



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.22

(21) Номер заявки
201891165

(22) Дата подачи заявки
2016.11.17

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(54) МОЛЕКУЛЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ PD1 И/ИЛИ LAG3, СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ, ПОЛИНУКЛЕОТИД, ВЕКТОР И КЛЕТКА-ХОЗЯИН

(31) **62/257,009**

(32) **2015.11.18**

(33) **US**

(43) **2018.11.30**

(86) **PCT/US2016/062394**

(87) **WO 2017/087589 2017.05.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕРК ШАРП И ДОУМ ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:
Бауман Эдвард, Бьюмонт Марибел (US), Бюиз Мари-Анж, Буттон Карло, Домбрехт Бруно, Влерик Дэвид (BE), Кастелейн Роберт А. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A2-2008071447
WO-A2-2010007376
C. VINCKE ET AL.: "General Strategy to Humanize a Camelid Single-domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 284, no. 5, 14 November 2008 (2008-11-14), pages 3273-3284, XP055107615, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M806889200, abstract, figure 1

WO-A2-2013024059
J. C. CORDY ET AL.: "Specificity of human anti-variable heavy (V H) chain autoantibodies and impact on the design and clinical testing of a V H domain antibody antagonist of tumour necrosis factor-[alpha] receptor 1", CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 182, no. 2, 11 September 2015 (2015-09-11), pages 139-148, XP055342270, GB ISSN: 0009-9104, DOI: 10.1111/cei.12680, abstract, figure 2

WO-A2-2014043509

WO-A1-2015044386

WO-A2-2010019570

WO-A2-2014030049

DANIEL SANGHOON SHIN ET AL.: "The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next?", CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, vol. 33, 1 April 2015 (2015-04-01), pages 23-35, XP055343558, GB, ISSN: 0952-7915, DOI: 10.1016/j.coi.2015.01.006 page 26-27, references 17, 103

WO-A1-2015112900

Admin: "TESARO And AnaptysBio Expand Collaboration With Novel Bispecific Antibody Candidate", 4 December 2014 (2014-12-04), XP055369219, Retrieved from the Internet: URL: <https://immuno-oncologynews.com/2014/12/04/tesaro-anaptysbio-expand-collaboration-novel-bispecific-antibody-candidate/> [retrieved on 2017-05-04] page 2

WO-A2-2015173325

Ross La Motte-Mohs ET AL.: "MGD013, a Bispecific PD-1 x LAG-3 Dual-Affinity Re-Targeting (DART) Protein with T-cell Immunomodulatory Activity for Cancer Treatment", 20 April 2016 (2016-04-20), XP055369262, Retrieved from the Internet: URL: http://files.shareholder.com/download/s/AMDA-278VRP/0x0x886238/9181C658-BC8D-4410-88B2-BD08E68ABDEE/MacroGenics_AACR_2016_MGD013_PD-1_x_LAG-3_DART_PDF [retrieved on 2017-05-04] poster

WO-A1-2015200119

S.-R. WOO ET AL.: "Immune Inhibitory Molecules LAG-3 and PD-1 Synergistically Regulate T-cell Function to Promote Tumoral Immune Escape", CANCER RESEARCH, vol. 72, no. 4, 20 December 2011 (2011-12-20), pages 917-927, XP055151722, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1620, abstract, figures

WO-A1-2015042246

M. C. HOLLAND ET AL.: "Autoantibodies to Variable Heavy (VH) Chain Ig Sequences in Humans Impact the Safety and Clinical Pharmacology of a VH Domain Antibody Antagonist of TNF-[alpha] Receptor 1", JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 33, no. 7, 6 July 2013 (2013-07-06), pages 1192-1203, XP055111245, ISSN: 0271-9142, DOI: 10.1007/s10875-013-9915-0, abstract, pages 1201-1202

(57) Настоящее изобретение относится к молекулам, таким как ISVD и нанотела, которые связываются с PD1 и LAG-3 и необязательно с сывороточным альбумином человека. Эти молекулы были сконструированы таким образом, чтобы уменьшить возможность связывания с ранее существующими антителами в организме субъекта, которому вводят такую молекулу. Предложены способы повышения иммунного ответа, лечения рака и/или лечения инфекционного заболевания с использованием таких молекул.

Данная заявка претендует на приоритет по предварительной патентной заявке США № 62/257009, поданной 18 ноября 2015 года, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Список нуклеотидных/аминокислотных последовательностей в машиночитаемом формате полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Файл, содержащий список последовательностей, представляет собой текстовый файл ASCII с размером 199 кбайт, созданный 15 ноября 2016 под названием "24238WOPCTSEQ".

