль в форме бивалентного моноспецифического антитела IgG1, содержащего тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 86, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 87.

PBMC от здоровых доноров стимулировали посредством 1 мкг/мл антитела к CD3 (BD Biosciences, № 555336) в течение 48 часов с последующей 16-часовой

депривацией сыворотки крови (0,1% FBS). Количество молекул PD-1 на активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках с помощью методологии с микроносителями Quantibrite было определено как равное приблизительно 1000-2000. Затем простимулированные и непростимулированные PBMC инкубировали с биспецифическими и контрольными антителами в течение 30 минут при комнатной температуре. Рекомбинантный TGF- β 1 человека (Cell Signaling, № 7754-BH) вносили в конечной концентрации 1 нг/мл и клетки инкубировали еще 30 минут. Наконец, клетки дважды промывали посредством PBS и окрашивали на маркеры клеточной поверхности с последующим внутриклеточным окрашиванием фосфо-SMAD2.

При окрашивании для проточной цитометрии использовали следующие антитела: антитела к CD45 человека (клон: HI30; кат. № 557748, BD Biosciences), CD11b человека (клон: M1/70; кат. № 563015, BD Biosciences), CD3 человека (клон: UCHT1; кат. № 565491, BD Biosciences), CD4 человека (клон: SK3; кат. № 563550, BD Biosciences), CD8 человека (клон № SK1, кат. № 344714, Biolegend) и фосфо-SMAD2 человека (кат. № 56532, Cell Signaling). Для исключения мертвых клеток во время анализа использовали краситель на жизнеспособность (Biolegend, № 423114). Сбор клеток осуществляли в системе FACSymphony A3 с использованием программного обеспечения DIVA.

PBMC гейтировали по размеру и гранулированности с использованием FSC-A и SSC-A для исключения дэбриса. Затем мертвые клетки исключали с помощью фиксируемого красителя на жизнеспособность. Отбирали CD45-положительные клетки с последующим отбором CD11b-отрицательных и CD3-положительных Т-клеток. Наконец, гейтировали положительные по CD4 и CD8 субпопуляции и измеряли сигнал фосфо-SMAD2 по средней геометрической интенсивности флуоресценции (GMFI) в данных субпопуляциях. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения FlowJo, а для построения графиков использовали GraphPad Prism (8.2.0).

Результаты представлены на фигуре 4. Все биспецифические антитела ингибировали передачу сигналов TGF- β RII в простимулированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках. У одного донора (донора В) биспецифические антитела не ингибировали передачу сигналов TGF- β RII в непростимулированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках. У другого донора биспецифическое антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи к PD-1, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 18, и переменный участок тяжелой цепи к TGF- β RII, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 23, не ингибировало передачу сигналов TGF- β RII в непростимулированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, а биспецифическое антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи к PD-1, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 13, и переменный участок тяжелой цепи к TGF- β RII, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 47, ингибировало передачу сигналов TGF- β RII в непростимулированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках значительно менее эффективно, чем в простимулированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках. Эти данные подтверждают результаты, полученные в примере 4, о том, что биспецифические антитела ингибируют TGF- β -индуцированное фосфорилирование SMAD в корреляции с экспрессией PD-1.

ПРИМЕР 6. Анализ реакции истощенных смешанных лимфоцитов (MLR)

Характеристики биспецифических антител изучали с помощью анализа реакции истощенных смешанных лимфоцитов (MLR) для определения их эффективности в индукции продуцирования цитокинов истощенными Т-клетками.

Образцы антител включали несколько биспецифических антител, отрицательный контроль в форме антитела IgG1 (RSV), эталонное антитело к PD-1 под названием «пембролизумаб», аналог эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII и комбинацию эталонного антитела к PD-1 под названием «пембролизумаб» и аналога эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII.

РВМС человека выделяли от здоровых доноров. Истощение Т-клеток *in vitro* осуществляли путем периодической активации РВМС стафилококковым энтеротоксином В (SEB) в течение 6 дней. Общие Т-клетки выделяли с помощью набора для выделения Т-клеток (StemCell Technologies, кат. № 17951) в соответствии с инструкциями производителя. Т-клетки смешивали с дендритными клетками (DC) от разных доноров в соотношении Т-клеток к DC 10:1 в 96-луночных планшетах с U-образным дном. Вносили серийные разведения образцов антител и инкубировали планшеты еще шесть дней в условиях 37°C/5% CO₂. Через шесть дней уровень цитокинов IFN- γ , IL-2 или TNF- α в супернатанте измеряли с помощью специализированного набора от MSD. Для построения графиков использовали GraphPad Prism (8.2.0).

Репрезентативные результаты двух экспериментов с пятью донорами в каждом случае представлены на фиг. 5А, С и D. Результаты дополнительного эксперимента с тремя донорами представлены на фиг. 5В и E. Большинство биспецифических антител индуцировали уровни IFN- γ , IL-2 или TNF- α , схожие с таковыми в случае эталонного антитела к PD-1 под названием «пембролизумаб», аналога эталонной молекулы PD-L1-TGF- β TRAP или комбинации эталонного антитела к PD-1 под названием «пембролизумаб» и эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII. Значения IC₅₀ для ряда биспецифических антител из первоначального исследования представлены в таблице 7.

TGF- β RII	PD-1	AUC IFN γ (% комбинации)	AUC IL2 (% комбинации)	AUC TNF α (%комбинации)
SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 14	95,3	97,1	92
SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 19	121,3	98,5	93,2
SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 14	137,2	105,4	100,4
SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 9	139,3	105,9	101
SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 9	132,5	101,9	96
SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 14	121,2	104,3	94,5

SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 19	94,1	91,8	78
SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 9	90,1	86,7	76,4
SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 9	98,5	104,3	83,1
SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 19	95,7	89	77,5

Таблица 7. Значения IC_{50} по результатам анализа MLR с истощенными клетками

ПРИМЕР 7. Анализ HEK-BLUE-PD-1 TGF- β по гену-репортеру

Характеристики биспецифических антител изучали с помощью анализа HEK-BLUE-PD-1 TGF- β по гену-репортеру для определения их эффективности в ингибировании TGF- β -индуцированной передачи сигналов в Т-клетках. Стимуляция клеток HEK-Blue™ TGF- β или клеток HEK-Blue™ TGF- β -PD-1⁺ посредством TGF- β индуцирует активацию сигнального пути TGF- β /Smad, что приводит к образованию комплекса Smad3/Smad4, индуцирующего продуцирование SEAP.

Используемые реагенты: рекомбинантный белок TGF-бета 1 человека (экспрессируемый клетками человека), R&D, кат. № 7754-ВН. Питательная среда: DMEM, 4,5 г/л глюкозы, 2 мМ L-глутамин, 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки крови (FBS; 30 мин. при 56°C), 100 мкг/мл Normocin™, пенициллин - стрептомицин (100 ед./мл - 100 мкг/мл). Питательная среда с пурамицином в количестве 0,4 мкг/мл для клеток HEK-Blue™ TGF- β - PD-1⁺. Тестовая среда: DMEM, 4,5 г/л глюкозы, 2 мМ L-глутамин, 0,1% термоинактивированной FBS, пенициллин - стрептомицин (100 ед./мл - 100 мкг/мл) без Normocin™, бластицидин, гигромицин В и Zeocin™.

Стабильную линию клеток HEK-Blue™ TGF- β , экспрессирующую PD-1, получали следующим образом: полноразмерные кодирующие последовательности для PD-1 вставляли в вектор экспрессии для млекопитающих pD2529-EFM (ATUM), который содержит ген устойчивости к пурамицину. Промотор представляет собой модифицированный EF1a. Конструирование вектора было выполнено компанией ATUM, а

последовательность была подтверждена. Карту вектора см. на фиг. 10. Клетки HEK-Blue™ TGF-β (Invivogen), у которых экспрессия PD-1 не поддавалась детекции, подвергали трансфекции с использованием реагента для трансфекции TransIT-293 (Mirus Bio) согласно протоколам производителя. Стабильно трансфицированные клетки отбирали в среде HEK-Blue™ TGF-β, содержащей 0,4 мкг/мл пурамицина. Клоны выделяли путем предельного разведения и изучали у них экспрессию PD-1 с помощью вестерн-блоттинга. Был выбран один клон на основании 1) его стабильной и однородной экспрессии поверхностного PD-1 (один пик на гистограмме), 2) наличия сходной экспрессии поверхностного TGF-βRII при сравнении с исходной линией клеток HEK-Blue™ и 3) наличия EC50, схожей с таковой у эталонного антитела к TGF1 в анализе по гену-репортеру. GMFI для PD-1 у выбранного клона составляла 3272 в сравнении с 5 для исходной линии клеток и 8 для изотипического контроля. Количество молекул PD-1 на данных клетках с помощью методологии с микроносителями Quantibrite было определено как равное приблизительно 20000.

Образцы антител включали несколько биспецифических антител, отрицательный контроль в форме антитела IgG1 (RSV), эталонное антитело к PD-1 под названием «пембролизумаб» и аналог эталонного антитела к TGF1 к TGF-βRII.

Клетки HEK-Blue™ TGF-β (Invivogen, каталожный код: hkb-tgfb), экспрессирующие TGF-βRII, или клетки HEK-Blue™ TGF-β -PD-1⁺ высевали в 96-луночный плоскодонный планшет по 25000 клеток на лунку в тестовую среду. Вносили серийные разведения образцов антител и клетки инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с последующим внесением рекомбинантного TGF-β1 в конечной концентрации 1 нг/мл. Клетки инкубировали в условиях 37°C/ 5% CO₂ в течение ночи. После инкубации из каждой лунки в свежий 96-луночный плоскодонный планшет переносили 40 мкл супернатантов и к супернатанту добавляли 160 мкл ресуспендированного раствора QUANTI-Blue™. Планшет инкубировали в условиях 37°C/5% CO₂ в течение 40 минут. Количество секретированного SEAP в супернатанте оценивали с использованием раствора QUANTI-Blue™, реагента для детекции

SEAP. Уровни SEAP определяли с помощью спектрофотометра при длине волны 650 нм. Для построения графиков использовали GraphPad Prism (8.2.0).

Результаты представлены на фиг. 6 и в таблице 8. У ряда биспецифических антител наблюдали эффективное ингибирование TGF- β -индуцированной передачи сигналов в корреляции с экспрессией PD-1.

Антитело	HEK-Blue™ TGF- β	HEK-Blue™ TGF- β -PD-1+	Кратная разница
SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87	>100	>100	-
SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79	>100	>100	-
SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77	0,8056	0,6551	-
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14	>100 (142)	0,005606	25330
SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19	>100 (177)	0,001747	101317
SEQ ID NO: 31 x SEQ ID NO: 14	9,7	7,404	1,3101
SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9	38	0,000193	197198
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9	18,5	0,001533	12068
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 14	20,45	0,000687	20450
SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 19	23,79	0,001215	19580
SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 9	65	0,00141	46099
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9	8,2	<0,0001	Н/Д
SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19	4,1	<0,0001	Н/Д

Таблица 8. Результаты анализа HEK-BLUE-PD-1 TGF- β по гену репортеру

ПРИМЕР 8. Анализ супрессии Трег-клеток

Характеристики биспецифических антител изучали с помощью анализа супрессии Трег-клеток для определения их способности устранять или уменьшать супрессивный эффект регуляторных Т-клеток и тем самым индуцировать продукцию цитокинов Т-клетками.

Образцы антител включали несколько биспецифических антител, отрицательный контроль в форме антитела IgG1 (RSV), эталонное антитело к PD-1 под названием «пембролизумаб», аналог эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII и

комбинацию эталонного антитела к PD-1 под названием «пембролизумаб» и аналога эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII.

PBMC человека выделяли от здоровых доноров посредством центрифугирования в градиенте фиколл-пака. Treg-клетки выделяли с помощью набора для выделения Treg-клеток EasySep (StemCell Technologies, кат. № 18063) в соответствии с инструкциями производителя. Treg-клетки смешивали с PBMC от того же донора. К совместной культуре добавляли антитела к CD3 (BD Biosciences, № 555336) и антитела к CD28 (BD Biosciences, № 555725). Наконец, вносили серийные разведения биспецифических антител и инкубировали планшеты еще три дня в условиях 37°C/5% CO₂. После трех дней инкубации уровни цитокинов IFN- γ и TNF- α в супернатанте измеряли с помощью набора от MSD (MesoScale). Для построения графиков использовали GraphPad Prism (8.2.0).

Результаты представлены на фиг. 7 и в таблице 9. Большинство биспецифических антител индуцировали уровни IFN- γ или TNF- α , схожие с таковыми в случае эталонного антитела к PD-1 под названием «пембролизумаб» или комбинации эталонного антитела к PD-1 под названием «пембролизумаб» и аналога эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII.

TGF- β RII	PD-1	AUC IFN- γ	AUC TNF- α
		% комбинации эталонных антител	% комбинации эталонных антител
SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 14	95,1	134,5
SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 19	122,5	179,4
SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 14	81,8	101
SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 9	107,2	138,9
SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 9	99,9	121,5
SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 14	123,9	121,7
SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 19	88,3	115,8
SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 9	103,8	127,2
SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 9	109	114
SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 19	128,6	107,2

Таблица 9. Результаты анализа супрессии Treg-клеток

ПРИМЕР 9. Анализ супрессии макрофагов

Опухоль-ассоциированные макрофаги с фенотипом M2 ингибируют пролиферацию Т-клеток и продуцирование цитокинов. Характеристики биспецифических антител изучали с помощью анализа супрессии макрофагов M2 для тестирования того, могут ли они обратить вспять ингибирующее действие макрофагов M2 на пролиферацию Т-клеток и продуцирование IFN- γ .

Биспецифические антитела тестировали вместе с отрицательным контролем в форме антитела IgG1 (RSV), аналогом эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII, аналогом эталонной молекулы PD-L1-TGF- β TRAP, аналогом эталонного антитела к PD-1 под названием «ниволумаб», коммерческим эталонным антителом к PD-1 под названием «опдиво» (BMS), положительным контролем в форме антитела к LILRB2 (Biolegend), изотипическим контролем в форме IgG2a крысы (Biolegend) и изотипическим контролем в форме huIgG4 (Biolegend). Кроме того, в качестве контрольных условий в анализ были включены совместная культура простимулированных CD4⁺ Т-клеток и макрофагов M2 без добавления тестируемых или контрольных антител или только CD4⁺ Т-клетки (непростимулированные или простимулированные).

Выделенные из PBMC моноциты от трех разных здоровых доноров подвергали дифференцировке в макрофаги с помощью M-CSF в течение шести дней и поляризовали с использованием специфического коктейля цитокинов IL-4 (20 нг/мл), IL-10 (20 нг/мл) и TGF- β (20 нг/мл) (+ M-CSF) с получением макрофагов M2. Для подтверждения фенотипа экспрессию CD163 (Miltenye Biotec), CD209 (Miltenye Biotec), CD206 (BD Bioscience) и CD86 (Miltenye Biotec) измеряли методом проточной цитометрии (фигура 8). CD163 экспрессируется M2-подобными макрофагами у всех доноров. Высокий уровень экспрессии CD209 и CD206 M2-макрофагами присутствует у всех доноров. CD86 экспрессируется на низком уровне M2-подобными макрофагами. M2-подобные макрофаги демонстрируют ожидаемый фенотип у всех трех доноров.

Затем макрофаги M2 активировали посредством LPS (100 нг/мл) в течение 4 часов. Макрофаги собирали, промывали и высевали в 5 повторностях в 96-луночные планшеты с аутологичными CD4⁺ активированными Т-клетками (активированными посредством CD3/CD28 ImmunoCult™ от StemCell technologies) в соотношении 1:5 в присутствии тестовых или контрольных антител в концентрации 10 мкг/мл. На день 5 совместного культивирования концентрацию секретируемого IFN- γ измеряли методом ELISA (набор для ELISA IFN- γ человека LEGEND MAX™, Biolegend). Данные анализировали в GraphPad Prism 7.0 с помощью многофакторного дисперсионного анализа.

Результаты представлены на фиг. 8. Ряд биспецифических антител индуцировали схожие или более высокие уровни IFN- γ в сравнении с аналогом эталонного антитела к PD-1 под названием «ниволумаб», аналогом эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII или аналогом эталонной молекулы PD-L1-TGF- β TRAP.

ПРИМЕР 10. *In vivo* гуманизированная мышьяная модель NSG MDA-MB-231

Характеристики биспецифических антител изучали в условиях *in vivo* на гуманизированной мышьяной модели NSG MDA-MB-231 для определения их эффективности в уменьшении объема опухоли. Данную мышьяную модель проверяли с помощью 10 мг/кг отрицательного контроля в форме бивалентного моноспецифического антитела IgG1, содержащего тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 86, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 87, аналога эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII (10 мг/кг), эталонного антитела к PD-1 под названием «пембролизумаб» (10 мг/кг), комбинации аналога эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII (10 мг/кг) с эталонным антителом к PD-1 под названием «пембролизумаб» (10 мг/кг) и аналога эталонной молекулы PD-L1-TGF- β TRAP (10 мг/кг). Результаты представлены на фиг. 9A.

Гуманизированным CD34 NSG мышам подкожно инокулировали в общей сложности 3×10^6 клеток опухоли MDA-MB-231, суспендированных в 100 мкл бессывороточной культуральной среды и матригелевой матрицы (Corning) в равных объемах. После формирования опухолей ($80\text{--}100 \text{ мм}^3$) мышей рандомизировали на следующие группы обработки:

- 1) отрицательный контроль в форме бивалентного моноспецифического антитела IgG1, содержащего тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 86, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 87 (10 мг/кг);
- 2) аналог эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII (10 мг/кг);
- 3) эталонное антитело к PD-1 под названием «пембролизумаб» (10 мг/кг);
- 4) аналог эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII (10 мг/кг) + эталонное антитело к PD-1 под названием «пембролизумаб» (10 мг/кг);
- 5) биспецифическое антитело, содержащее TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 43, и PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 9 (1 мг/кг);
- 6) биспецифическое антитело, содержащее TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 43, и PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 9 (10 мг/кг);

7) биспецифическое антитело, содержащее TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 43, и PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 19 (1 мг/кг);

8) биспецифическое антитело, содержащее TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 43, и PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 19 (10 мг/кг);

9) биспецифическое антитело, содержащее TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 23, и PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14 (1 мг/кг);

10) биспецифическое антитело, содержащее TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 23, и PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14 (10 мг/кг);

11) биспецифическое антитело, содержащее TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 23, и PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи,

характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 19 (1 мг/кг);

12) биспецифическое антитело, содержащее TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 23, и PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 19 (10 мг/кг);

13) биспецифическое антитело, содержащее TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 39, и PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 9 (10 мг/кг);

14) биспецифическое антитело, содержащее TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 27, и PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 9 (10 мг/кг);

15) биспецифическое антитело, содержащее TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 23, и PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 18 (10 мг/кг);

16) биспецифическое антитело, содержащее TGF- β RII-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной

последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 47, и PD-1-связывающий домен с варибельным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 13 (10 мг/кг).

В каждой группе было 8-9 мышей. Животным вводили внутрибрюшинные дозы каждые пять дней в течение 27 или 30 дней. Опухоли измеряли с помощью штангенциркуля, а объем опухоли рассчитывали путем приведения их к эллипсоиду по формуле: l (длина) $\times w^2$ (ширина) $\times \frac{1}{2}$. Значения массы тела также отслеживали на протяжении всего исследования. После окончания исследования собирали опухоли (через 24 часа после введения последней дозы) для определения иммунного профиля опухоли и степени занятости рецепторов.

Результаты представлены на фиг. 9B-E. Все биспецифические антитела индуцировали превосходящий противоопухолевый ответ в сравнении с комбинацией эталонного антитела к PD-1 под названием «пембролизумаб» и аналога эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII. Биспецифические антитела даже индуцировали превосходящий противоопухолевый ответ при дозах как 1 мг/кг, так и 10 мг/кг, тогда как комбинация эталонных антител включала дозу 10 мг/кг каждого эталонного антитела.

Наряду с эффективностью, при обработке биспецифическими антителами наблюдали охват рецепторов как PD-1, так и TGF- β RII, схожий с комбинированной обработкой аналогом эталонного антитела TGF1 к TGF- β RII и эталонным антителом к PD-1 под названием «пембролизумаб» на Т-клетках, которые анализировали через 24 часа после последней дозы (фиг. 9F).

ПРИМЕР 11. Тестирование различных доз на *in vivo* гуманизированной мышинной модели NSG MDA-MB-231

Характеристики биспецифического антитела, содержащего TGF- β RII-связывающий домен с варибельным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена

под SEQ ID NO: 23, и PD-1-связывающий домен с переменным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 18, изучали при двух различных уровнях дозы: 1 мг/кг и 10 мг/кг, в условиях *in vivo* на гуманизированной мышинной модели NSG MDA-MB-231 так, как описано в примере 10. Отрицательный контроль в форме бивалентного моноспецифического антитела IgG1, содержащего тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 86, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 87, был включен в дозе 10 мг/кг.

Результаты представлены на фиг. 11. Биспецифическое антитело индуцировало значительный противоопухолевый ответ при обоих уровнях дозы.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO: 1 – Варибельный участок тяжелой цепи

EVQLVQSGAEVKKPGSSMKVSKASGGTFSSYVISWVRQAPGQGLEWMGMII
PVFDTSSYEKKFQGRITIIADKSTSTVYLELSSLRSEDAAVYYCARGTVEATLLF
DFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 2 – CDR1 тяжелой цепи

SYVIS

SEQ ID NO: 3 – CDR2 тяжелой цепи

MIPVFDTSSYEKKFQG

SEQ ID NO: 4 – CDR3 тяжелой цепи

GTVEATLLFDF

SEQ ID NO: 5 – Варибельный участок тяжелой цепи

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSNGLGFDLFSWIRQPPGRGLEWIGYIYYSS
GSWSLNPSFKGRVTMSVDTSKNQFSLNLRVTAADTAVYYCARGGYTGYGG
DWFDPPWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 6 – CDR1 тяжелой цепи

FDFWS

SEQ ID NO: 7 – CDR2 тяжелой цепи

YIYYSGSWSLNPSFKG

SEQ ID NO: 8 – CDR3 тяжелой цепи

GGYTGYGGDWFDPP

SEQ ID NO: 9 – Варибельный участок тяжелой цепи

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDGSIGYHFWSWIRQPPGRGLEWIGYIVYS
GSYNVNPSLKTRVTMSVDTSKNQFSLNLRVTAADTAVYYCARGGYTGYGG
DWFDPWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 10 – CDR1 тяжелой цепи

YHFWS

SEQ ID NO: 11 – CDR2 тяжелой цепи

YIVYSGSYNVNPSLKT

SEQ ID NO: 12 – CDR3 тяжелой цепи

GGYTGYGGDWFDP

SEQ ID NO: 13 – Вариабельный участок тяжелой цепи

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSEGSIGYHFWSWIRQPPGRGLEWIGYIVYS
GSYNVNPSLKTRVTMSVDTSKNQFSLNLRVTAADTAVYYCARGGYTGYGG
DWFDPWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 14 – Вариабельный участок тяжелой цепи

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTRFALHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPNTGTPTFAQGVTGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCARSLGYCD
SDICYPNWIFDNWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 15 – CDR1 тяжелой цепи

RFALH

SEQ ID NO: 16 – CDR2 тяжелой цепи

WIDPNTGTPTFAQGVTG

SEQ ID NO: 17 – CDR3 тяжелой цепи

SLGYCDSDICYPNWIFDN

SEQ ID NO: 18 – Вариабельный участок тяжелой цепи

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTRFALHWVRQAPGQGLEWMGWI
DPNTGTPTFAQGV TGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCARS
SLGYCDSDICYPNWIFDNWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 19 – Вариабельный участок тяжелой цепи

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTRFALS WVRQAPGQGLEWMGWI
DPNTGTPTYAQDFTGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCARS
SLGYCGSDICYPNGILDN WGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 20 – CDR1 тяжелой цепи

RFALS

SEQ ID NO: 21 – CDR2 тяжелой цепи

WIDPNTGTPTYAQDFTG

SEQ ID NO: 22 – CDR3 тяжелой цепи

SLGYCGSDICYPNGILDN

SEQ ID NO: 23 – Вариабельный участок тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQP GGSRLS CAASGFTFDIYAMTWVRQAPGKGLEWVS
VISGSGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARR
GQYR DIVGATDYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 24 – CDR1 тяжелой цепи

IYAMT

SEQ ID NO: 25 – CDR2 тяжелой цепи

VISGSGGTTYADSVKG

SEQ ID NO: 26 – CDR3 тяжелой цепи

RGQYRDIVGATDY

SEQ ID NO: 27 – Вариабельный участок тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDINAMTWVRQAPGKGLEWVSVIS
GSGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGQYR
DIVGATDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 28 – CDR1 тяжелой цепи