Область изобретения

Настоящее изобретение относится, в частности, к аминокислотным последовательностям, связывающимся с 1-м белком программированной смерти клеток ("PD1"), например, PD1 человека, и с 3-м геном активации лимфоцитов (LAG3). В частности, настоящее изобретение относится, частично, к усовершенствованным одиночным вариабельным доменам тяжелых цепей иммуноглобулинов (также называемым в настоящем документе "JSV" или "ISVD"), связывающимся с PD1 и LAG3, а также к полипептидам и другим соединениям, которые содержат такие ISVD. Другие аспекты, варианты осуществления, признаки, варианты применения и преимущества изобретения будут очевидны для квалифицированного специалиста на основе приведенного в настоящем документе описания изобретения.

Предпосылки создания изобретения

Рецептор программированной смерти 1 (PD-1) представляет собой иммуноингибирующий рецептор, который в основном экспрессируется на активированных Т- и В-клетках. Было показано, что его взаимодействие со своими лигандами ослабляет Т-клеточный ответ как *in vitro*, так и *in vivo*. Было показано, что ингибирование взаимодействия между PD-1 и одним из его лигандов, PD-L1, повышает опухолевый специфический CD8⁺ Т-клеточный иммунитет и, поэтому, может быть полезным для удаления опухолевых клеток PD-1 (кодированный геном *Pdcd1*) является членом иммуноглобулинового суперсемейства, родственным CD28 и CTLA-4. Было показано, что PD-1 отрицательно регулирует антиген-рецепторную передачу сигнала при взаимодействии со своими лигандами (PD-L1 и/или PD-L2). Была решена структура мышинового PD-1, а также структура сокристалла мышинового PD-1 с PD-L1 человека (Zhang, X. et al., *Immunity* 20: 337-347 (2004); Lin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 3011-6 (2008)). PD-1 и аналогичные представители семейства являются трансмембранными гликопротеинами I типа, содержащими иммуноглобулиновый домен вариабельного типа (V-типа), ответственный за связывание лиганда, и цитоплазматический хвост, который отвечает за связывание сигнальных молекул. Цитоплазматический хвост PD-1 содержит два тирозиновых сигнальных мотива, ITIM (иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив) и ITSM (иммунорецепторный тирозиновый переключающий мотив).

После стимуляции Т-клеток тирозинфосфатаза SHP-2 связывается с мотивом ITSM внутри цитоплазматического хвоста PD-1, что приводит к дефосфорилированию эффекторных молекул, таких как CD3-дзета, PKC-тета и ZAP70, которые участвуют в CD3-сигнальном каскаде Т-клеток. Механизм, с помощью которого PD-1 снижает Т-клеточный ответ, аналогичен, но неполностью, таковому у CTLA-4, поскольку обе молекулы регулируют перекрывающийся набор сигнальных белков (Patty et al., *Mol. Cell. Biol.* 25: 9543-9553 (2005)). Беннетт с коллегами показали, что опосредуемое PD-1 ингибирование Т-клеточного сигнала эффективно только тогда, когда сигналы активации и ингибирования находятся на одной и той же поверхности, что указывает на то, что механизм сигнала от PD-1 имеет пространственно-временное регулирование (Bennett F. et al., *J. Immunol.*, 170: 711-8 (2003)). Показано, что PD-1 экспрессируется на активированных лимфоцитах (периферических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, В-клетках и моноцитах), а также показано, что он экспрессируется при созревании в тимусе на CD4⁺CD8⁻ (двойных негативных) Т-клетках, а также на NK-Т-клетках.

Лиганды для PD-1 (PD-L1 и PD-L2) конститутивно экспрессируются или могут индуцироваться в различных типах клеток, включая негемопозитические ткани, а также в различных типах опухолей. PD-L1 экспрессируется на В-, Т-, миелоидных и дендритных клетках (DC), но также на периферических клетках, таких как клетки микрососудистого эндотелиаля и нелимфоидных органов, таких как сердце, легкое и т.д. Напротив, PD-L2 обнаруживается только на макрофагах и DC. Схема экспрессии лигандов PD-1 указывает на роль PD-1 в поддержании периферической толерантности и может служить для регулирования ауто Т- и В-клеточных ответов на периферии. Оба лиганда представляют собой трансмембранные рецепторы I типа, содержащие как IgV-, так и IgC-подобные домены во внеклеточной области. Оба лиганда содержат короткие цитоплазматические области без известных сигнальных мотивов.

Взаимодействие PD-1 со своими лигандами приводит к ингибированию пролиферации лимфоцитов *in vitro* и *in vivo*. Показано, что нарушение взаимодействия PD-1/PD-L1 увеличивает пролиферацию Т-клеток и производство цитокинов и блокирует развитие клеточного цикла. Первичный анализ мышей *Pdcd1*^{-/-} не выявил радикального иммунологического фенотипа. Однако у старых мышей возникали спонтанные аутоиммунные заболевания, которые различались в зависимости от линии мышей, с которой возвратно скрещивали мышей, дефицитных по *Pdcd1*. К ним относятся волчаноподобный пролиферативный артрит (C57BL/6) (Nishimura H. et al., *Int. Immunol.*, 10: 1563-1572 (1998)), фатальная кардиомиопатия (BALB/c) (Nishimura H. et al., *Science* 291: 319-322 (2001)) и диабет I типа (NOD) (Wang J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 102: 11823-11828 (2005)). В целом, анализ нокаутных животных привел к пониманию того, что PD-1 функционирует главным образом в индукции и регулировании периферической толе-

рантности. Таким образом, терапевтическая блокада пути PD-1 может быть полезной для преодоления иммунной толерантности. Такая избирательная блокада может быть полезна при лечении рака или инфекции, а также для повышения иммунитета при вакцинации (профилактической или терапевтической).

Роль PD-1 в раковых заболеваниях описана в литературе.

Известно, что микроокружение опухолей может защищать опухолевые клетки от эффективного разрушения иммунной системой. Недавно было показано, что PD-L1 экспрессируется на ряде опухолей у мышей и человека (и индуцируется ИФН-гамма в большинстве отрицательных по PD-L1 линий опухолевых клеток), и постулировано, что он опосредует уклонение от системы иммунного надзора (Iwai Y. et al., USA, 99: 12293-12297 (2002), Strome S.E. et al., Cancer Res., 63: 6501-6505 (2003)).

У человека экспрессия PD-1 (на инфильтрующихся в опухоль лимфоцитах) и/или PD-L1 (на опухолевых клетках) была обнаружена в ряде биопсий первичных опухолей, которую определяли с помощью иммуногистохимии. Такие ткани включают рак легких, печени, яичника, шейки матки, кожи, толстой кишки, глиому, рак мочевого пузыря, молочной железы, почек, пищевода, желудка, полости рта, уротелиальных клеток и поджелудочной железы, а также опухоли головы и шеи (Brown J. A. et al., J. Immunol. 170: 1257-1266 (2003); Dong H. et al., Nat. Med. 8: 793-800 (2002); Wintterle et al., Cancer Res. 63: 7462-7467 (2003); Strome S. E. et al., Cancer Res., 63: 6501-6505 (2003); Thompson R. H. et al., Cancer Res. 66: 3381-5 (2006); Thompson et al., Clin. Cancer Res. 13: 1757-61 (2007); Nomi T. et al., Clin. Cancer Res. 13: 2151-7.

(2007)). Более важно, что экспрессия PD-лиганда на опухолевых клетках коррелирует с плохим прогнозом у раковых пациентов, имеющих различные типы опухолей (обзор в Okazaki и Honjo, Int. Immunol., 19: 813-824 (2007)).

Блокада взаимодействия PD-1/PD-L1 может приводить к усилению опухолеспецифичного Т-клеточного иммунного ответа и, следовательно, может быть полезна для удаления опухолевых клеток иммунной системой. Для решения этой проблемы был проведен ряд исследований. В мышинной модели агрессивного рака поджелудочной железы Т. Номи и др. (Clin. Cancer Res., 13: 2151-2157 (2007)) продемонстрировали терапевтическую эффективность блокады PD-1/PD-L1. Введение антитела к любому из PD-1 или PD-L1 значительно ингибировало рост опухоли. Ингибирование антителами эффективно усиливало инфильтрацию опухолеспецифичных CD8⁺ Т-клеток в опухоль, что приводило к повышению синтеза противоопухолевых эффекторов, включая ИФН-гамма, гранзим В и перфорин. Кроме того, авторы показали, что блокада PD-1 может эффективно сочетаться с химиотерапией, давая синергетический эффект. В другом исследовании с использованием модели сквамозноклеточной карциномы у мышей блокада антителами к PD-1 или PD-L1 значительно ингибировала рост опухолей (Tsushima F. et al., Oral Oncol., 42: 268-274 (2006)).

В других исследованиях трансфекция линии мышинной мастоцитомы с PD-L1 приводила к уменьшению лизиса опухолевых клеток при совместном культивировании с опухолеспецифическим CTL-клоном. Лизис восстанавливался добавлением МАТ к PD-L1 (Iwai Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 12293-12297 (2002)). Показано, что блокирование взаимодействия PD1/PD-L1 *in vivo* повышает эффективность терапии адоптивным переносом Т-клеток в опухолевой модели мыши (Strom S. E. et al., Cancer Res., 63: 6501-6505 (2003)). Еще одно доказательство роли PD-1 в лечении рака исходит из экспериментов, проведенных с мышами, нокаутными по PD-1. Клетки миеломы, экспрессирующие PD-L1, росли только у животных дикого типа (приводя к росту опухолей и связанной с этим смерти животных), но не у мышей, дефицитных по PD-1 (Iwai Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 12293-12297 (2002)).