INAMT

SEQ ID NO: 29 – CDR2 тяжелой цепи

VISGSGGTTYADSVKG

SEQ ID NO: 30 – CDR3 тяжелой цепи

RGQYRDIVGATDY

SEQ ID NO: 31 – Вариабельный участок тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRI
KTTISGGATDFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRD
YWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 32 – CDR1 тяжелой цепи

NAWMS

SEQ ID NO: 33 – CDR2 тяжелой цепи

RIKTTISGGATDFAAPVKG

SEQ ID NO: 34 – CDR3 тяжелой цепи

DLRDY

SEQ ID NO: 35 – Вариабельный участок тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAASGFKFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRI
KTTISGGATQFAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTLDLRD
YWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 36 – CDR1 тяжелой цепи

NAWMS

SEQ ID NO: 37 – CDR2 тяжелой цепи

RIKTTISGGATQFAAPVKG

SEQ ID NO: 38 – CDR3 тяжелой цепи

DLRDY

SEQ ID NO: 39 – Вариабельный участок тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFRRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
ASGDRTHNTDSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGIAASG
KNYFDPWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 40 – CDR1 тяжелой цепи

RYAMS

SEQ ID NO: 41 – CDR2 тяжелой цепи

AISASGDRTHNTDSVKG

SEQ ID NO: 42 – CDR3 тяжелой цепи

GIAASGKNYFDP

SEQ ID NO: 43 – Вариабельный участок тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
ASGDRTKNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGTAAAG
KNYFDPWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 44 – CDR1 тяжелой цепи

RYAMS

SEQ ID NO: 45 – CDR2 тяжелой цепи

AISASGDRTKNTDSVKG

SEQ ID NO: 46 – CDR3 тяжелой цепи

GTAAAGKNYFDP

SEQ ID NO: 47 – Вариабельный участок тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
ASGDRTKYTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKGTAAAG
KNYFDPWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 48 – Вариабельный участок легкой цепи

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 49 – CDR1 легкой цепи согласно системе IMGT

QSISSY

SEQ ID NO: 50 – CDR2 легкой цепи согласно системе IMGT

AAS

SEQ ID NO: 51 – CDR3 легкой цепи согласно системе IMGT

QQSYSTPPT

SEQ ID NO: 52 – Вариабельный участок легкой цепи

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 53 – CDR1 легкой цепи согласно системе IMGT

QSISSY

SEQ ID NO: 54 – CDR2 легкой цепи согласно системе IMGT

AAS

SEQ ID NO: 55 – CDR3 легкой цепи согласно системе IMGT

QQSYSTPPIT

SEQ ID NO: 56 – Вариабельный участок легкой цепи

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAST
RATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQGTKVEI
K

SEQ ID NO: 57 – CDR1 легкой цепи согласно системе IMGT

QSVSSN

SEQ ID NO: 58 – CDR2 легкой цепи согласно системе IMGT

GAS

SEQ ID NO: 59 – CDR3 легкой цепи согласно системе IMGT

QQYNNWPWT

SEQ ID NO: 60 – Вариабельный участок легкой цепи

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS
RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 61 – CDR1 легкой цепи согласно системе IMGT

QSVSSSY

SEQ ID NO: 62 – CDR2 легкой цепи согласно системе IMGT

GAS

SEQ ID NO: 63 – CDR3 легкой цепи согласно системе IMGT

QQYGSSPWT

SEQ ID NO: 64 – Вариабельный участок легкой цепи

SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKS VYWYQQKSGQAPVLVIYYDSDR
PSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDHWVFGGGTKLT
VL

SEQ ID NO: 65 – CDR1 легкой цепи согласно системе IMGT

NIGRKS

SEQ ID NO: 66 – CDR2 легкой цепи согласно системе IMGT

YDS

SEQ ID NO: 67 – CDR3 легкой цепи согласно системе IMGT

QVWDGSSDHWV

SEQ ID NO: 68 – Шарнирный участок

EPKSCDKTHTCPPCP

SEQ ID NO: 69 – Участок CH1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

SEQ ID NO: 70 – Участок CH2

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAK

SEQ ID NO: 71 – Участок CH2-DM

APELGRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAK

SEQ ID NO: 72 – Участок CH3

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
G

SEQ ID NO: 73 – Участок CH3-DE

GQPREPQVYTDPPSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
G

SEQ ID NO: 74 – Участок CH3-KK

GQPREPQVYTKPPSREEMTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
G

SEQ ID NO: 75 – Участок CL

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

SEQ ID NO: 76 – Тяжелая цепь аналога эталонного антитела TGF1 к TGF-βRII

QLQVQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISNSYFSWGWIRQPPGKGLEWIGSFY
YGEKTYYNPSLKSRAISIDTSKSKQFSLKLSSVTAADTAVYYCPRGPTMIRGVI
DSWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 77 – Легкая цепь аналога эталонного антитела TGF1 к TGF-βRII

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 78 – Тяжелая цепь эталонного антитела к PD-1 под названием
«пембролизумаб»

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG
GINPSNGGTFNFEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY
RFDMGFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDH
KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ
EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 79 – Легкая цепь эталонного антитела к PD-1 под названием
«пембролизумаб»

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYL
ASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKV
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC

SEQ ID NO: 80 – Тяжелая цепь аналога эталонной молекулы PD-L1-TGF- β TRAP

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYP
SGGITFYADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTT
VDYWGGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGIP
PHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICE
KPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPG
ETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

SEQ ID NO: 81 – Легкая цепь аналога эталонной молекулы PD-L1-TGF- β TRAP

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDV
SNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYCYCSSYTSSSTRVFGTGTKV
TVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK
AGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
TECS

SEQ ID NO: 82 – Изоформа A TGF- β RII человека

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCK
FCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPK
LPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDL

LLVIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLMFSEH
CAILEDDRSDISSTCANNINHNTPELLDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQ
FETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFSDINLKHENILQFLTAERKTELGKQYWLI
TAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARGIAHLHSDHTPCGRPMPPIVH
RDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSQGQVGTARYMAPEVL
ESRMNLENVESFKQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFPGSKVREH
PCVESMKDNVLRDRGRPEIPSWLNLHQGIQMVCELTTECWDHDPEARLTAQC
VAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNNTTK

SEQ ID NO: 83 – Внеклеточный домен изоформы А TGF- β RII человека

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITS
ICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKK
PGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLL VIFQ

SEQ ID NO: 84 – Изоформа В TGF- β RII человека

MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRRTAHPL
RHINNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQE
VCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKK PGETFF
MCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDLLL VIFQVTGISLLPPLGVAISVIIIIFYCYRV
NRQQKLSSTWETGKTRKLMFSEHCAILEDDRSDISSTCANNINHNTPELL
DTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFSDINL
KHENILQFLTAERKTELGKQYWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLG
SLARGIAHLHSDHTPCGRPMPPIVHRDLKSSNILVKNDLTCCLCDFGLSLRLD
PTLSVDDLANSQGQVGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVYSMALVLWE
MTSRCNAVGEVKDYEPFPGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSWLNLHQ
GIQMVCELTTECWDHDPEARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDG
SLNNTTK

SEQ ID NO: 85 – Внеклеточный домен изоформы В TGF- β RII человека

TIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRRTAHPLRHINNDMIVTDNNGAVKFPQL
CKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHD

PKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNP
DLLLVIFQ

SEQ ID NO: 86 – Тяжелая цепь отрицательного контроля в форме антитела IgG1
к RSV

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
SYDGSTKYSADSLKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRADDTAVYYCAKEGWSF
DSSGYRSWFDSWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
NHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 87 – Легкая цепь

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 88 – Варибельный участок тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
ASGDRTKNTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGTAAA
GKNYFDPWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 89 – Варибельный участок тяжелой цепи

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSRYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
ASGDRTKYTDSVKGRFSISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGTAAA
GKNYFDPWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 90 – CDR1 тяжелой цепи

RYAMS

SEQ ID NO: 91 – CDR2 тяжелой цепи

AISASGDRTKYTDSVKG

SEQ ID NO: 92 – CDR3 тяжелой цепи

GTAAAGKNYFDP

SEQ ID NO: 93 – V-участок VK1-39

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP

SEQ ID NO: 94 – VK1-39/JK1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 95 – VK1-39/JK5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 96: – Тяжелая цепь аналога эталонного антитела под названием
«ниволумаб»

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
WYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDY
WGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD
KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLVKGF

YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 97 – Легкая цепь аналога эталонного антитела под названием
«ниволумаб»

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 98 – V-участок VK3-15

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAST
RATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWP

SEQ ID NO: 99 – VK3-15/JK1

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAST
RATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQGKVEI
K

SEQ ID NO: 100 – V-участок VK3-20

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS
RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPP

SEQ ID NO: 101 – VK3-20/JK1

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS
RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPWTFGQGKVEIK

SEQ ID NO: 102 – V-участок VL3-21

SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSIVYQKSGQAPVLVIYYDSDR
PSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDH

SEQ ID NO: 103 – VL3-21/JL3

SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKS VYWYQQKSGQAPVLVIYYDSDR
PSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDHWVFGGGTKLT
VL

SEQ ID NO: 104 – Внеклеточный домен TGF- β RII

IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSI
CEKPQEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPKCIMKEKKKP
GETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

Опубликованная формула изобретения

1. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где PD-1-связывающий домен блокирует PD-1-опосредованную передачу сигналов, а TGF- β RII-связывающий домен блокирует TGF- β RII-опосредованную передачу сигналов.
2. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 1, где PD-1-связывающий домен блокирует PD-1-опосредованную передачу сигналов, а TGF- β RII-связывающий домен блокирует TGF- β RII-опосредованную передачу сигналов в активированных Т-клетках, в частности, активированных опухолеспецифических Т-клетках.
3. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 1 или п. 2, где мультиспецифическая связывающая молекула содержит один Fab-домен, который связывается с PD-1, один Fab-домен, который связывается с TGF- β RII, и Fc-участок.
4. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1-3, где мультиспецифическая связывающая молекула характеризуется более высокой эффективностью в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих как PD-1, так и TGF- β RII, нежели в клетках, экспрессирующих TGF- β RII и не экспрессирующих, практически не экспрессирующих или характеризующихся низкими уровнями экспрессии PD-1.
5. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 4, где клетки, экспрессирующие как PD-1, так и TGF- β RII, представляют собой клетки Jurkat-PD-1⁺, а клетки, экспрессирующие TGF- β RII и не экспрессирующие, практически не экспрессирующие или характеризующиеся низкими уровнями экспрессии PD-1, представляют собой клетки Jurkat-PD-1^{null}.
6. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 4, где клетки, экспрессирующие как PD-1, так и TGF- β RII, представляют собой

активированные CD4⁺ и/или CD8⁺ клетки, а клетки, экспрессирующие TGF-βRII и не экспрессирующие PD-1, представляют собой неактивированные CD4⁺ и/или CD8⁺ клетки.

7. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 4, где клетки, экспрессирующие как PD-1, так и TGF-βRII, представляют собой клетки HEK-Blue-TGF-β-PD-1⁺, а клетки, экспрессирующие TGF-βRII и не экспрессирующие PD-1, представляют собой клетки HEK-Blue-TGF-β.

8. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 4-6, где эффективность в блокировании TGF-βRII-опосредованной передачи сигналов измерена с помощью анализа фосфо-SMAD2/3.

9. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 4 или п. 7, где эффективность в блокировании TGF-βRII-опосредованной передачи сигналов измерена с помощью анализа изогенных PD-1-TGF-β-клеток по гену-репортеру.

10. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 4-9, где эффективность в блокировании TGF-βRII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих как PD-1, так и TGF-βRII, по меньшей мере приблизительно в 200 раз, предпочтительно приблизительно в 200-30000 раз выше, чем в клетках, экспрессирующих TGF-βRII и не экспрессирующих, практически не экспрессирующих или характеризующихся низкими уровнями экспрессии PD-1.

11. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 4-10, где эффективность мультиспецифической связывающей молекулы в блокировании TGF-βRII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих TGF-βRII и не экспрессирующих PD-1, ниже, чем эффективность эталонного антитела к TGF-βRII, а эффективность мультиспецифической связывающей молекулы в блокировании TGF-βRII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих как TGF-βRII, так и PD-1, выше, чем эффективность

эталонного антитела к TGF- β RII, где эталонное антитело к TGF- β RII представляет собой бивалентное моноспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 77.

12. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 11, где эффективность мультиспецифической связывающей молекулы в блокировании TGF- β RII-опосредованной передачи сигналов в клетках, экспрессирующих как TGF- β RII, так и PD-1, по меньшей мере приблизительно в 100 раз, предпочтительно приблизительно в 100-20000 раз выше, чем эффективность эталонного антитела к TGF- β RII.

13. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1-12, где мультиспецифическая связывающая молекула характеризуется более высокой активностью в уменьшении объема опухоли, чем комбинация эталонных антител, где комбинация эталонных антител представляет собой два бивалентных моноспецифических антитела, нацеленных на PD-1 и TGF- β RII, где бивалентное моноспецифическое антитело, нацеленное на PD-1, содержит тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 78, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 79, а бивалентное моноспецифическое антитело, нацеленное на TGF- β RII, содержит тяжелую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 76, и легкую цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 77.

14. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 13, где активность в уменьшении объема опухоли определена путем измерения уменьшения объема опухоли в исследовании *in vivo* на мышах, в частности, в исследовании *in vivo* на мышах с применением мышей huCD34 NSG с ксенотрансплантатом MDA-MB-231.

15. Мультиспецифическое антитело по п. 13 или п. 14, где более высокая активность в уменьшении объема опухоли заключается в уменьшении объема опухоли по меньшей мере приблизительно в 1,5 раза, предпочтительно приблизительно в 1,5-100 раз, по сравнению с уменьшением объема опухоли при применении комбинации эталонных антител.

16. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где PD-1-связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий следующее:

а) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно;

б) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, соответственно;

в) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно;

г) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно; или

е) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно;

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации.

17. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 16, где PD-1-связывающий домен содержит вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 14, 18, 19, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

18. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 16 или п. 17, где PD-1-связывающий домен содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51, соответственно, или его вариант.

19. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 16-18, где PD-1-связывающий домен содержит вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

20. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 16-17, где TGF- β RII-связывающий домен содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий следующее:

а) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно;

b) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, соответственно;

c) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, соответственно;

d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38, соответственно;

e) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, соответственно;

f) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46, соответственно; или

g) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 92, соответственно,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации.

21. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 16-20, где TGF- β RII-связывающий домен содержит вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 88, 89, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

22. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 16-21, где TGF- β RII-связывающий домен содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51, соответственно, или его вариант.

23. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 16-22, где TGF- β RII-связывающий домен содержит вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

24. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, где TGF- β RII-связывающий домен содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий следующее:

а) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно;

b) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, соответственно;

c) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, соответственно;

d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38, соответственно;

e) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, соответственно;

f) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46, соответственно; или

g) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 92, соответственно,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации.

25. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 24, где TGF- β RII-связывающий домен содержит вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 88, 89, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

26. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 24 или п. 25, где TGF- β RII-связывающий домен содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51, соответственно, или его вариант.

27. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 24-26, где TGF- β RII-связывающий домен содержит вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

28. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 24-27, где PD-1-связывающий домен содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий следующее:

а) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно;

б) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью,

которая изложена под SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, соответственно;

с) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно;

d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно; или

e) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно;

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной модификации.

29. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 24-28, где PD-1-связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 14, 18, 19, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

30. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 24-29, где PD-1-связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50 и SEQ ID NO: 51, соответственно, или его вариант.

31. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 24-30, где PD-1-связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

32. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая PD-1-связывающий домен и TGF- β RII-связывающий домен, которая конкурирует с мультиспецифической связывающей молекулой по любому из пп. 1-31 за связывание с PD-1 и/или TGF- β RII.

33. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество мультиспецифической связывающей молекулы по любому из пп. 1-32 и фармацевтически приемлемый носитель.

34. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1-32 или фармацевтическая композиция по п. 33 для применения в терапии.

35. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1-32 или фармацевтическая композиция по п. 33 для применения при лечении заболевания, связанного с подавленной иммунной системой, в частности рака.

36. Способ лечения заболевания, предусматривающий введение эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы по любому из пп. 1-32 или фармацевтической композиции по п. 33 нуждающемуся в этом субъекту.

37. Способ лечения заболевания, связанного с подавленной иммунной системой, в частности рака, предусматривающий введение эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы по любому из пп. 1-32 или фармацевтической композиции по п. 33 нуждающемуся в этом субъекту.

38. Клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи PD-1-связывающего домена

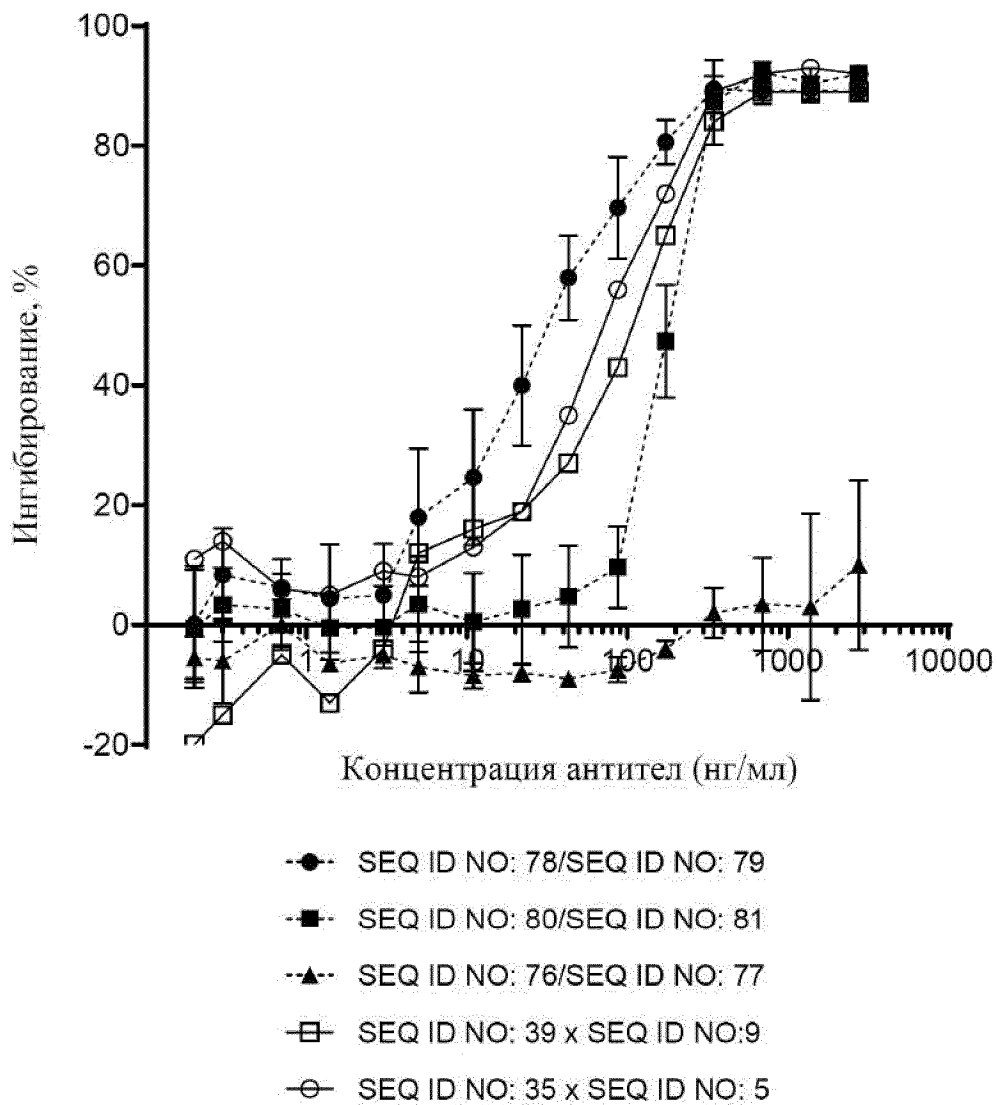
по п. 16 или п. 17, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи TGF- β RII-связывающего домена по п. 20 или п. 21.

39. Клетка по п. 38, где клетка дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую участок CH1 и предпочтительно шарнирный участок, участок CH2 и CH3.

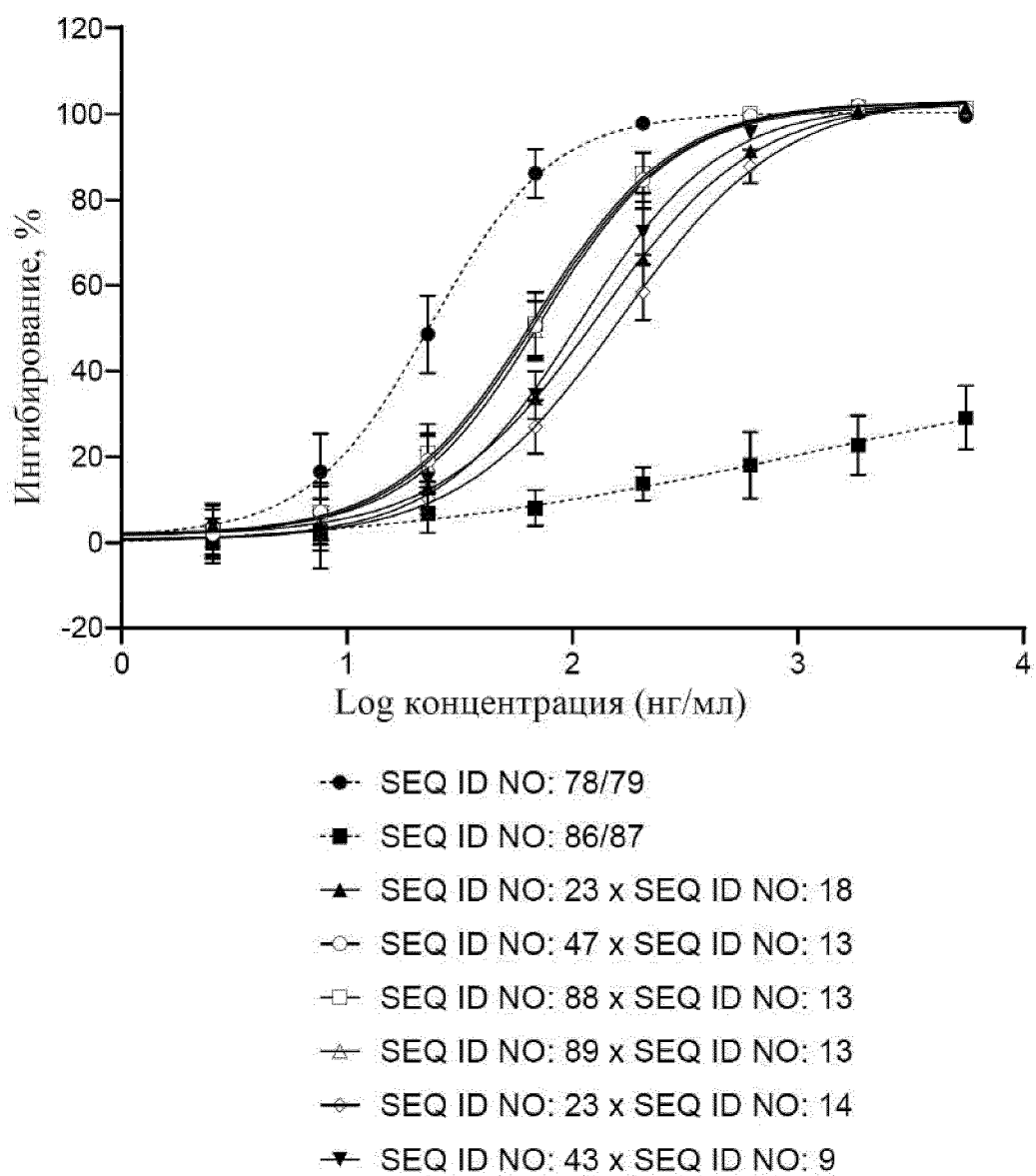
40. Клетка по п. 38 или п. 39, где клетка дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок легкой цепи, в частности переменный участок легкой цепи по п. 18 или п. 19, и предпочтительно участок CL.

41. Клетка, продуцирующая мультиспецифическую связывающую молекулу по любому из пп. 1-32.

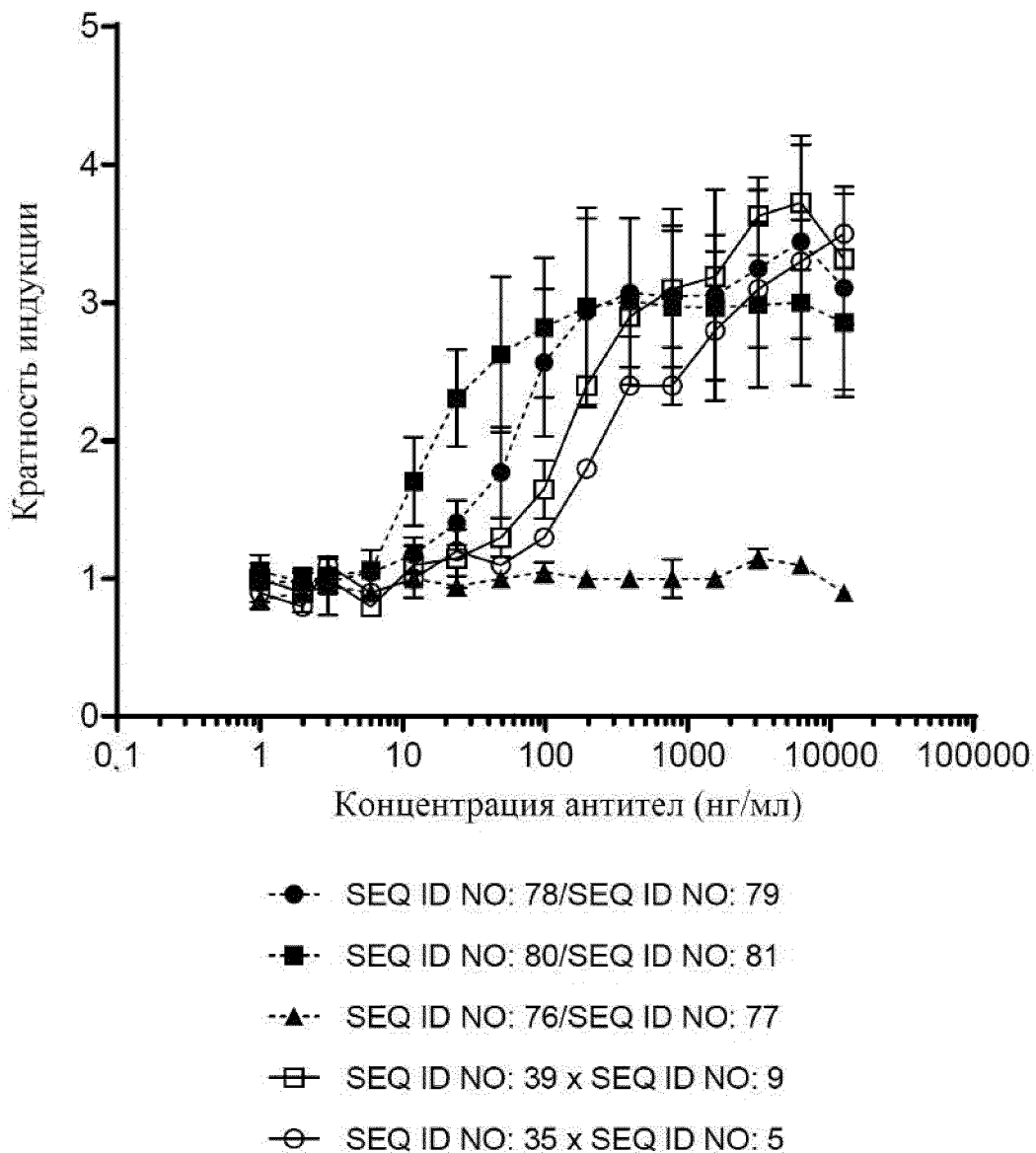
Фиг. 1А



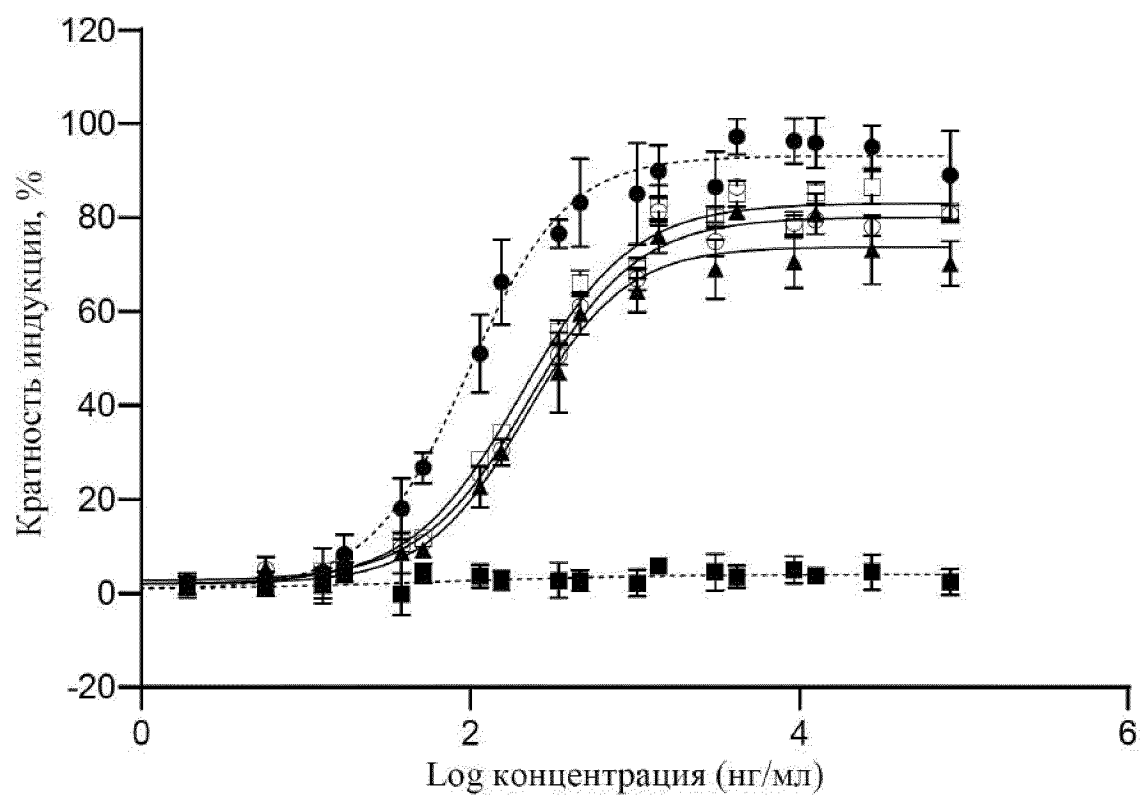
Фиг. 1В



ФИГ. 2А

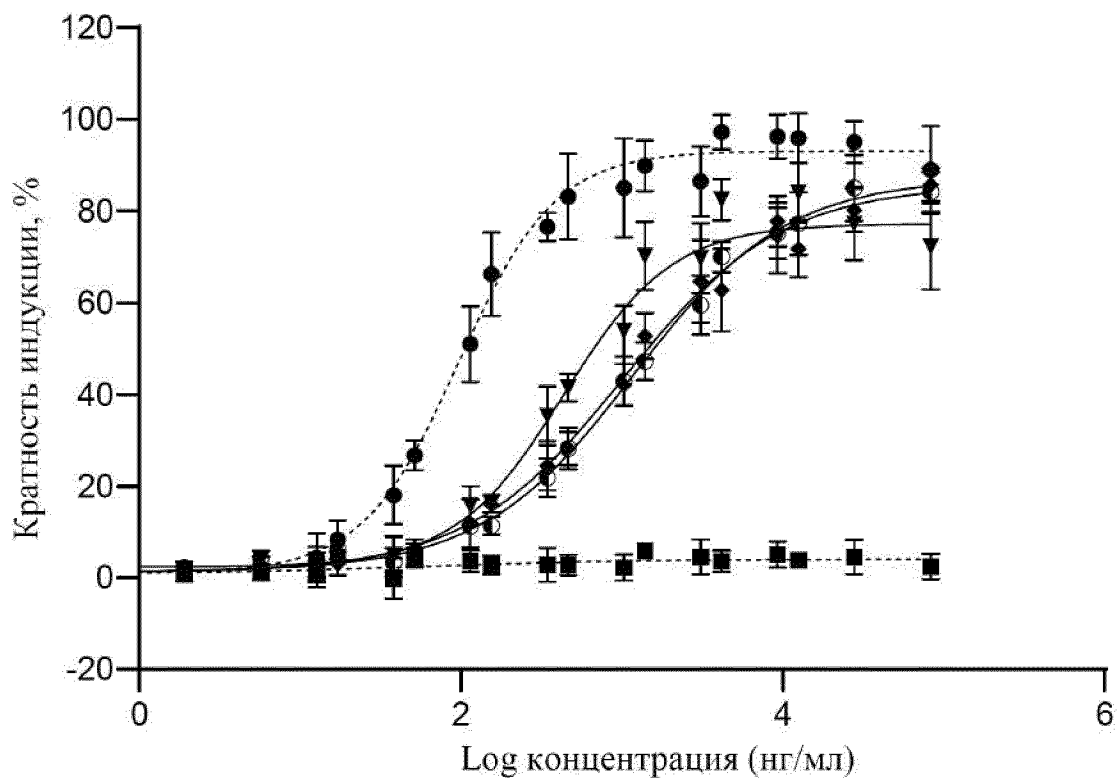


Фиг. 2В



- SEQ ID NO: 78/79
- SEQ ID NO: 86/87
- SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13
- SEQ ID NO: 88 x SEQ ID NO: 13
- ▲ SEQ ID NO: 89 x SEQ ID NO: 13

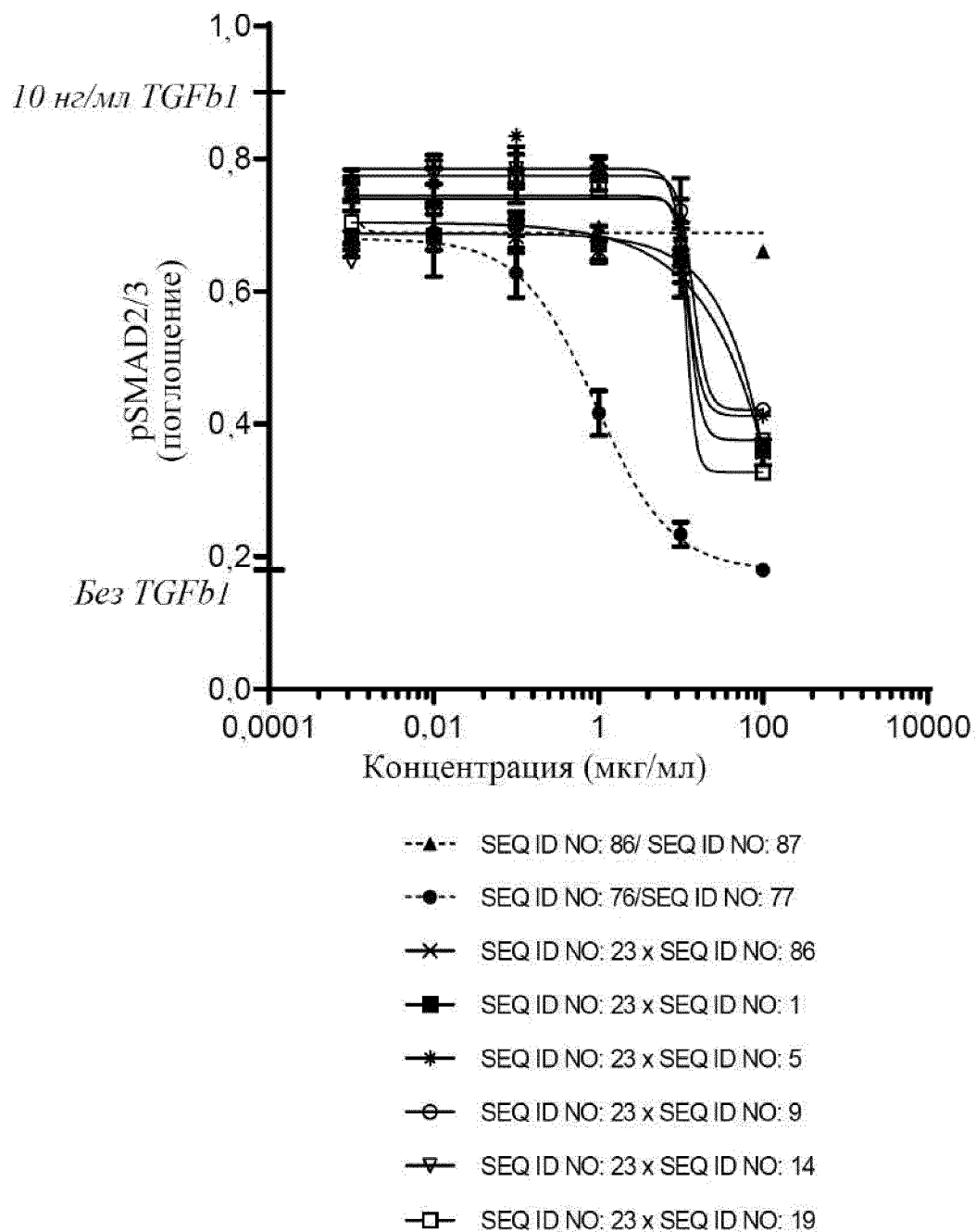
Фиг. 2С



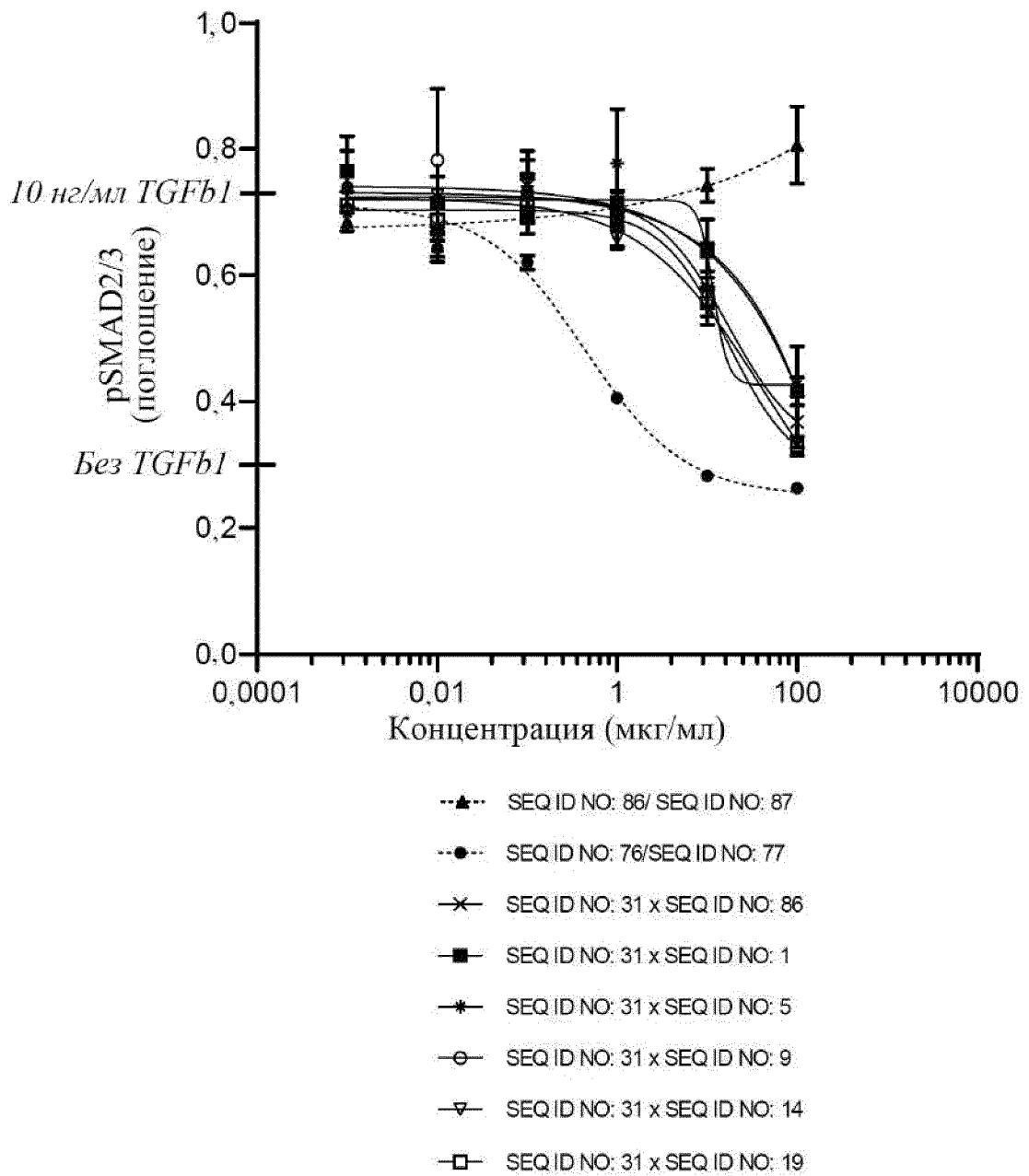
- SEQ ID NO: 78/79
- SEQ ID NO: 86/87
- ▼ SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
- ◆ SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
- ◐ SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14

Фиг. 3

A

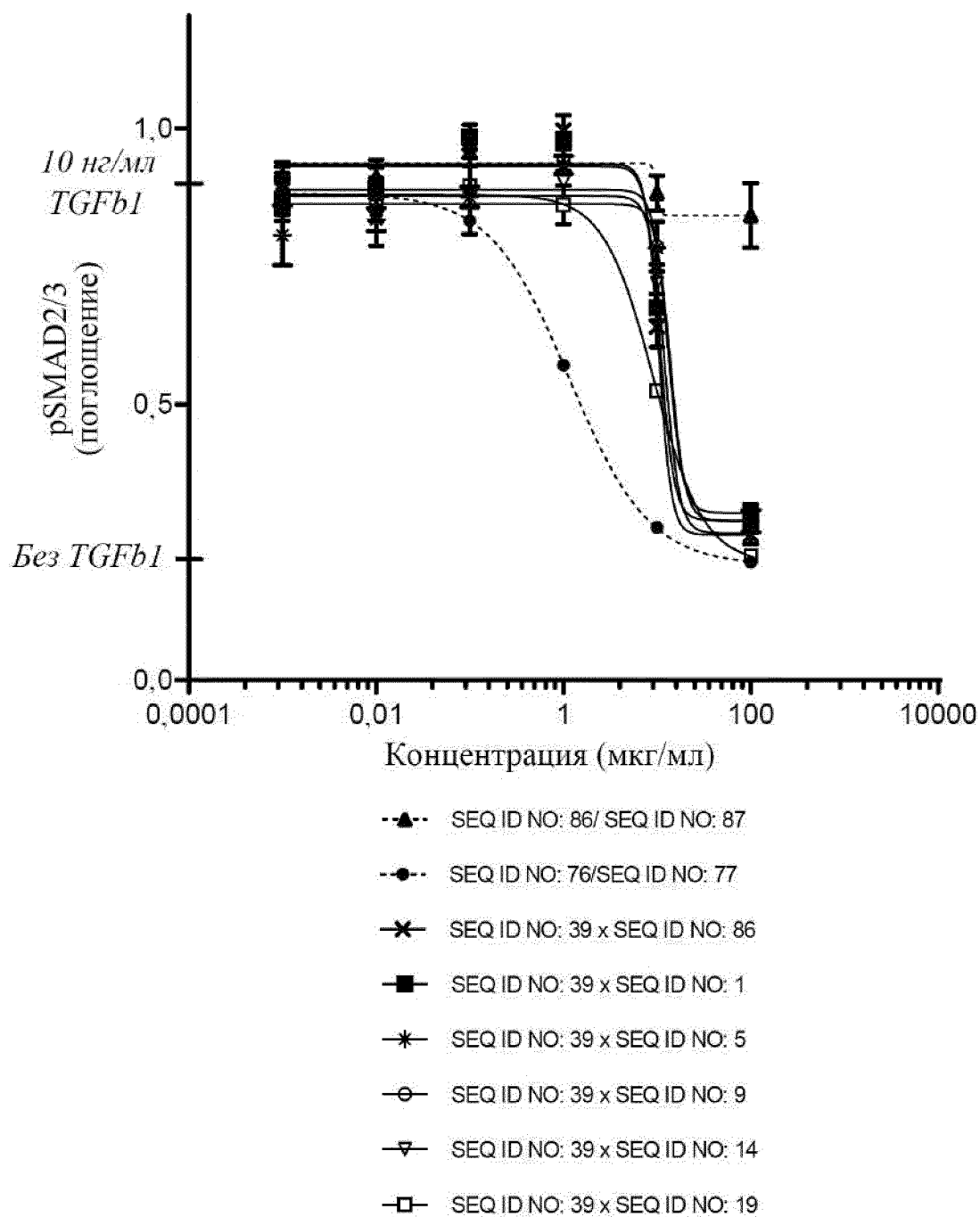


B



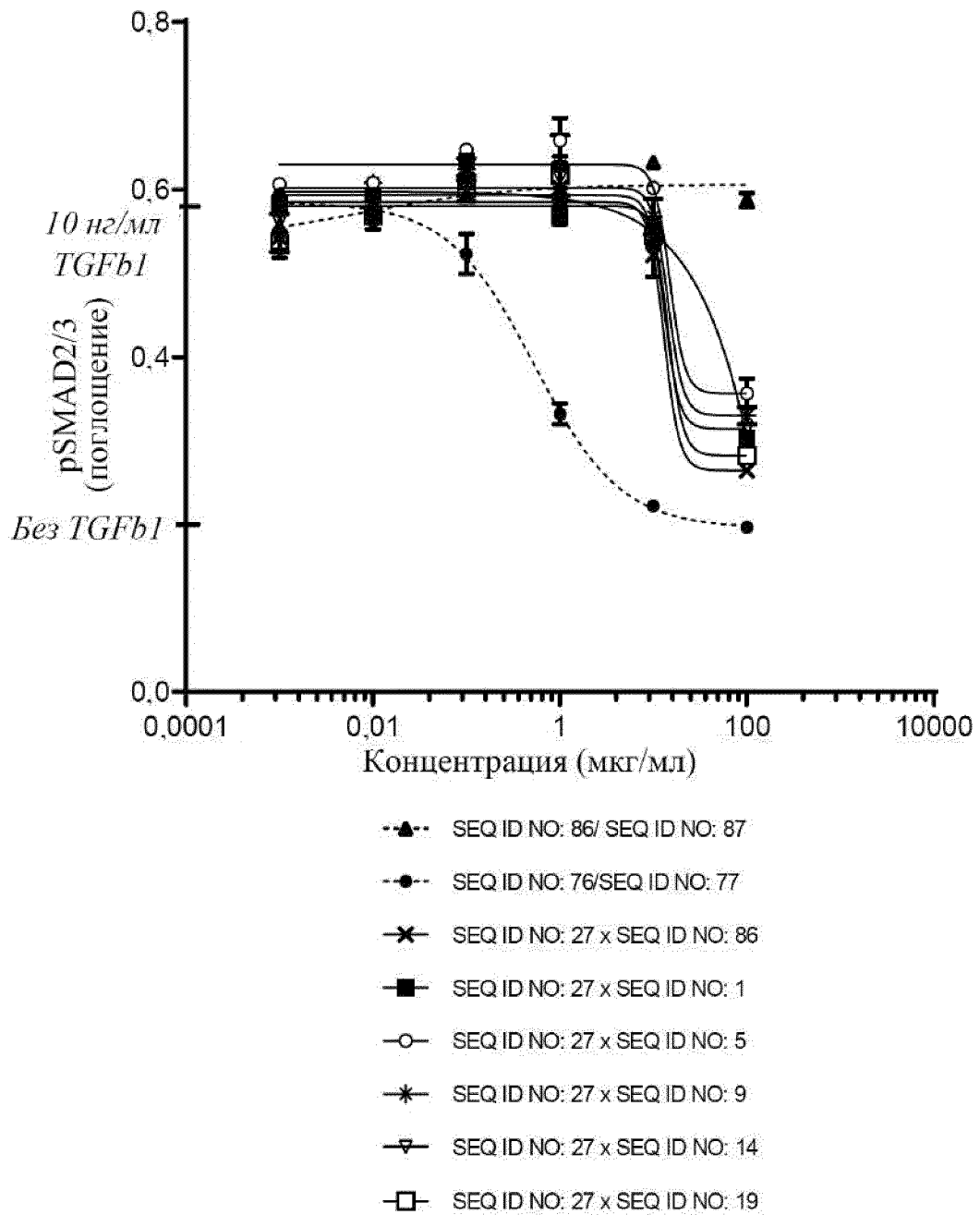
Фиг. 3 (продолжение)

C



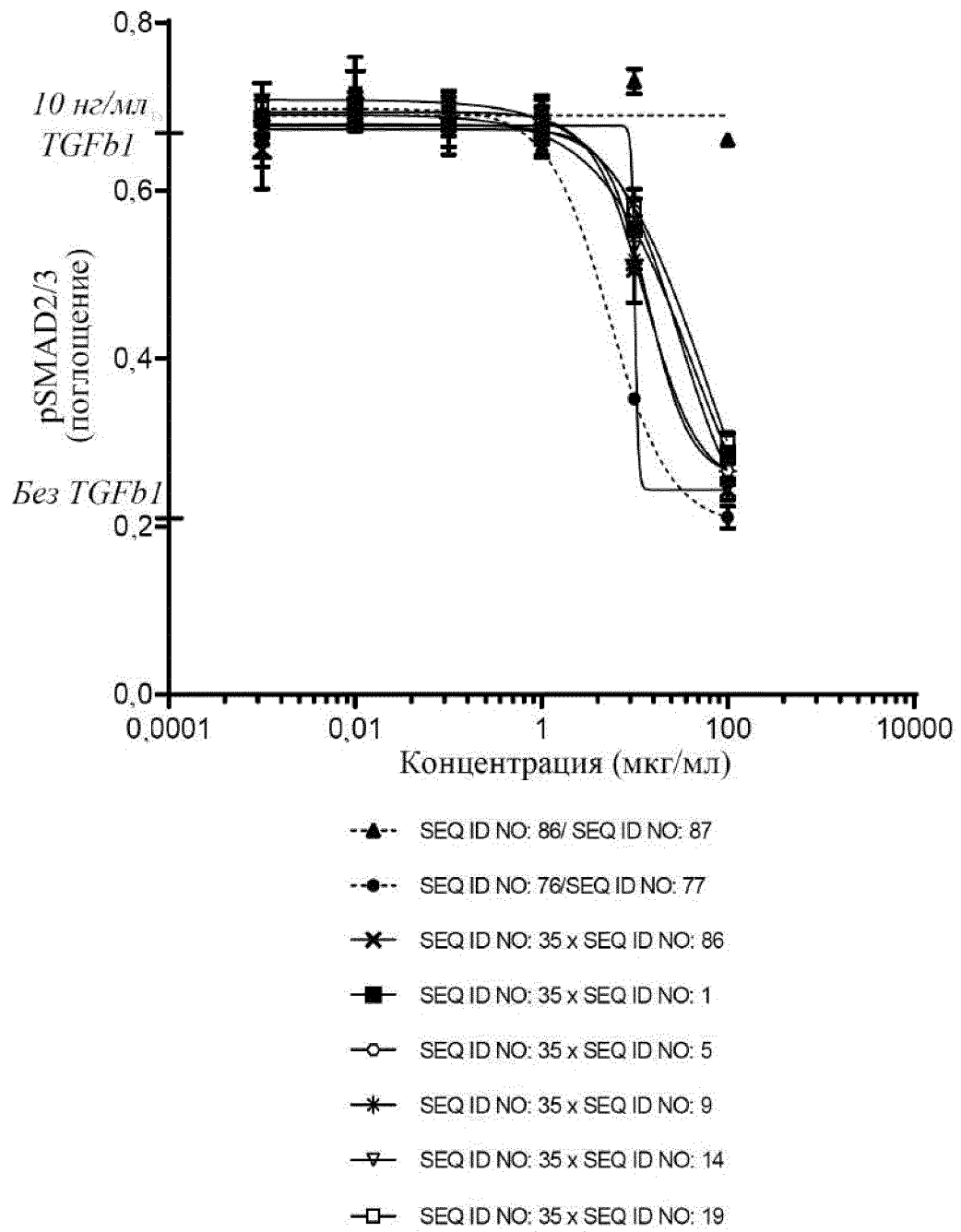
Фиг. 3 (продолжение)

D



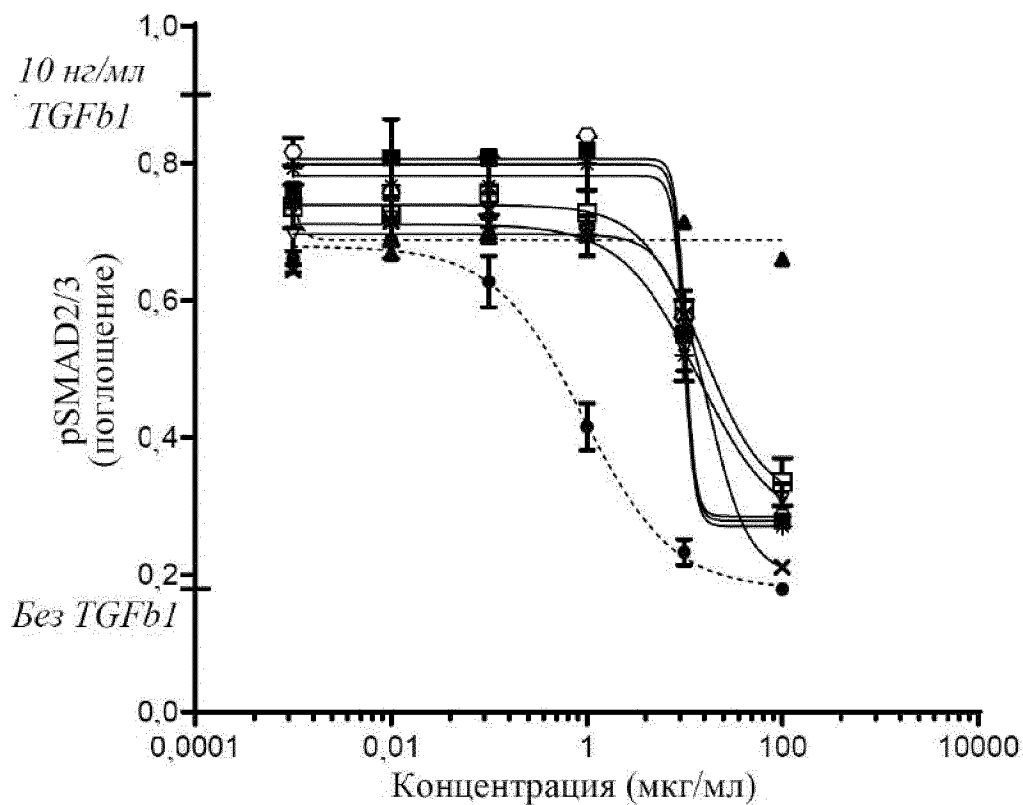
Фиг. 3 (продолжение)

E



Фиг. 3 (продолжение)

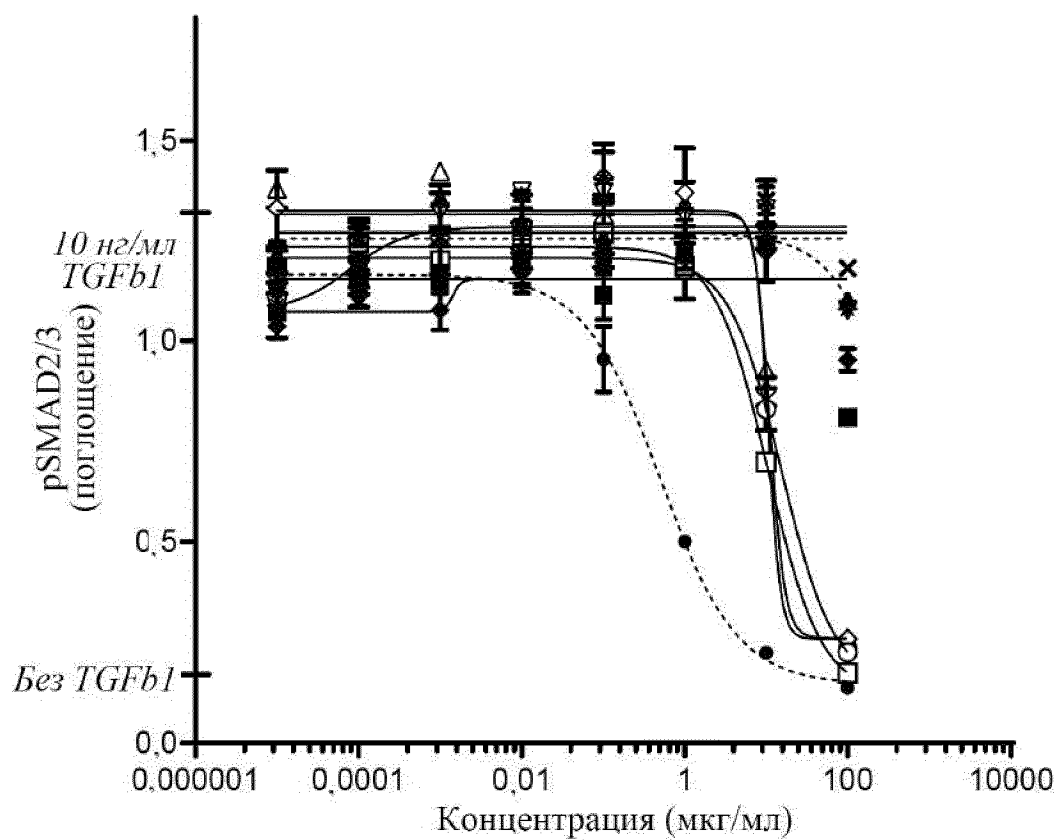
E



- ▲-- SEQ ID NO: 86/ SEQ ID NO: 87
- SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
- ×- SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 86
- SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 1
- SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 5
- *- SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
- ▽- SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 14
- SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19

Фиг. 3 (продолжение)

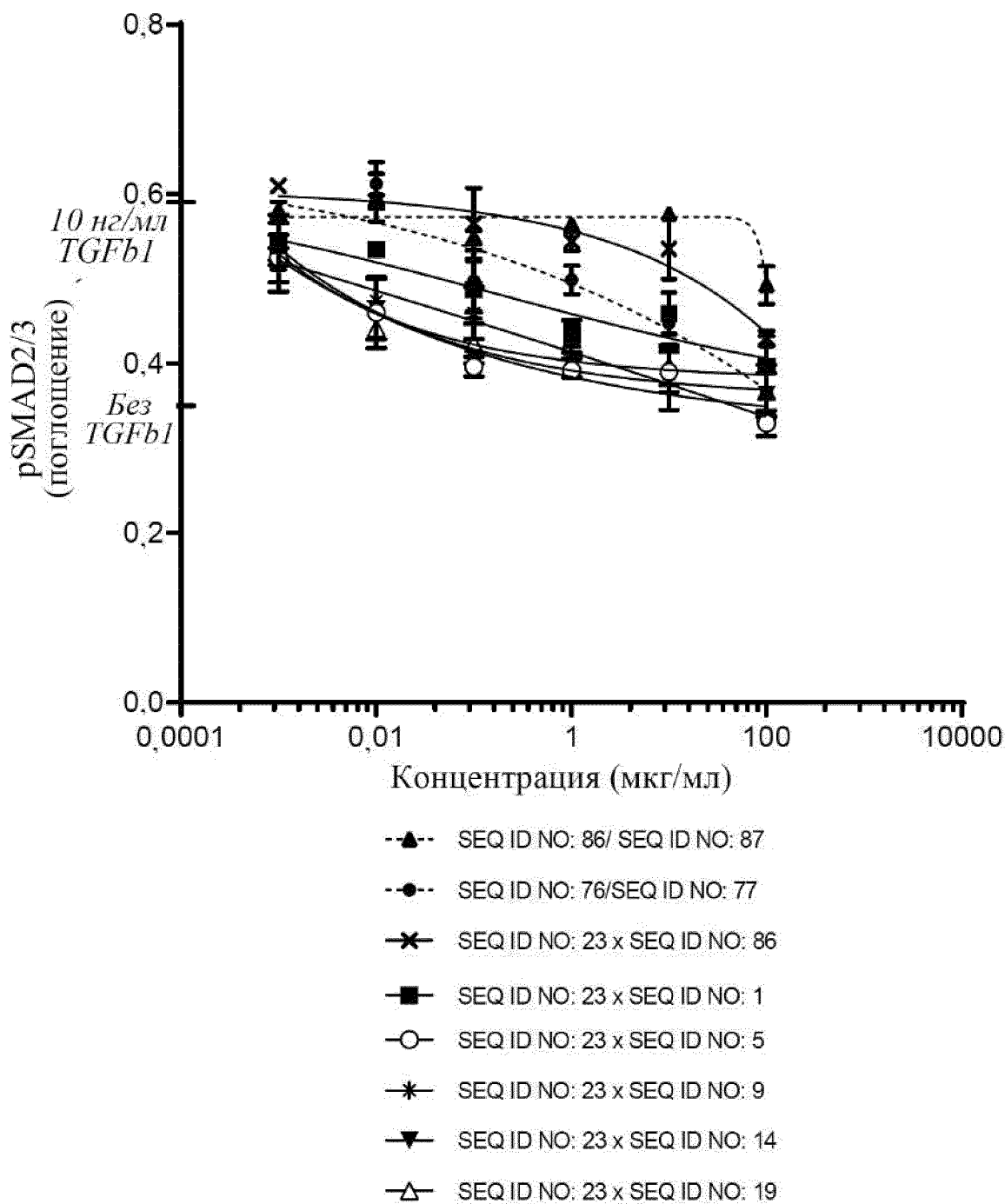
G



- ▲-- SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
- SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
- ×-- SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
- SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 9
- ◆-- SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
- SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
- *-- SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 13
- ▽-- SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 18
- SEQ ID NO: 47 x SEQ ID NO: 13
- ◇-- SEQ ID NO: 88 x SEQ ID NO: 13
- △-- SEQ ID NO: 89 x SEQ ID NO: 13

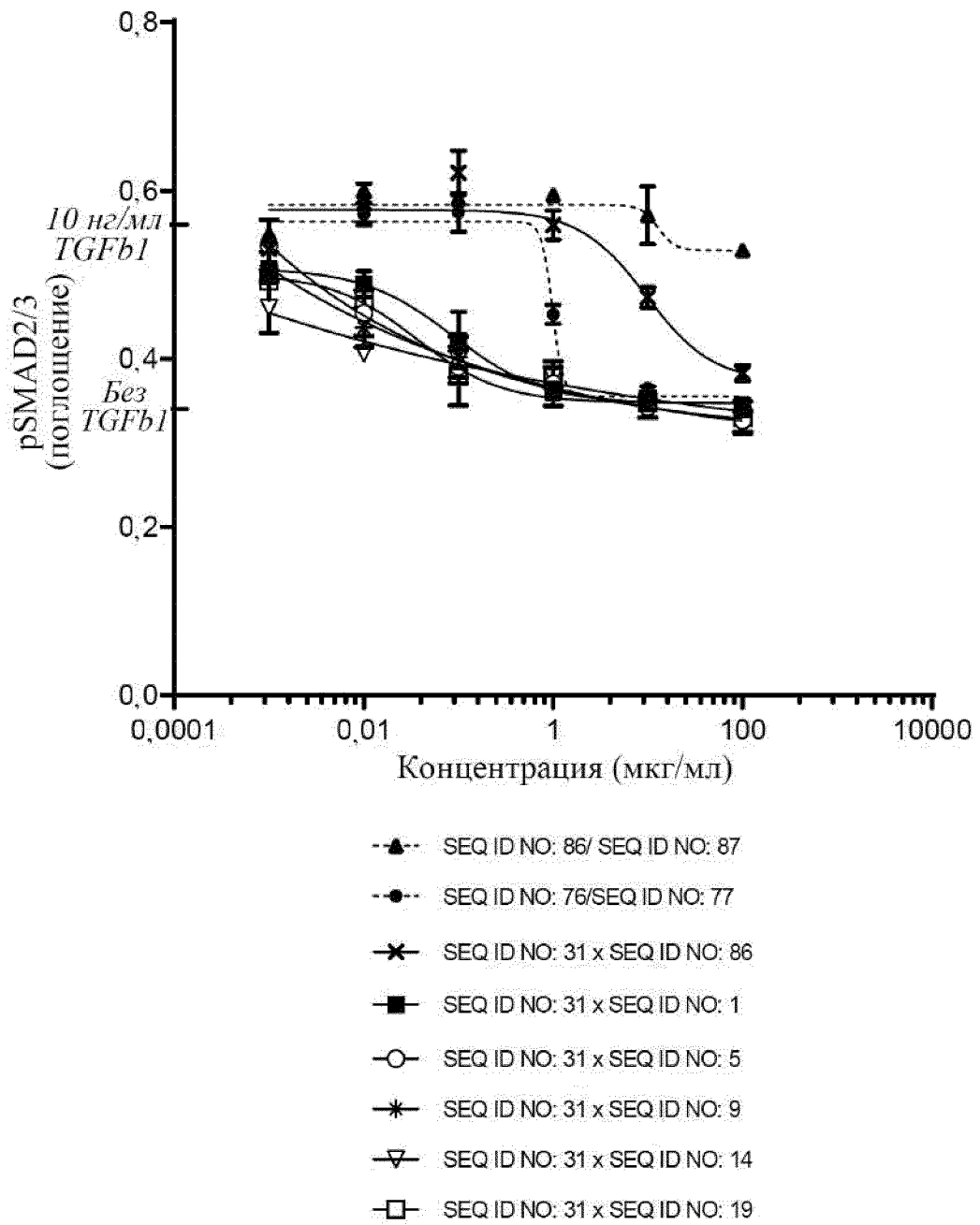
Фиг. 3 (продолжение)

H



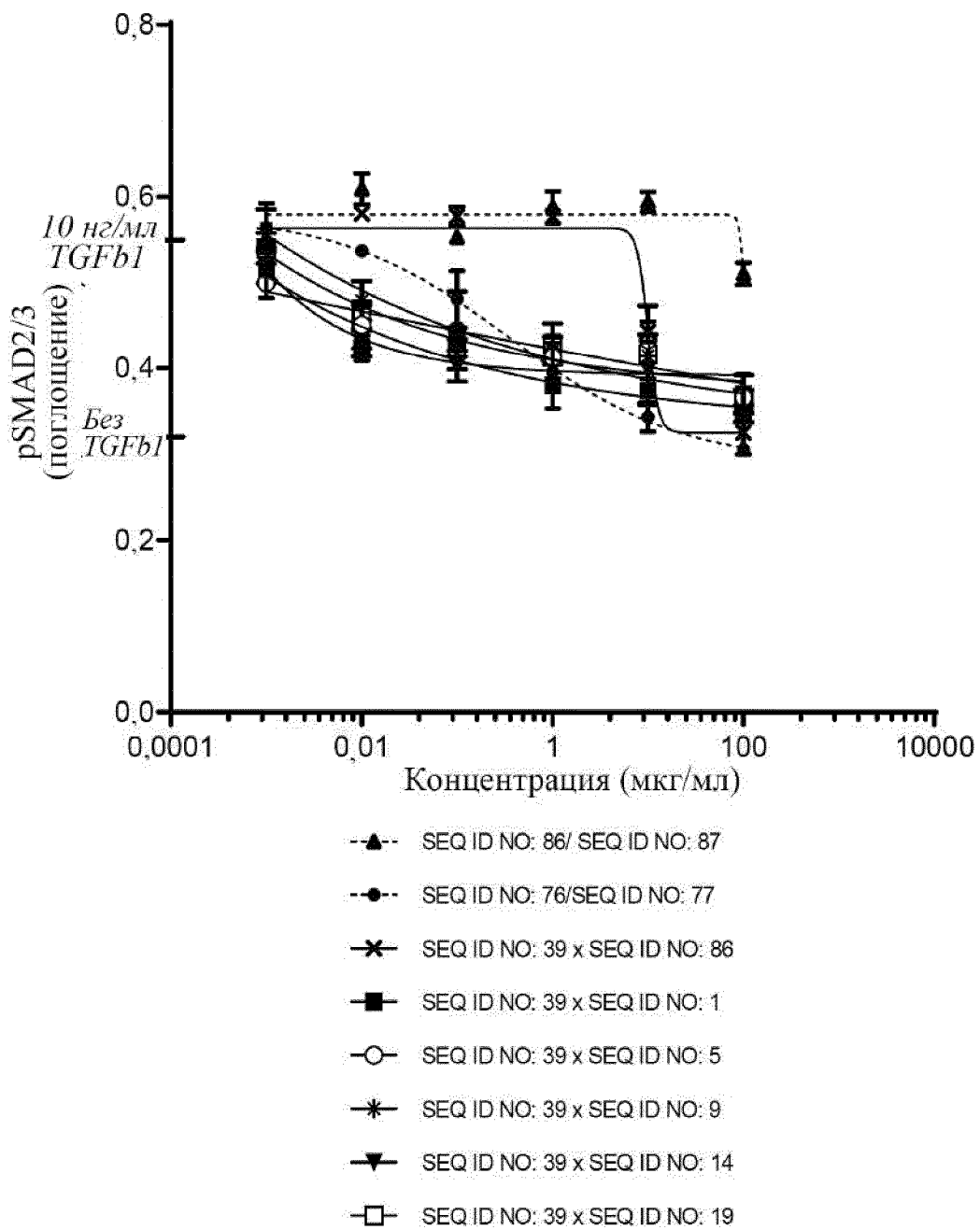
Фиг. 3 (продолжение)

I



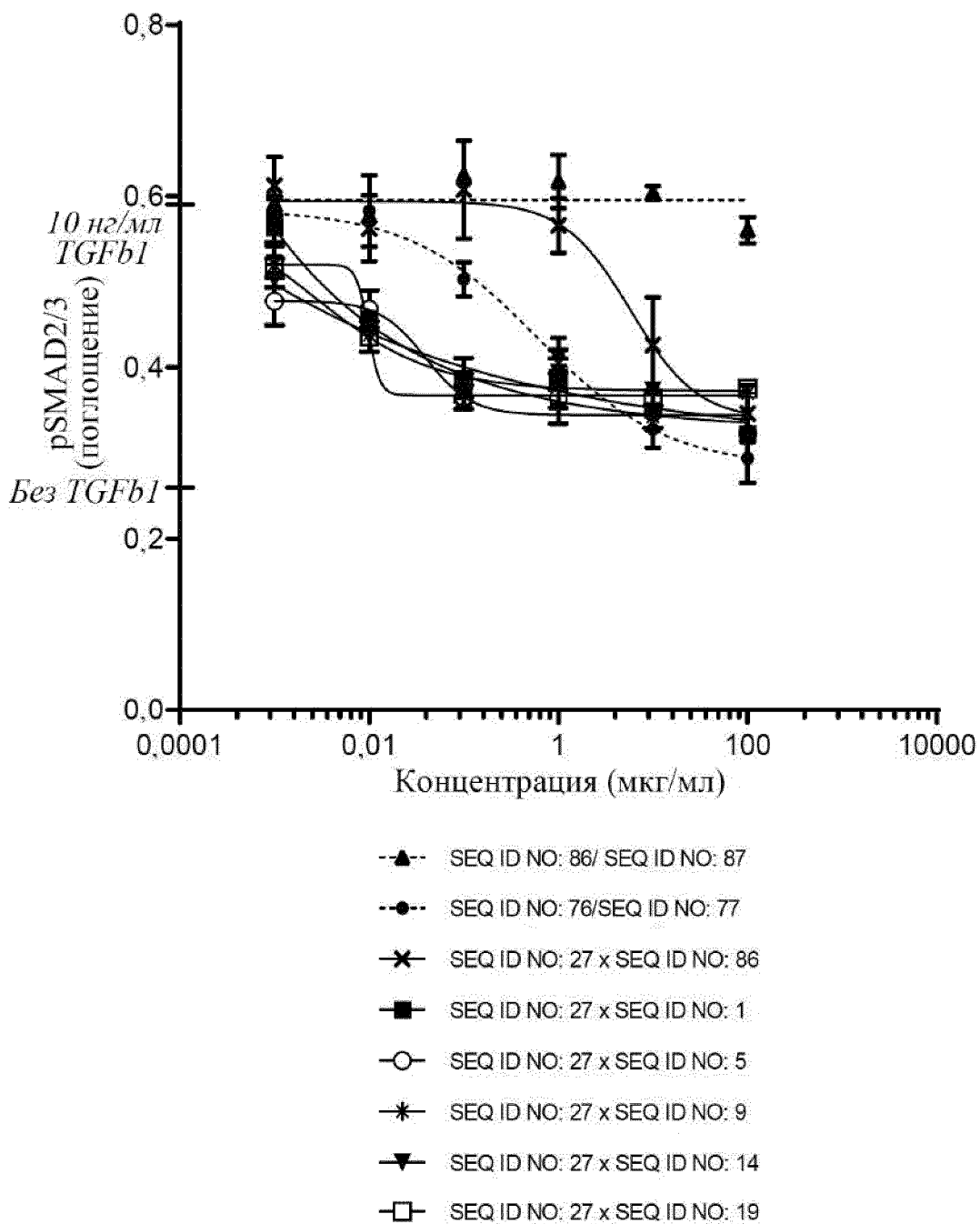
Фиг. 3 (продолжение)

J



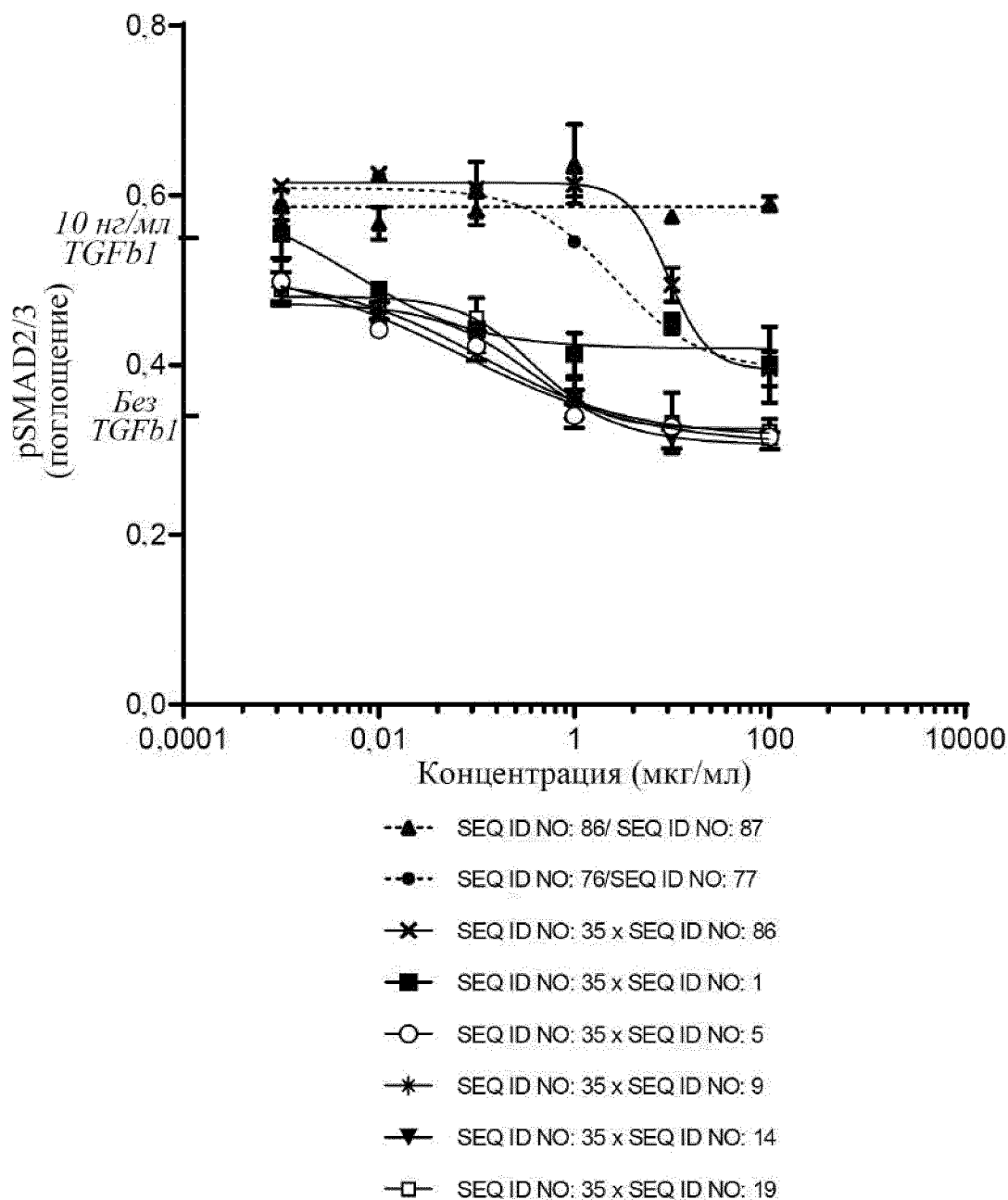
Фиг. 3 (продолжение)

К



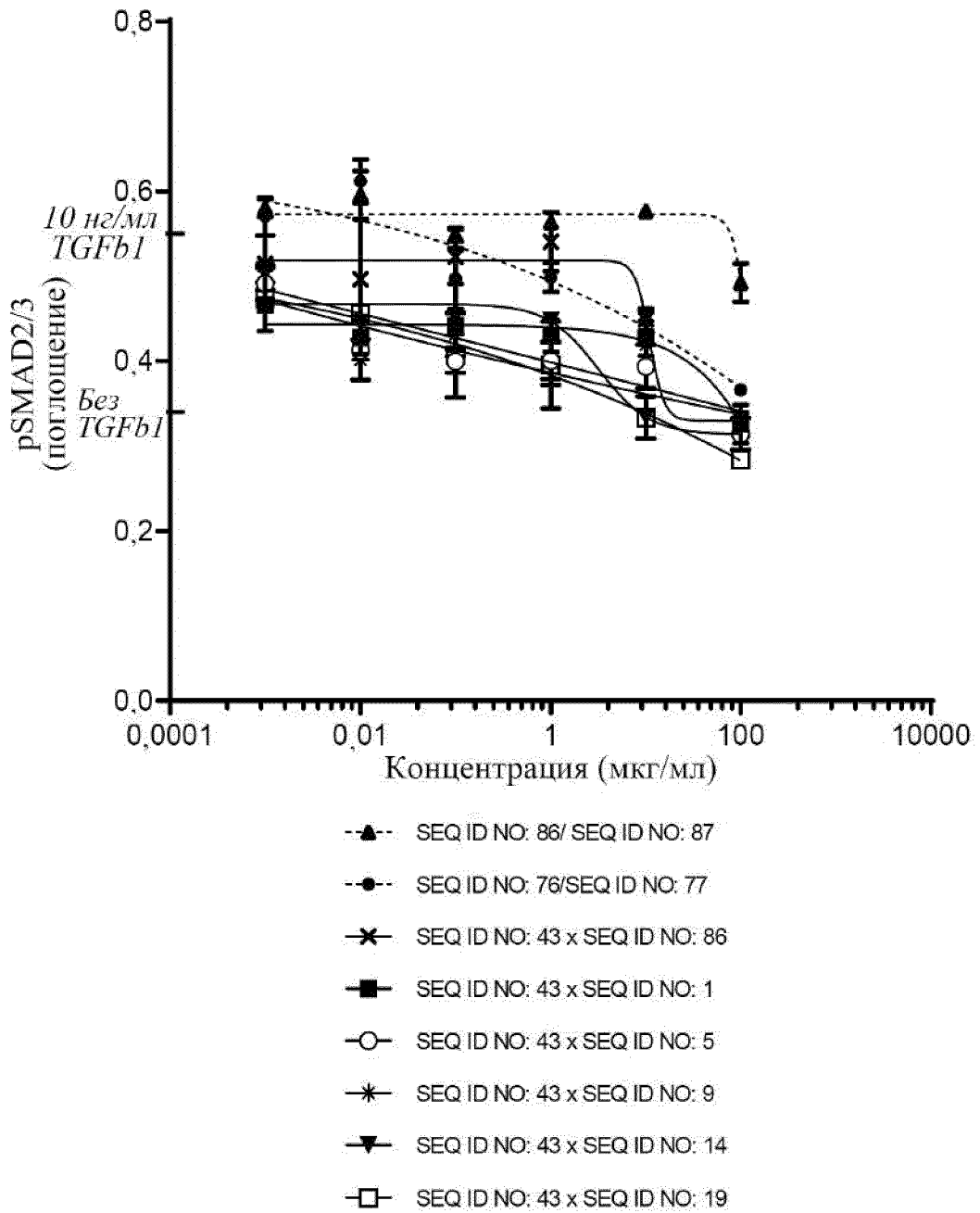
Фиг. 3 (продолжение)

L



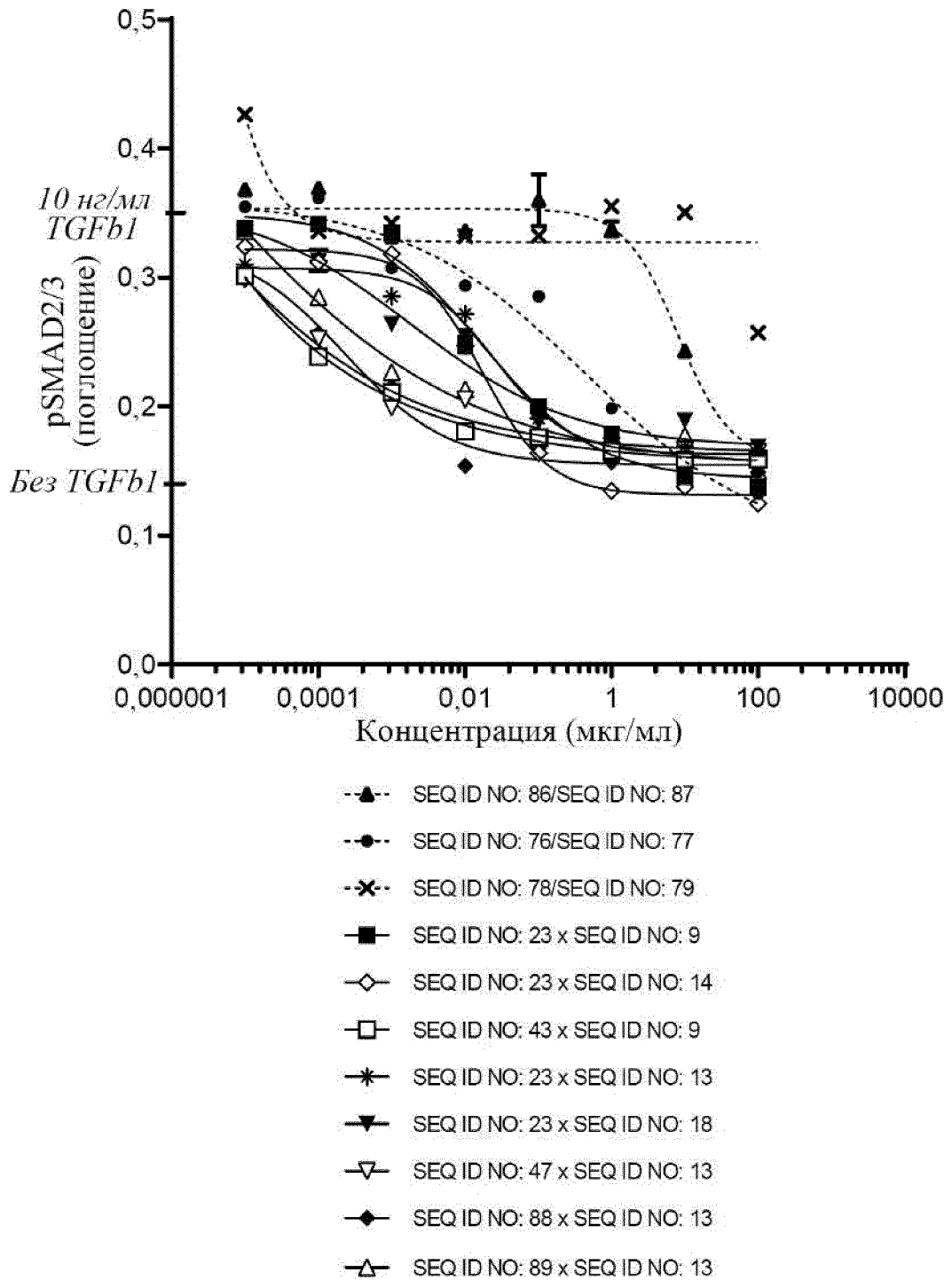
Фиг. 3 (продолжение)

M



Фиг. 3 (продолжение)

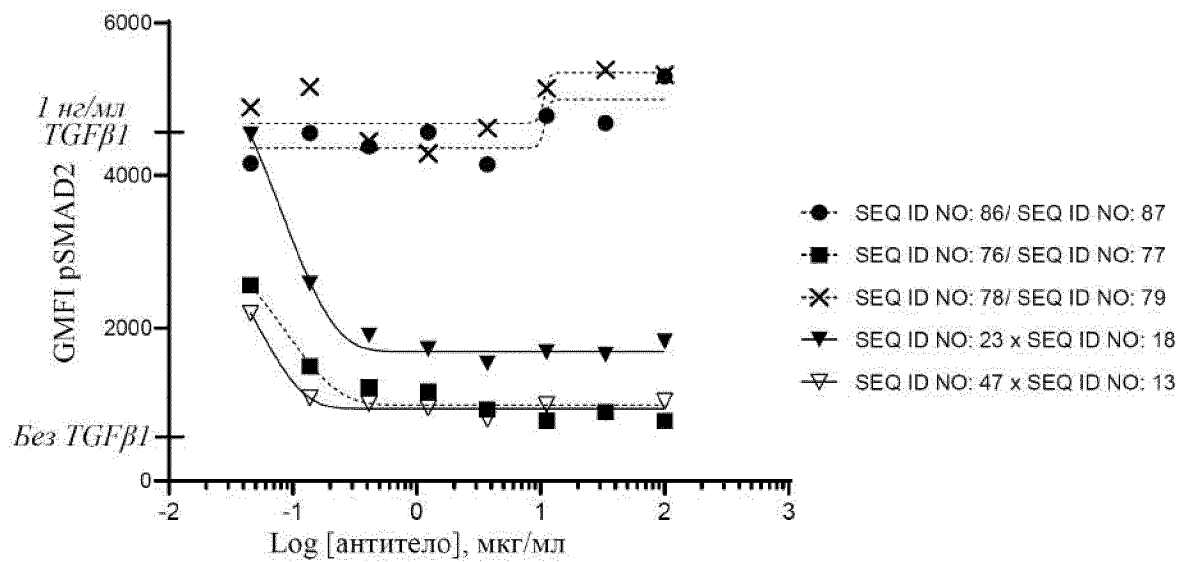
N

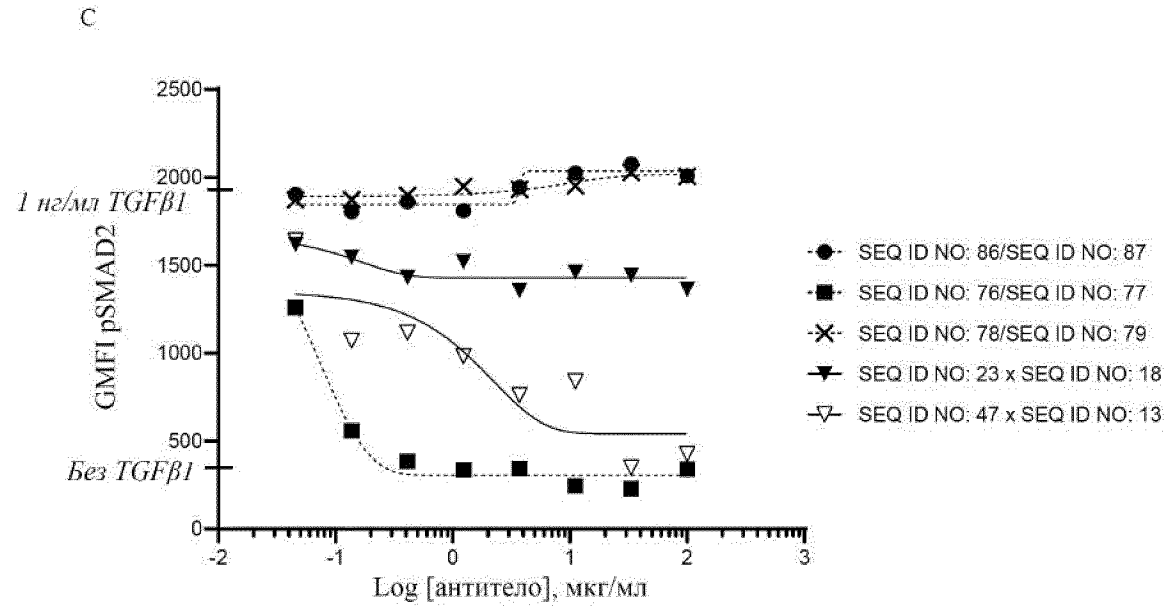
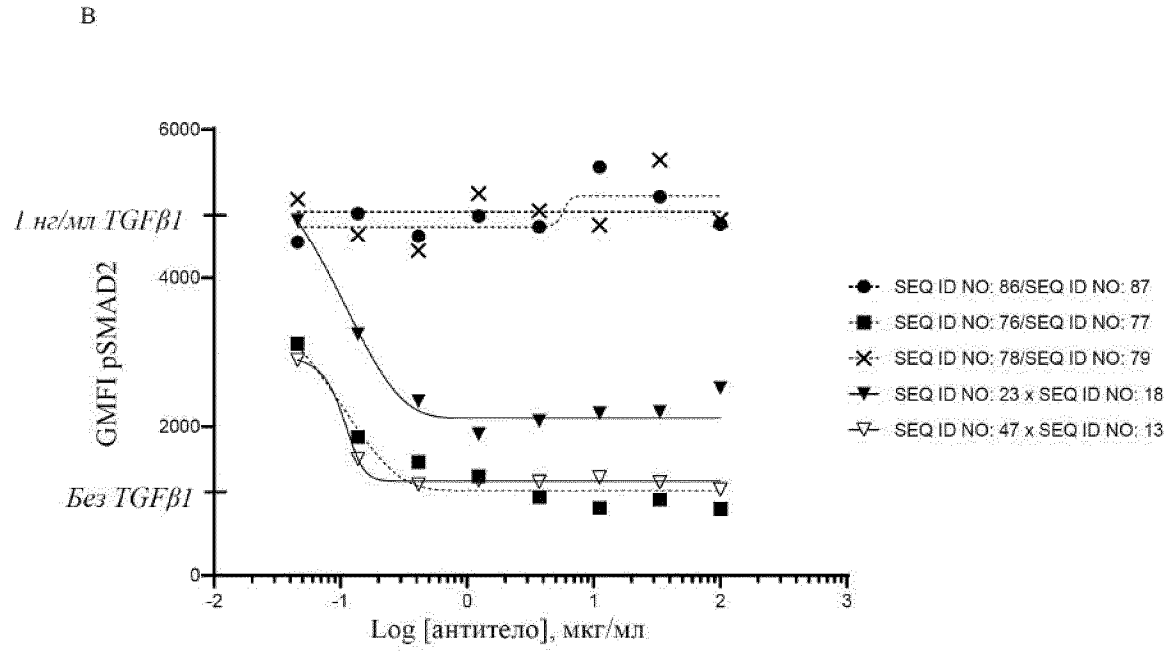


Фиг. 3 (продолжение)

Фиг. 4

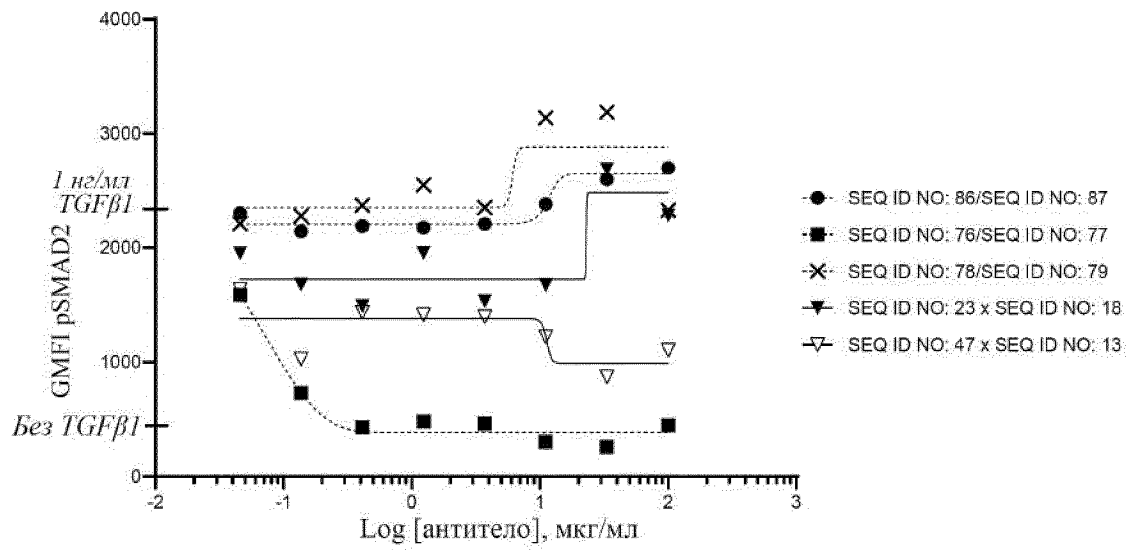
A



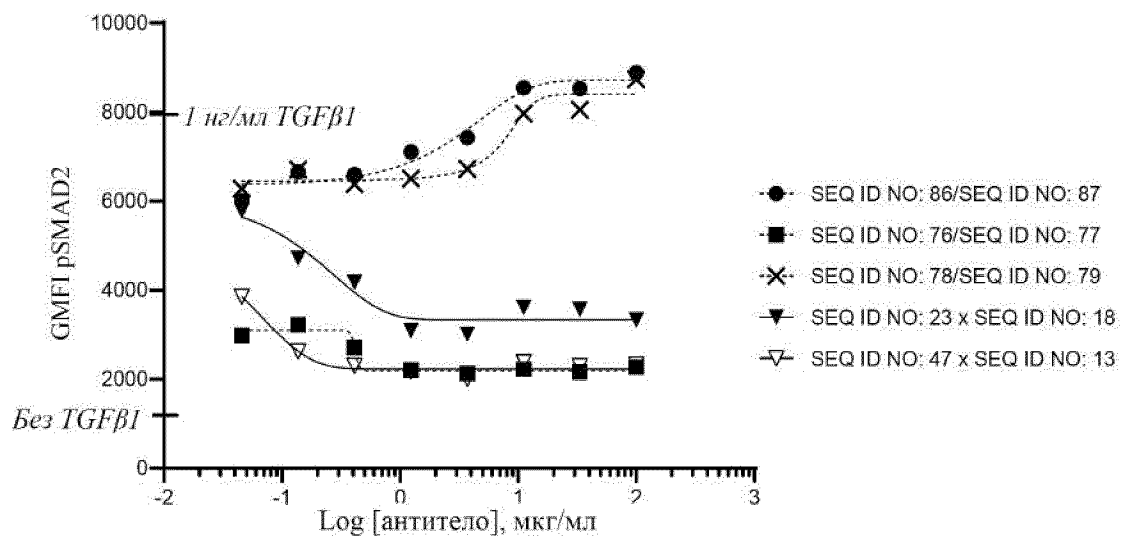


Фиг. 4 (продолжение)

D

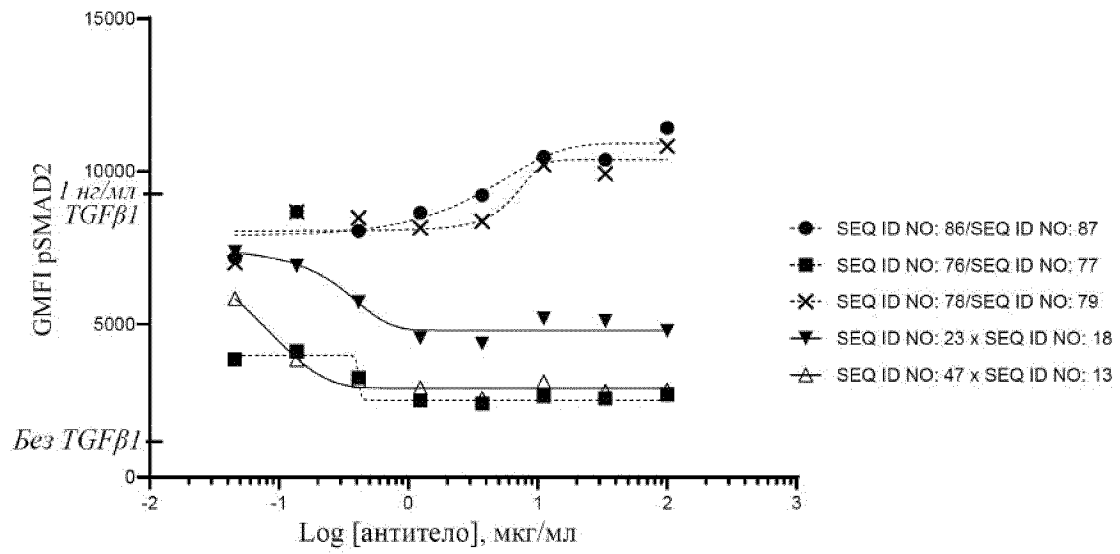


E

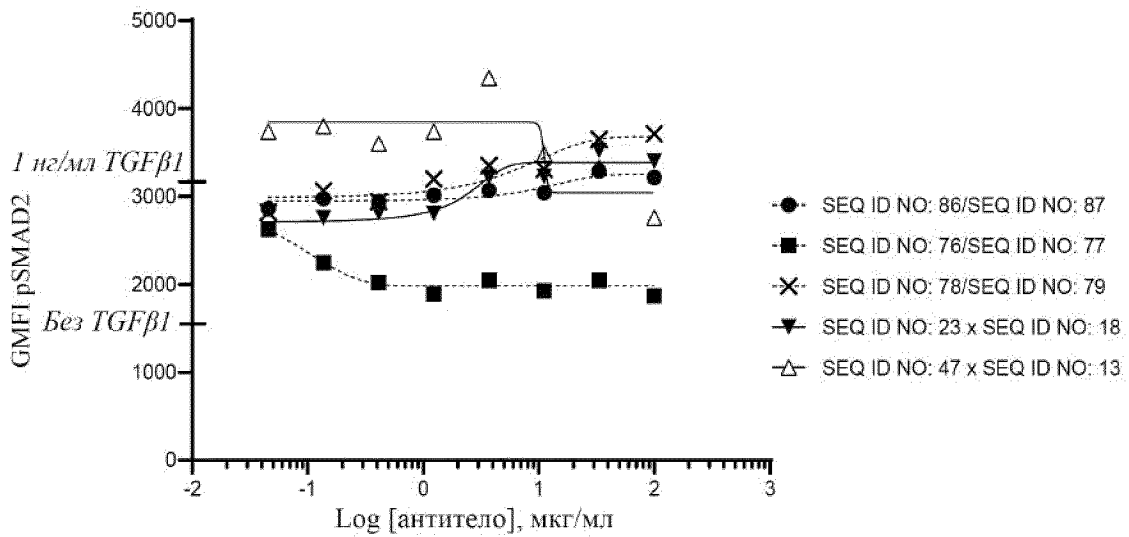


Фиг. 4 (продолжение)

F

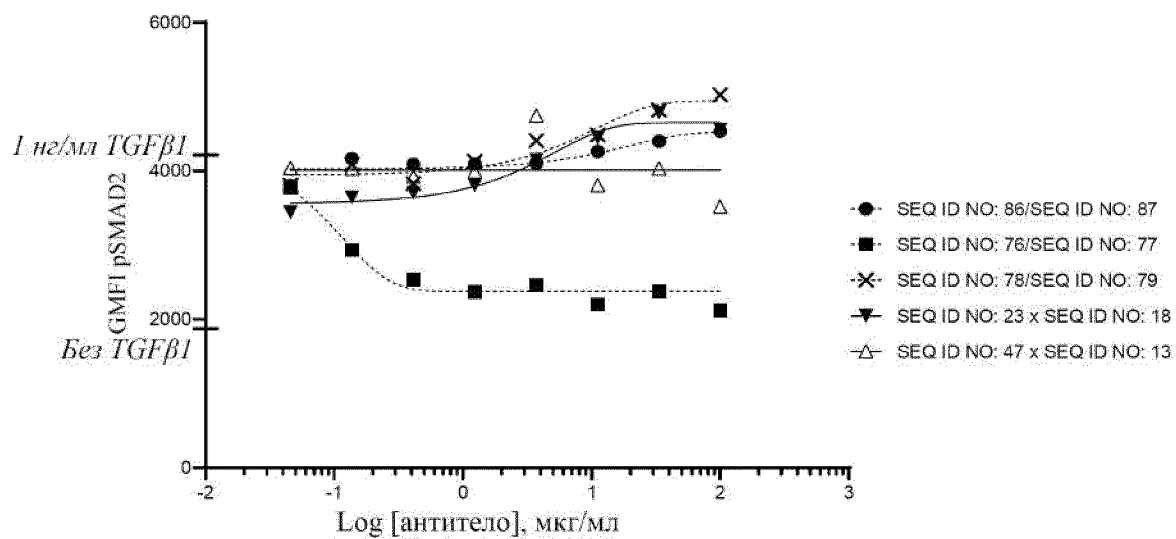


G



Фиг. 4 (продолжение)

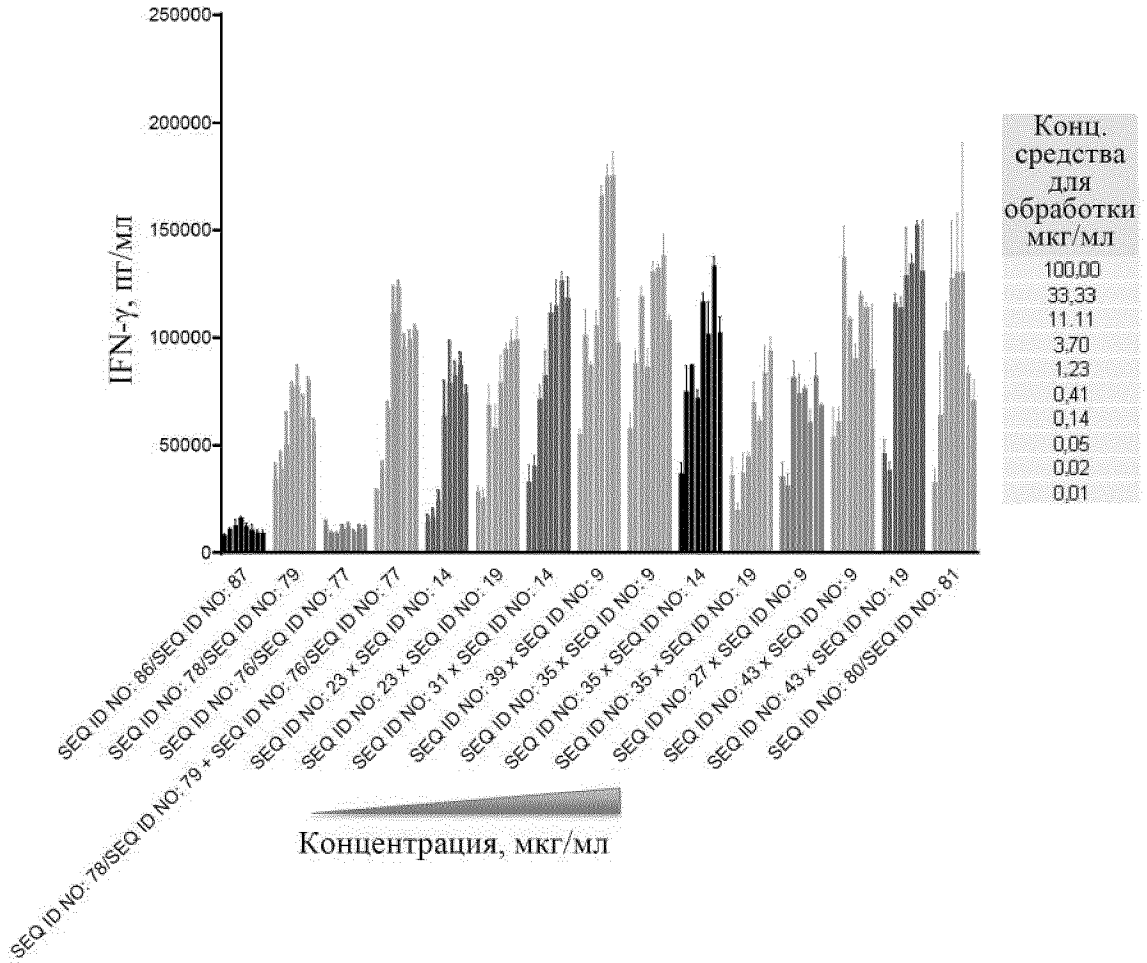
H



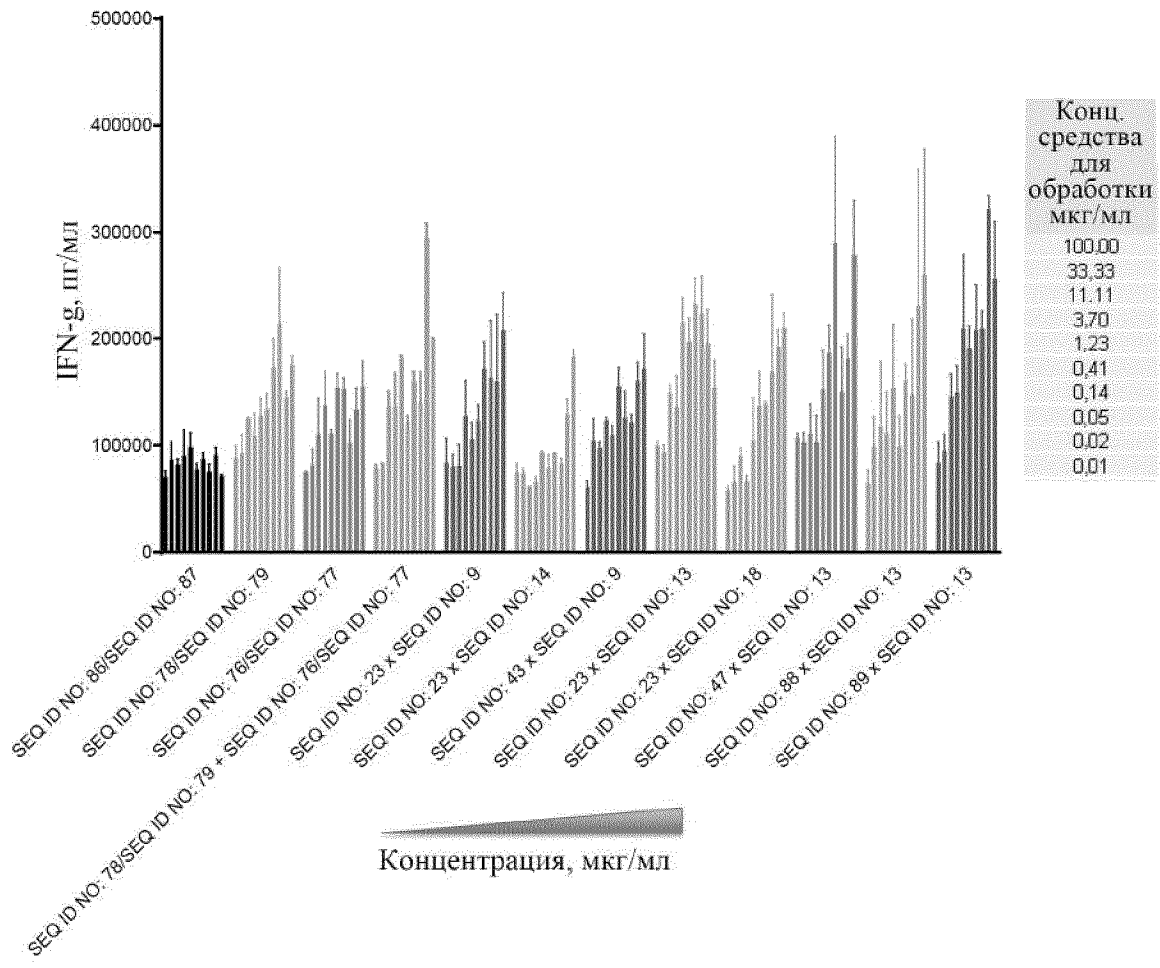
Фиг. 4 (продолжение)

Фиг. 5

A

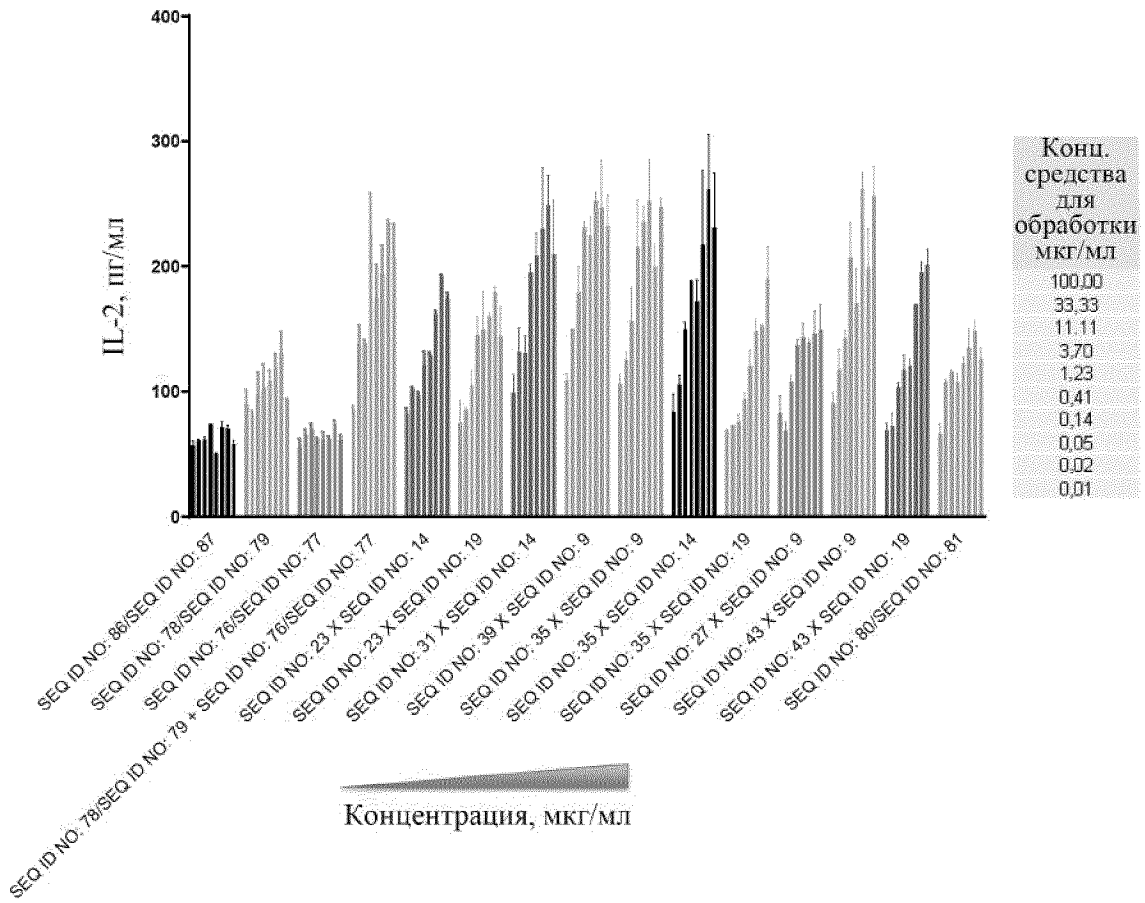


B



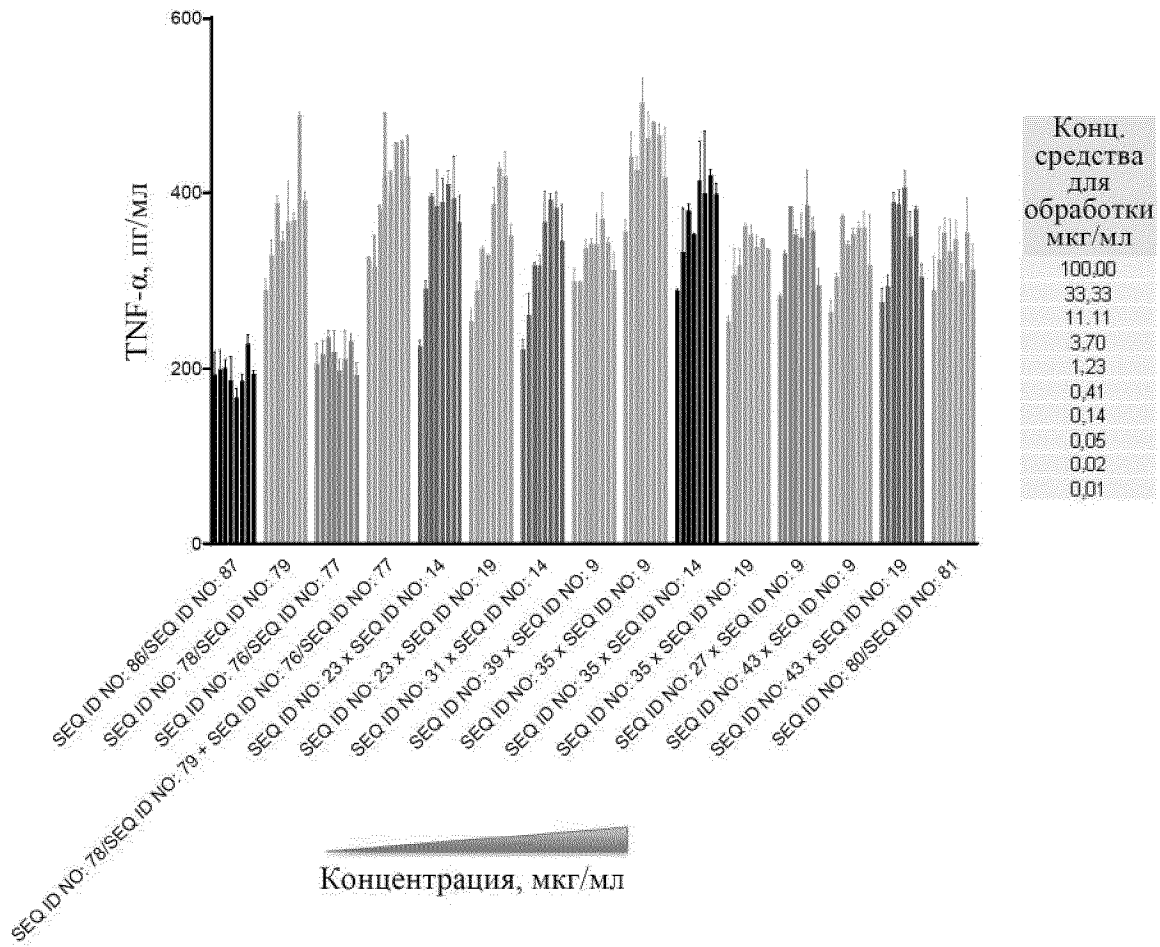
Фиг. 5 (продолжение)

C



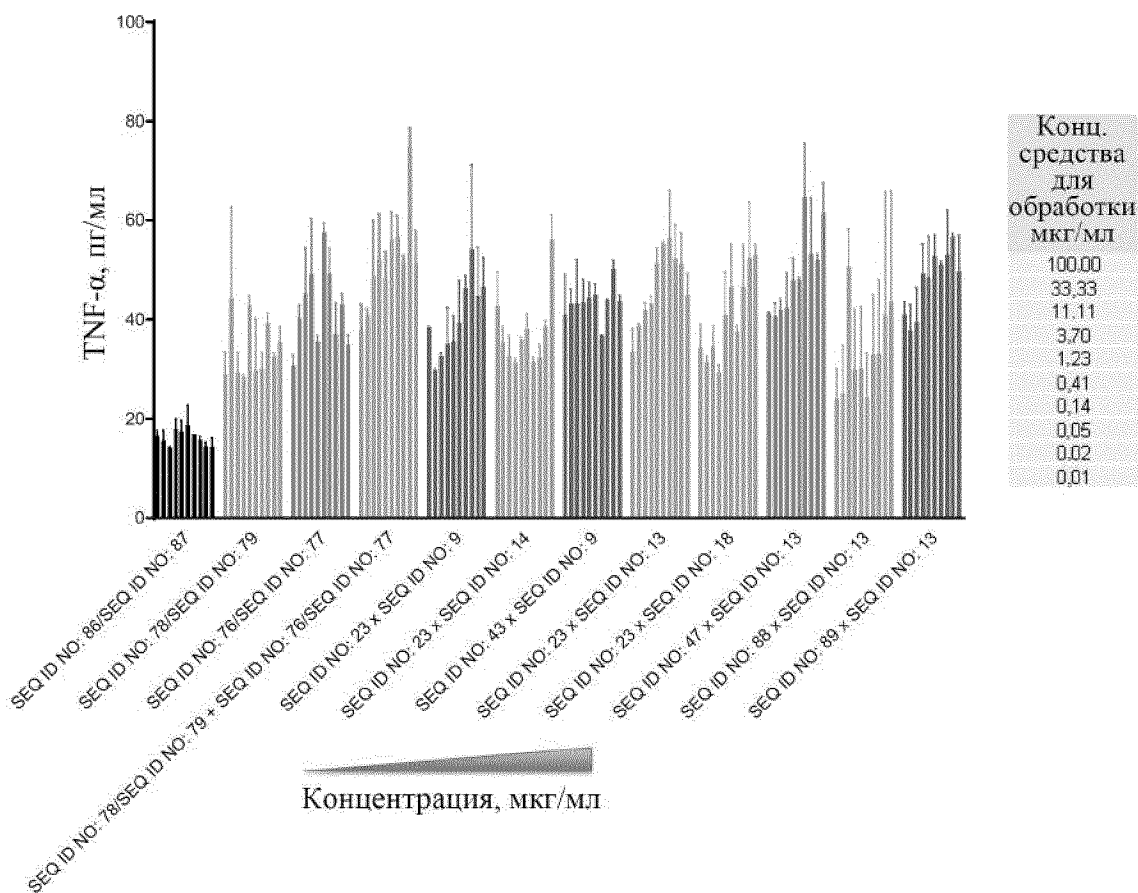
Фиг. 5 (продолжение)

D



Фиг. 5 (продолжение)

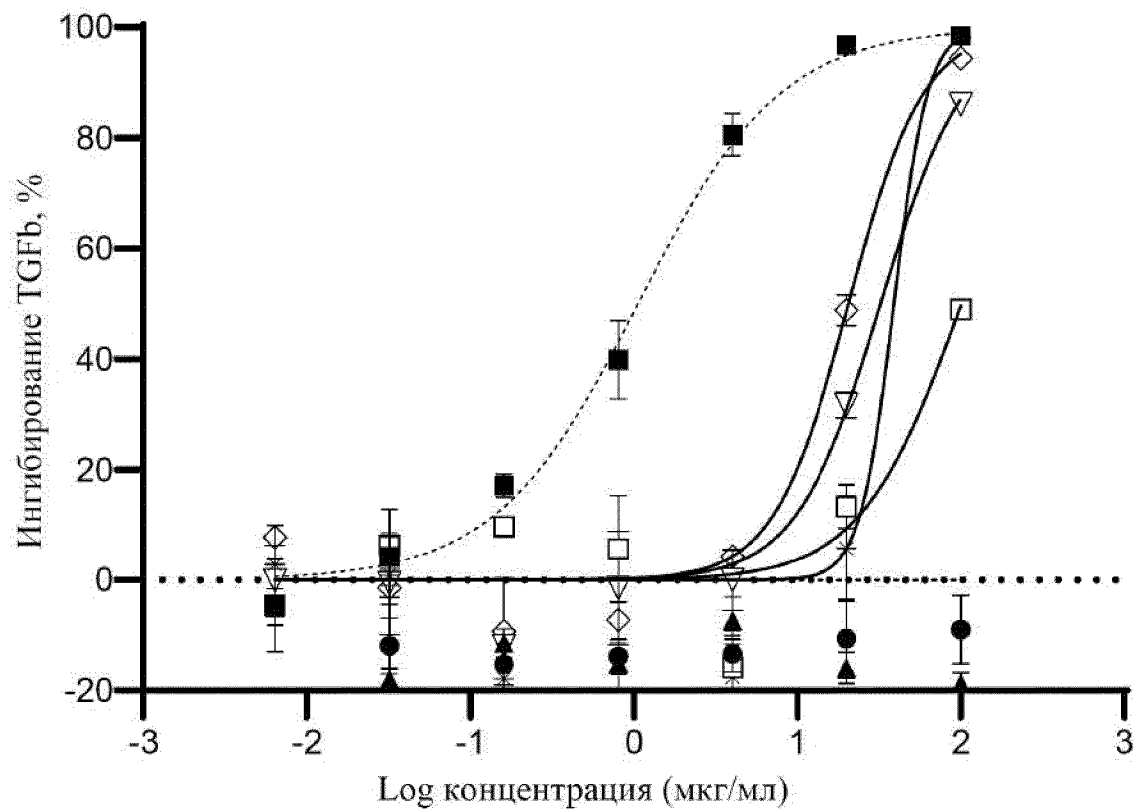
E



Фиг. 5 (продолжение)

Фиг. 6

А



□ SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14

* SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19

▽ SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9

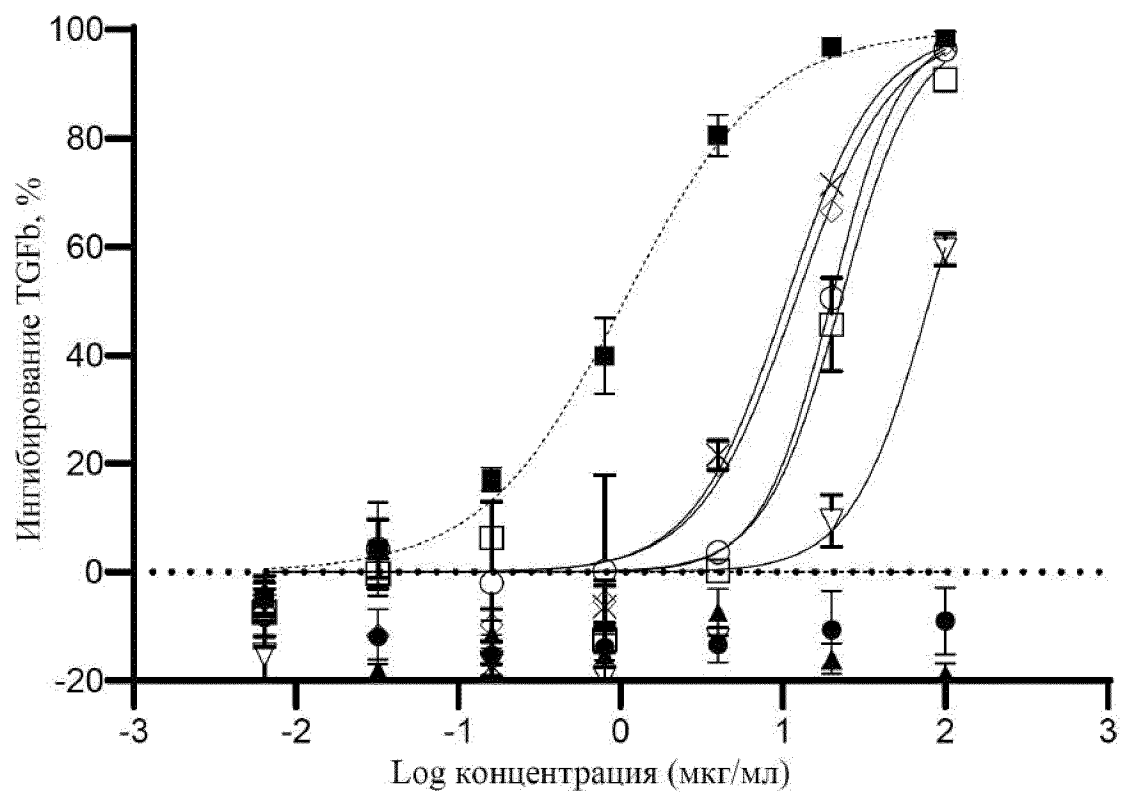
◇ SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9

▲ SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79

■ SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77

● SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87

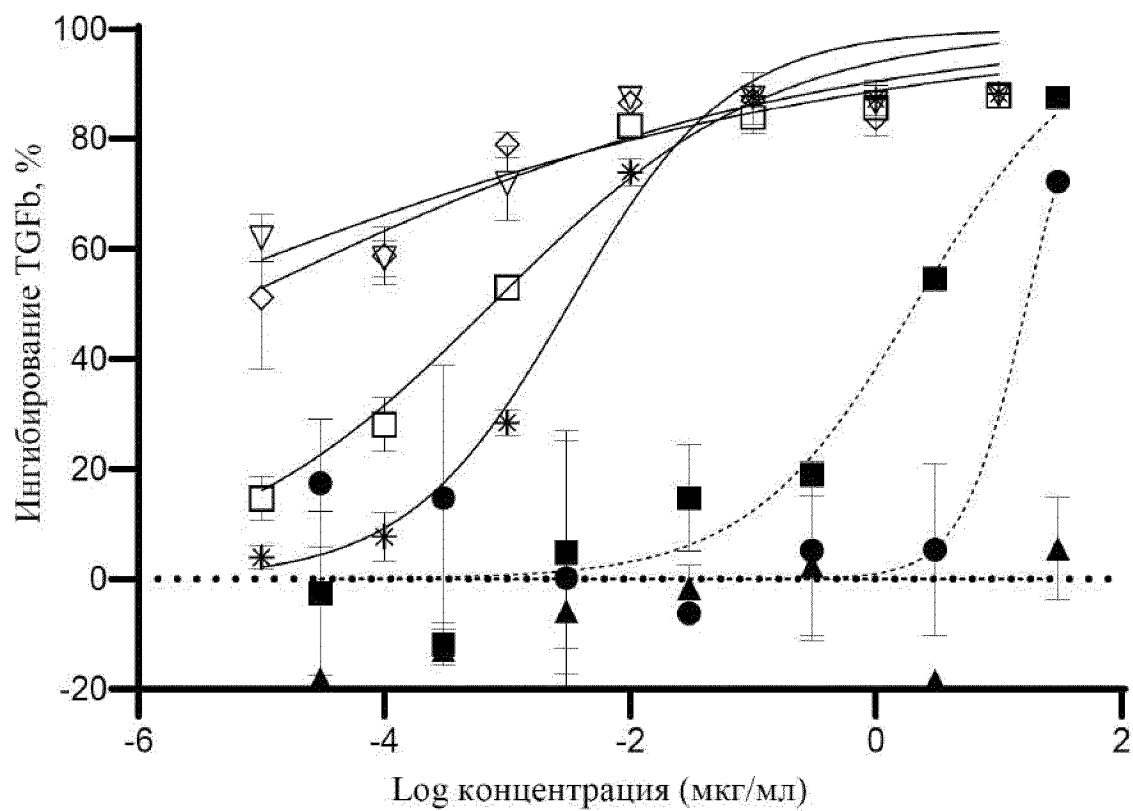
B



- SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 14
- ⊖ SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 19
- ▽ SEQ ID NO: 27 x SEQ ID NO: 9
- × SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 9
- ◇ SEQ ID NO: 43 x SEQ ID NO: 19
- ▲ SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
- SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
- SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87

Фиг. 6 (продолжение)

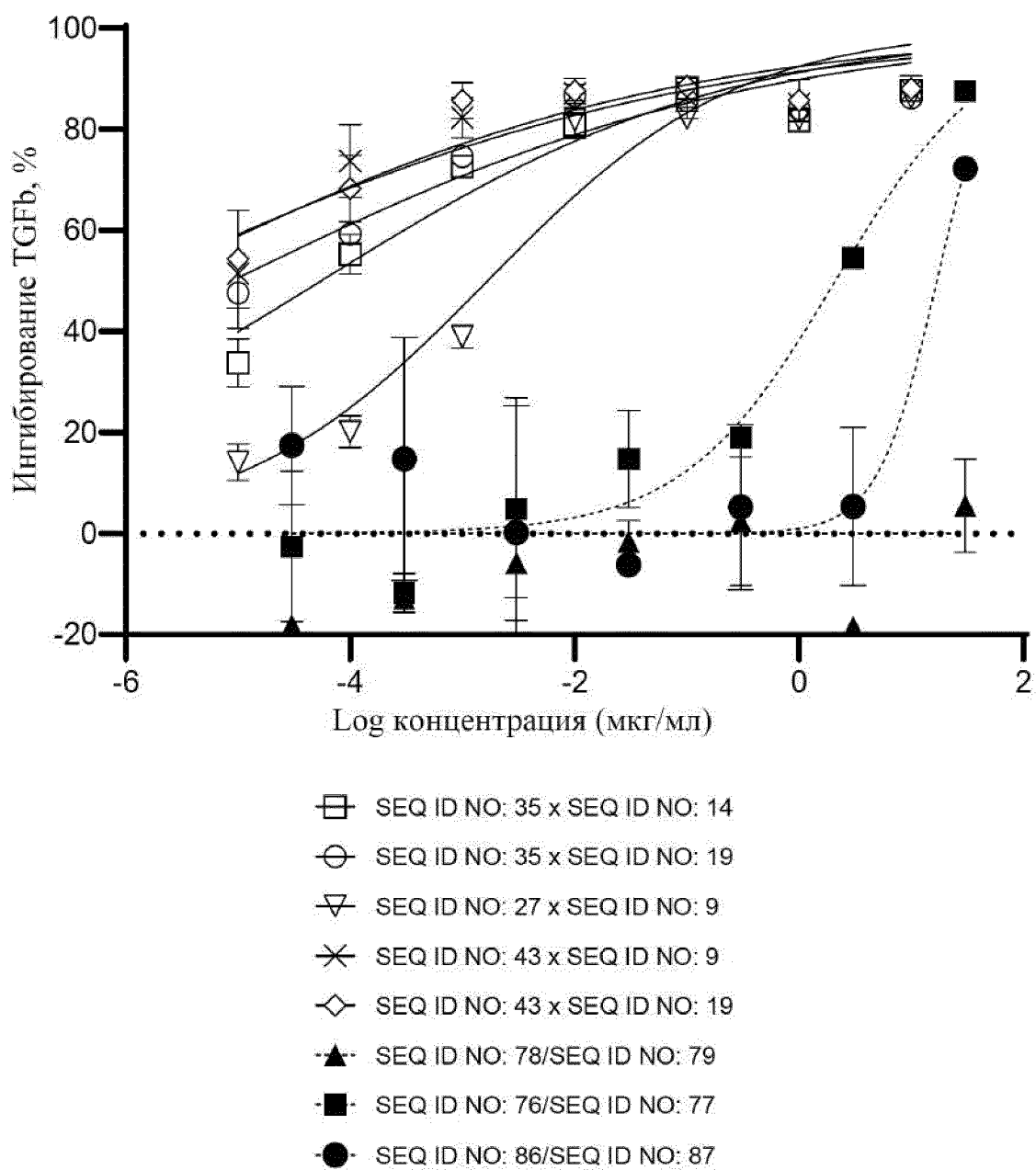
C



- SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 14
- * SEQ ID NO: 23 x SEQ ID NO: 19
- ▽ SEQ ID NO: 39 x SEQ ID NO: 9
- ◇ SEQ ID NO: 35 x SEQ ID NO: 9
- ▲ SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
- SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
- SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87

Фиг. 6 (продолжение)

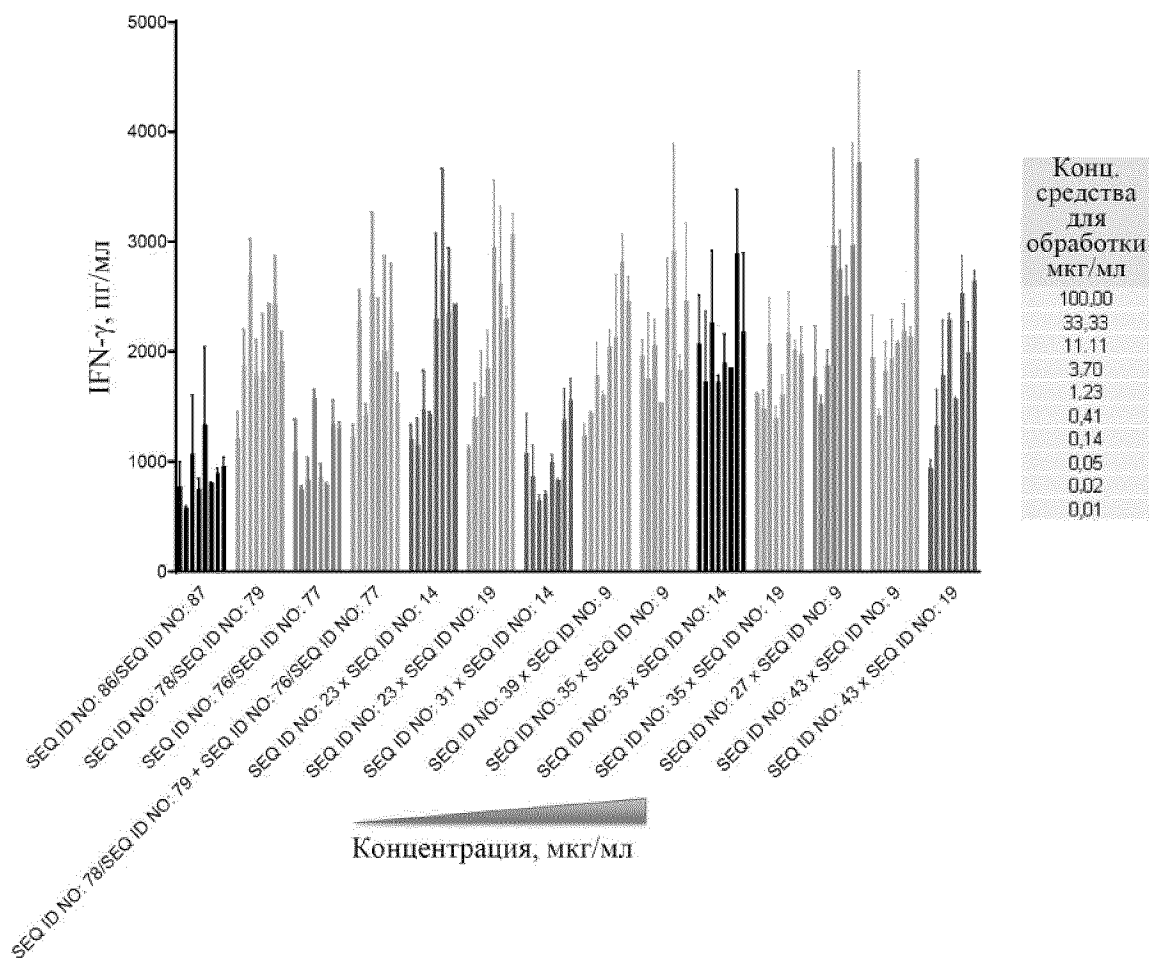
D



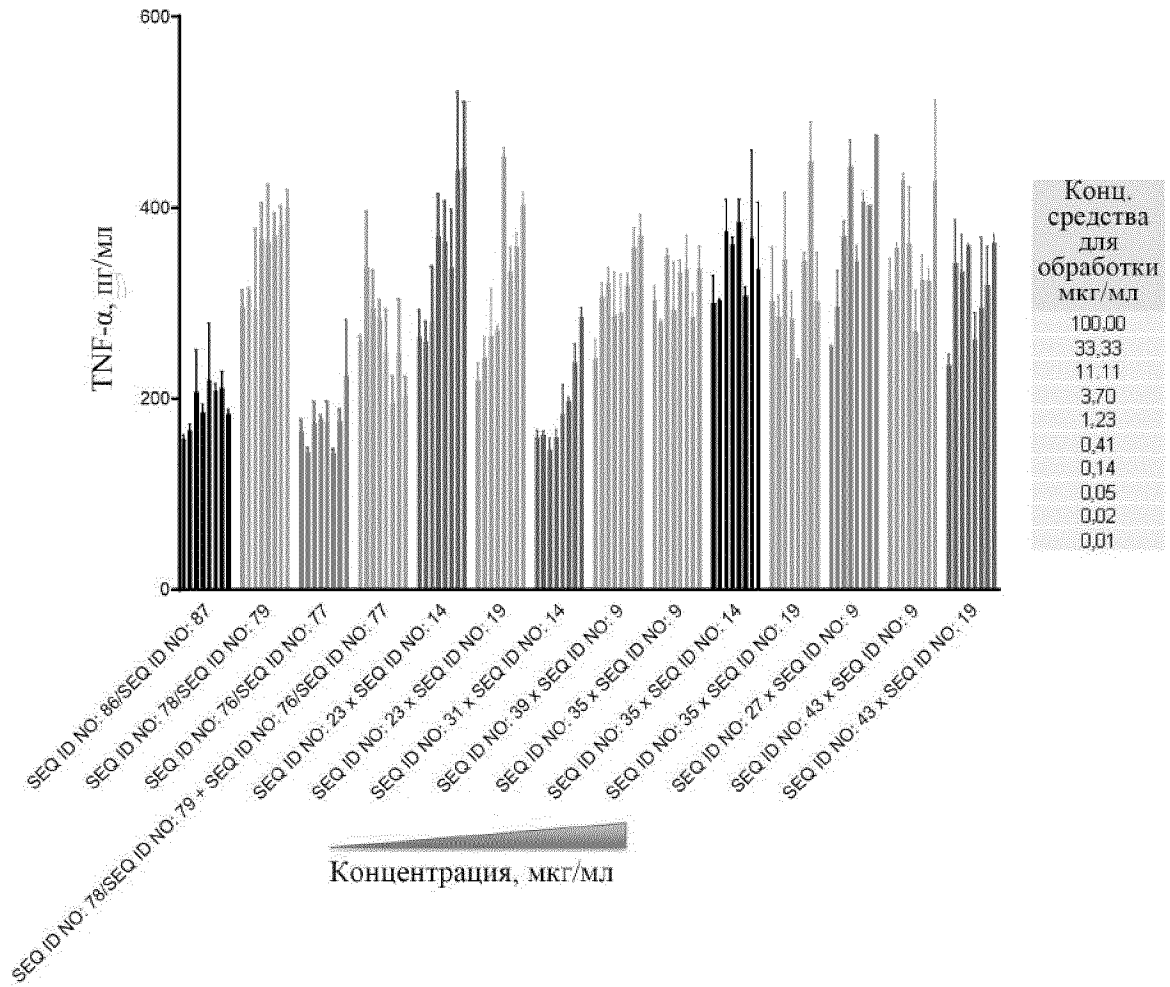
Фиг. 6 (продолжение)

Фиг. 7

A



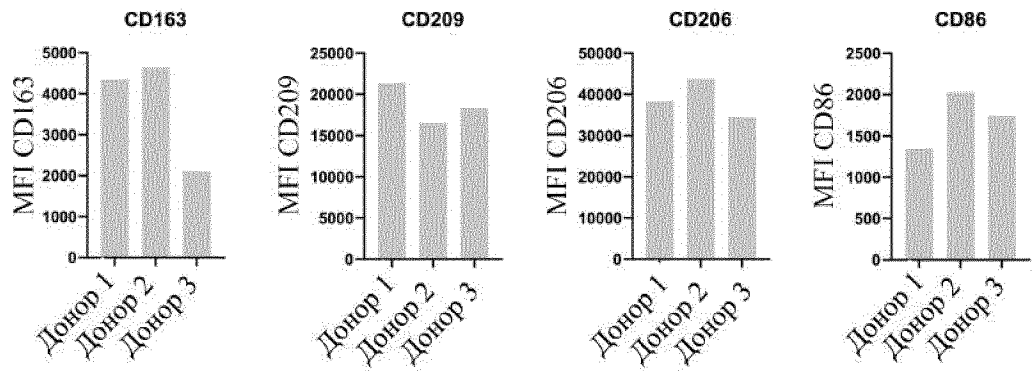
B.



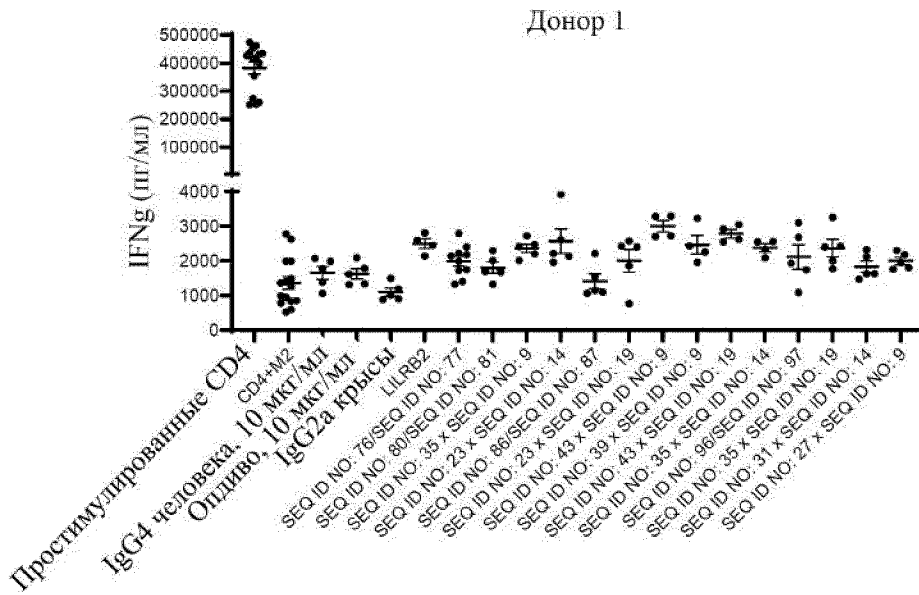
Фиг. 7 (продолжение)

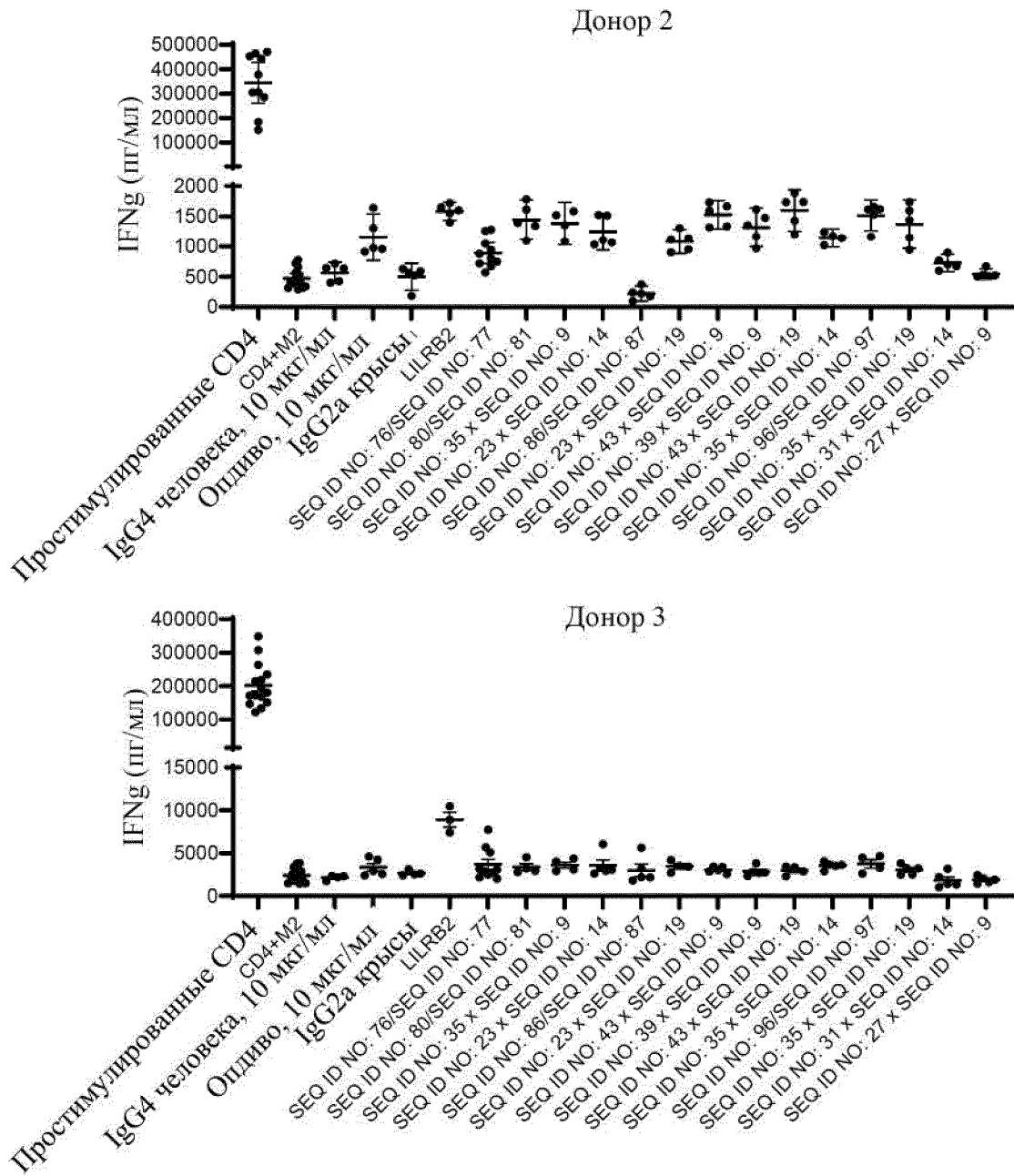
Фиг. 8

A



B

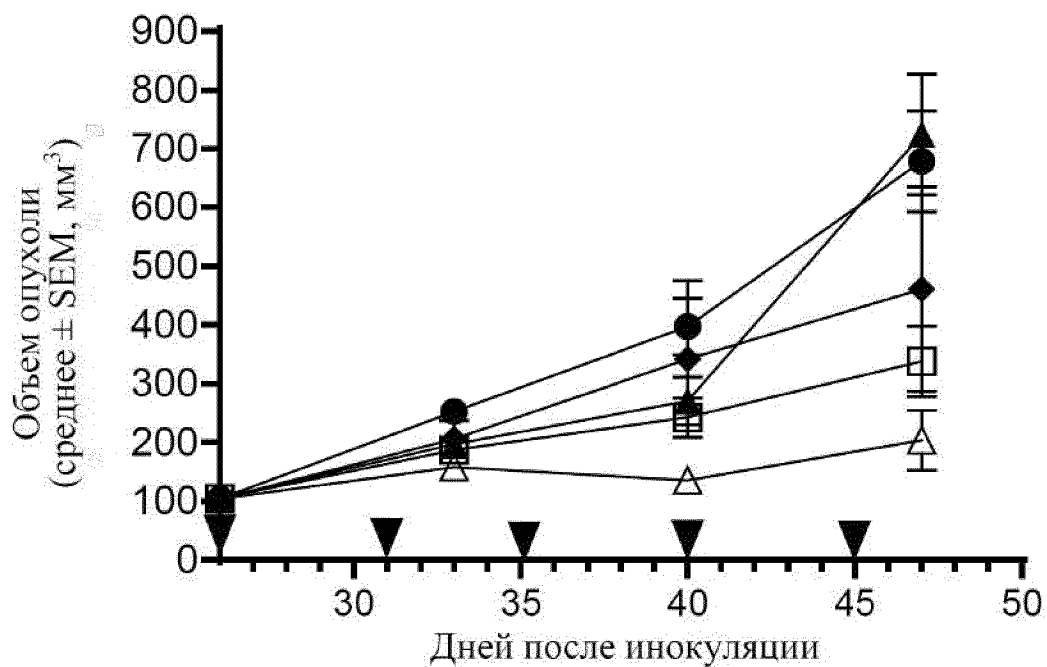




Фиг. 8В (продолжение)

ФИГ. 9

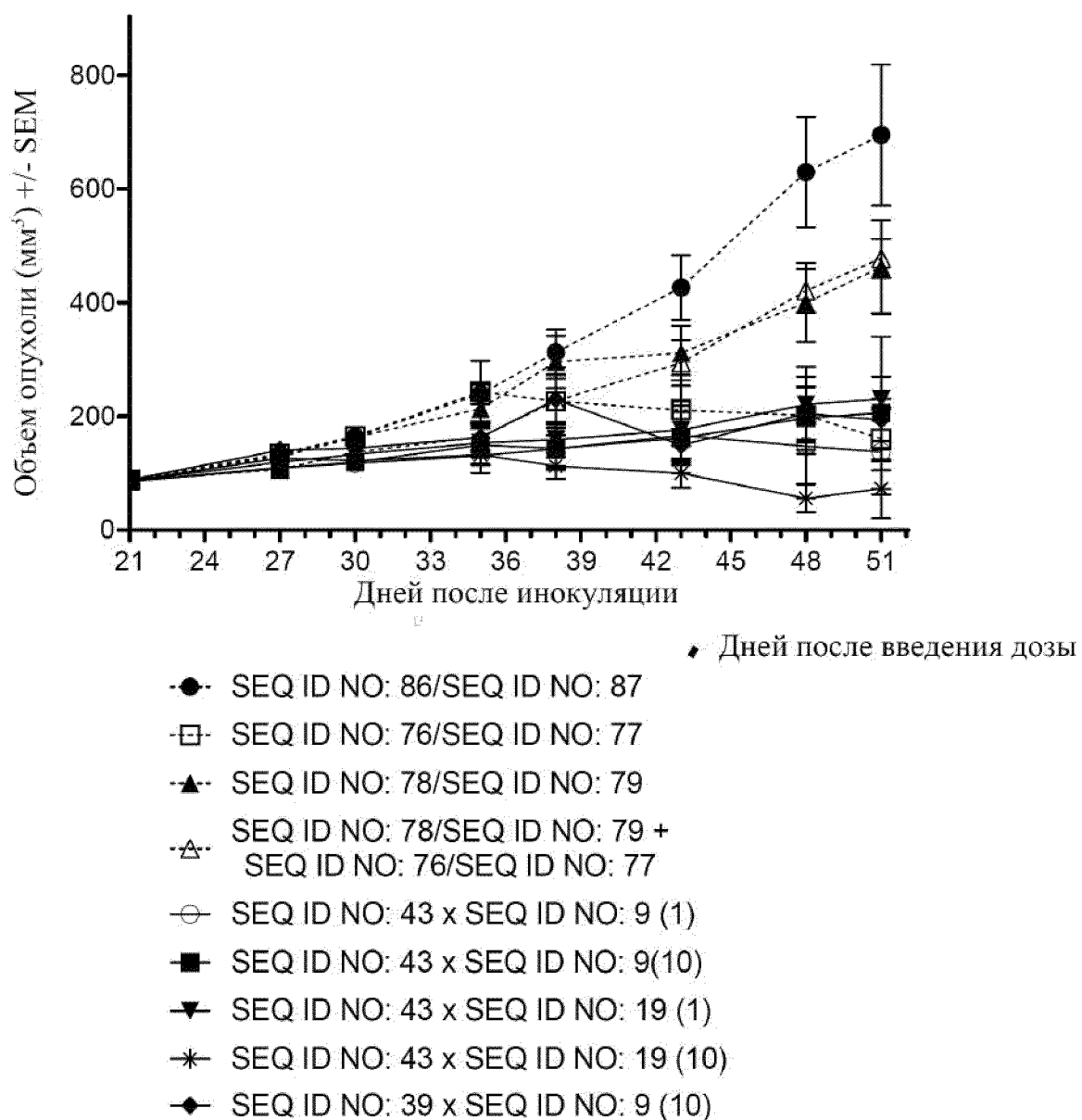
А



** ▼ дней после введения дозы животным

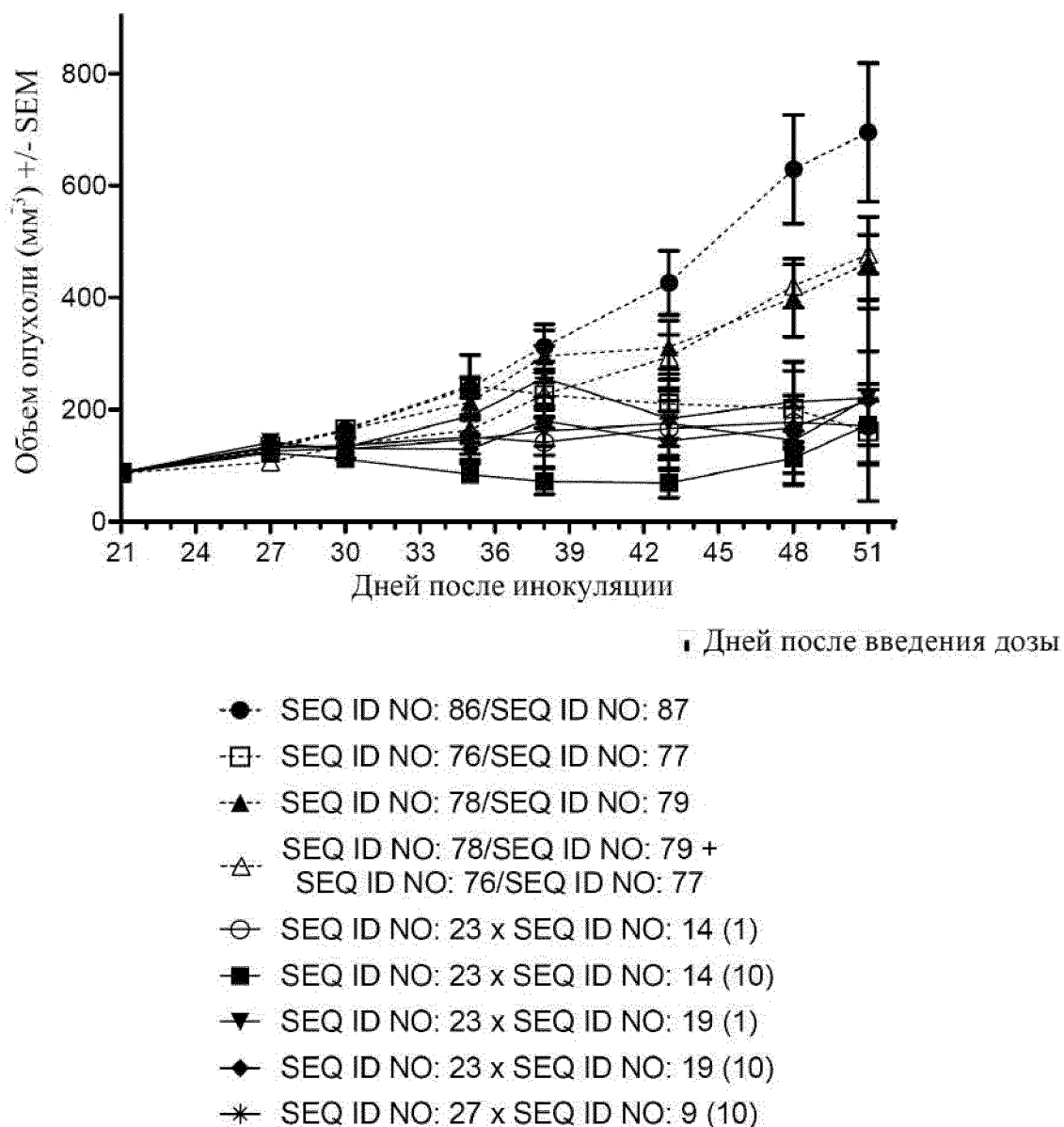
- SEQ ID NO: 86/SEQ ID NO: 87
- ◻ SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77
- ▲ SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
- △ SEQ ID NO: 76/SEQ ID NO: 77 + SEQ ID NO: 78/SEQ ID NO: 79
- ◆ SEQ ID NO: 80/SEQ ID NO: 81

B



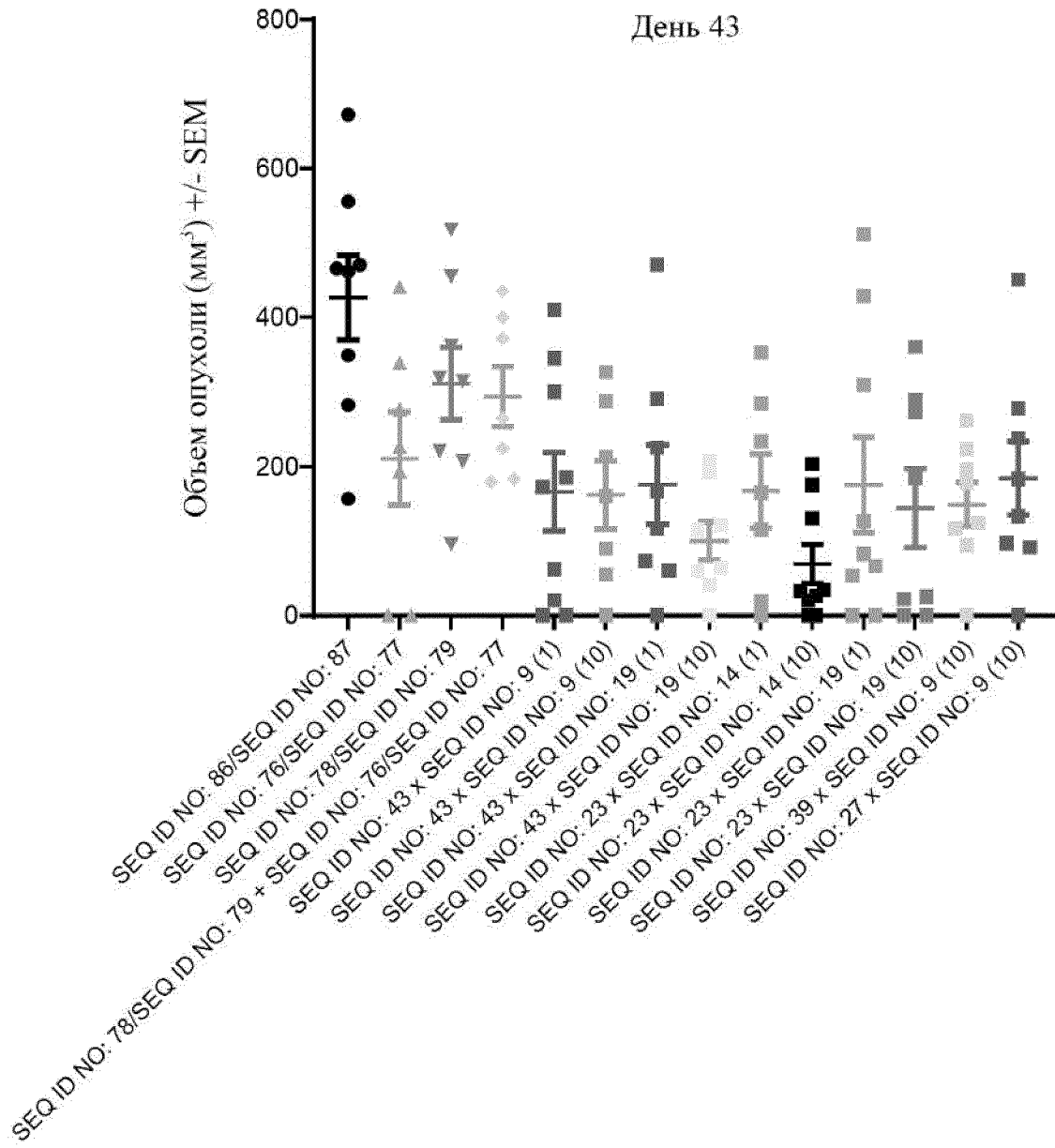
Фиг. 9 (продолжение)

В, продолжение



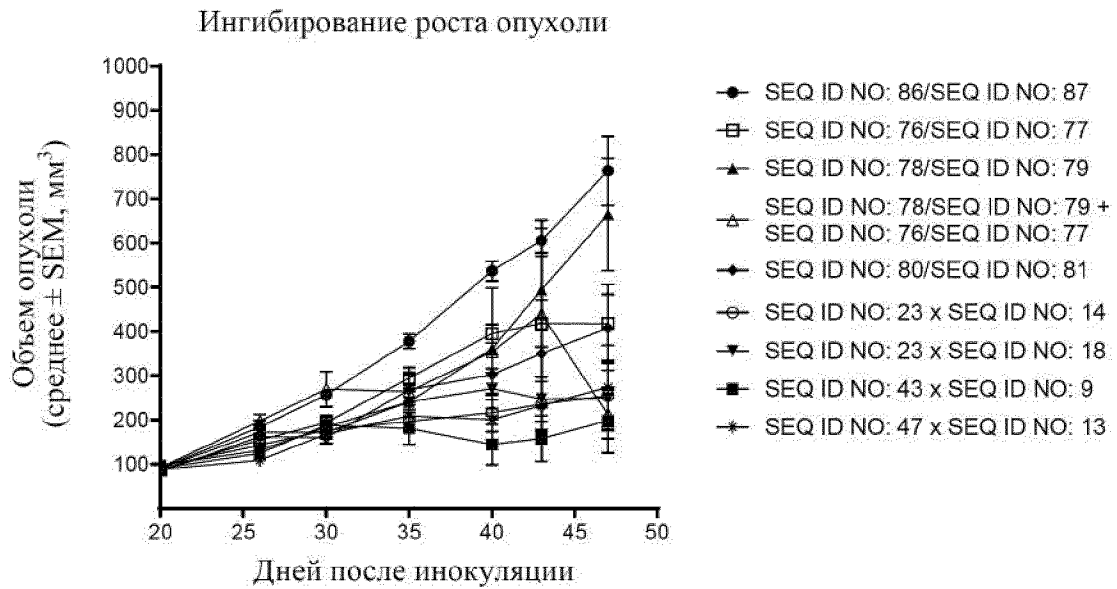
Фиг. 9 (продолжение)

C



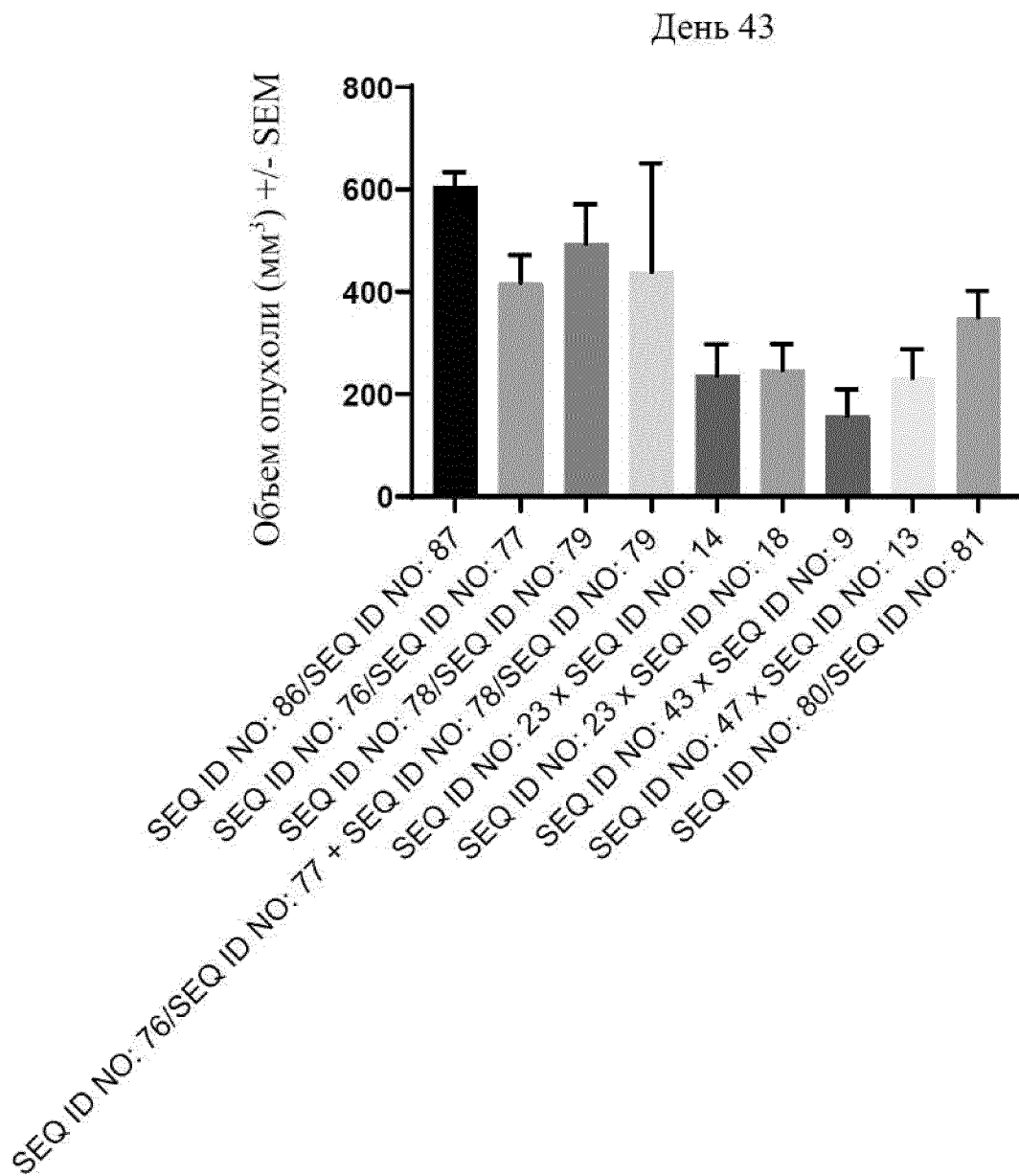
Фиг. 9 (продолжение)

D



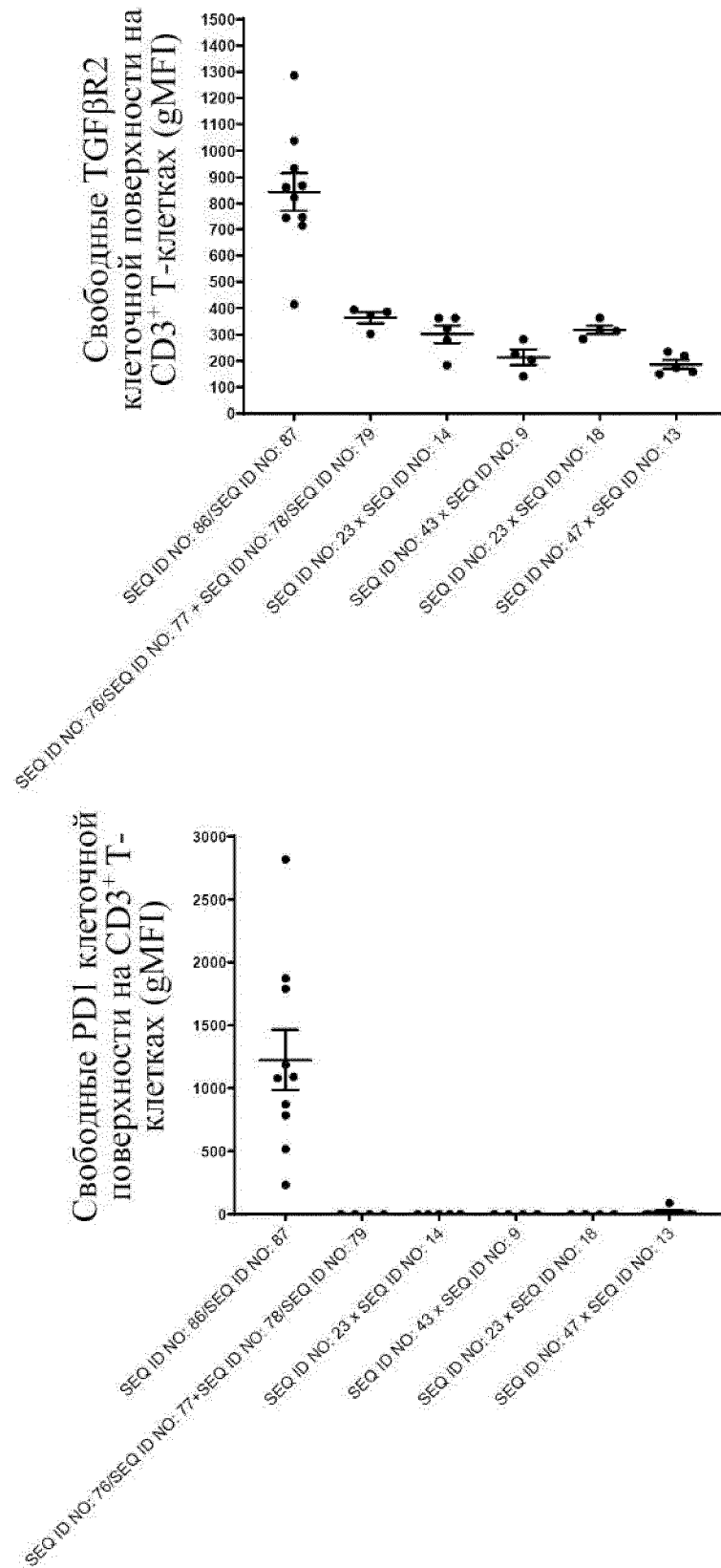
Фиг. 9 (продолжение)

E



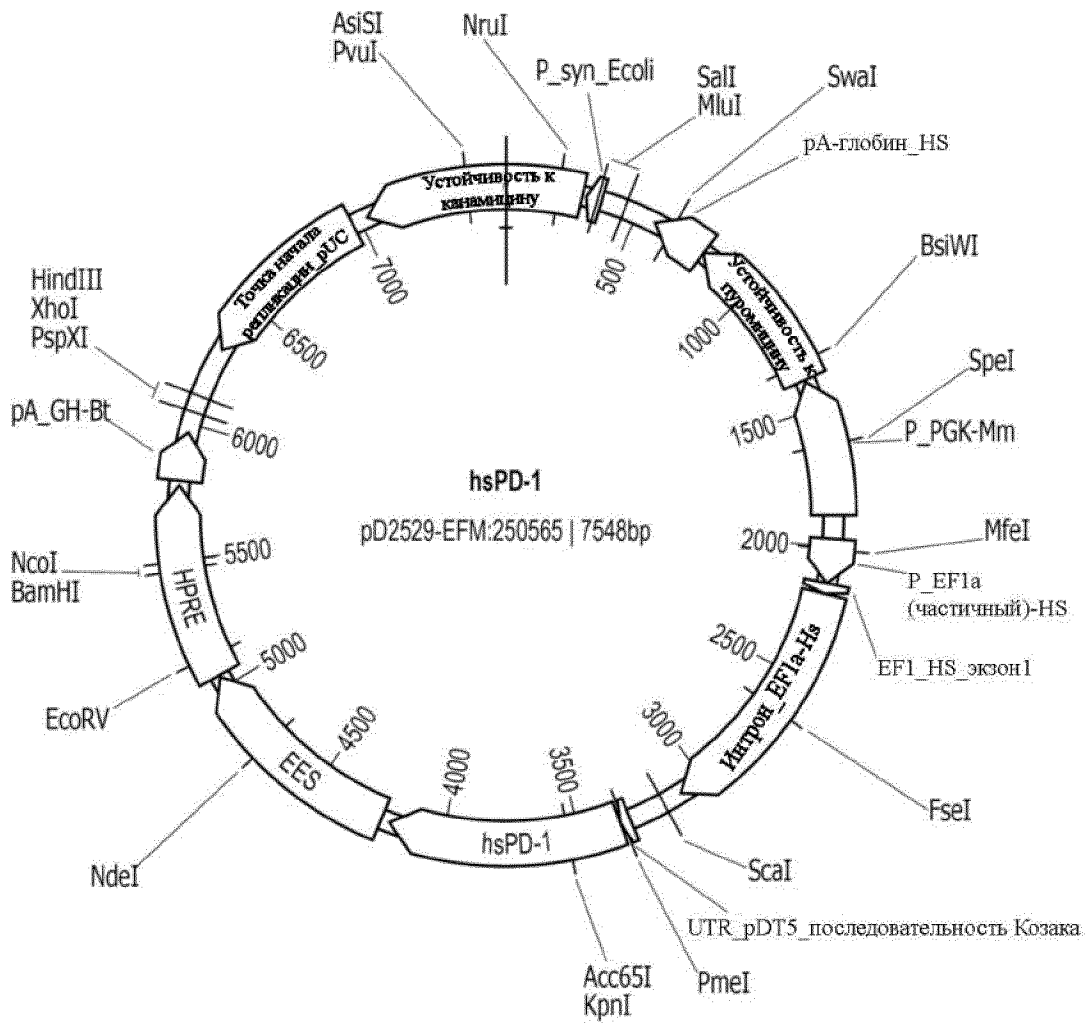
Фиг. 9 (продолжение)

F



Фиг. 9 (продолжение)

Фиг. 10



Фиг. 11