В исследованиях на человеке Р.М. Вонг и др. (Int. Immunol., 19: 1223-1234 (2007)) показали, что блокада PD-1 с использованием полностью человеческого анти-PD-1 антитела увеличивала абсолютное число опухолеспецифичных CD8⁺ Т-клеток (CTL) в *ex vivo* анализах стимуляции с использованием вакцинных антигенов и клеток от вакцинированных лиц. В аналогичном исследовании блокирование PD-L1 антителами приводило к усилению цитолитической активности опухоли-ассоциированных антигенспецифичных цитотоксических Т-клеток и к увеличению продукции цитокинов опухолеспецифичными Т_H-клетками (Blank C. et al., Int. J. Cancer 119: 317-327 (2006)). Те же авторы показали, что блокада PD-L1 усиливает ответы опухолеспецифичных Т-клеток *in vitro* при использовании в комбинации с блокадой CTLA-4.

В целом, путь PD-1/PD-L1 является хорошо проверенной мишенью для разработки терапевтических средств для лечения рака. Антитела против PD-1 также могут быть полезны при хронической вирусной инфекции. CD8⁺ Т-клетки памяти, образующиеся после острой вирусной инфекции, являются высокофункциональными и составляют важный компонент защитного иммунитета. Напротив, хронические инфекции часто характеризуются различной степенью функционального нарушения (истощения) вирусспецифичных Т-клеточных ответов, и этот дефект является основной причиной неспособности хозяина устранить персистирующий патоген. Хотя функциональные эффекторные Т-клетки первично генерируются на ранних стадиях инфекции, они постепенно теряют свою функциональность при хронической инфекции. Барбер с соавт. (Barber et al., Nature 439: 682-687 (2006)) показали, что у мышей, инфицированных лабораторным штаммом LCMV, развивалась хроническая инфекция, приводящая к высоким уровням вируса в крови и других тканях. У этих мышей первоначально вырабатывался сильный Т-

клеточный ответ, но в конце концов у них развивалась инфекция при истощении Т-клеток. Авторы обнаружили, что снижение количества и ослабление функций эффекторных Т-клеток у хронически инфицированных мышей может быть оставновлено путем инъекции антител, которые блокируют взаимодействие между PD-1 и PD-L1.

Недавно было показано, что PD-1 экспрессируется на высоком уровне на Т-клетках у ВИЧ-инфицированных индивидуумов, и что экспрессия рецептора коррелирует с нарушенной функцией Т-клеток и развитием заболевания (Day et al., *Nature* 443: 350-4 (2006); Trautmann L. et al., *Nat. Med.* 12: 1198-202 (2006)). В обоих исследованиях блокада лиганда PD-L1 значительно увеличивала экспансию ВИЧ-специфичных продуцирующих IFN-гамма клеток *in vitro*.

В других исследованиях также была показана важность пути PD-1 в борьбе с вирусной инфекцией. Мышцы с нокаутом PD-1 были способны лучше контролировать аденовирусную инфекцию, чем мыши дикого типа (Iwai et al., *J. Exp., Med.*, 198: 39-50 (2003)). Кроме того, адоптивный перенос HBV-специфичных Т-клеток в HBV-трансгенных животных вызывал гепатит (Isogawa M. et al., *Immunity* 23: 53-63 (2005)). Течение заболевания у этих животных осциллирует как следствие распознавания антигена в печени и повышения уровня PD-1 в клетках печени.

Кроме того, LAG3 (CD223) представляет собой молекулу клеточной поверхности, экспрессирующуюся на активированных Т-клетках (Huard et al. *Immunogenetics* 39: 213-217, 1994), NK-клетках (Triebel et al. *J Exp Med* 171: 1393-1405, 1990), В-клетках (Kisielow et al. *Eur J Immunol* 35: 2081-2088, 2005) и плазматоидных дендритных клетках (W или kman et al. *J Immunol* 182: 188 5-1891, 2009), которые играют важную роль в функционировании этих субпопуляций лимфоцитов. Кроме того, считается, что взаимодействие между LAG3 и его основным лигандом, МНС II класса, играет роль в модулировании функции дендритных клеток (Andreae et al. *J Immunol* 168: 3874-3880, 2002). Недавние доклинические исследования подтвердили роль LAG-3 в истощении Т-клеток CD8 (Blackburn et al. *Nat Immunol* 10: 29-37, 2009).

Как и при хронической вирусной инфекции, у специфичных к опухолевым антигенам CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток наблюдается нарушенная эффекторная функция и истощенный фенотип, характеризующийся снижением продукции провоспалительных цитокинов и сниженным ответом на повторную антигенную стимуляцию. Этот процесс опосредован внешними механизмами воздействия на клетку, например, регуляторными Т-клетками (Treg), и внутриклеточными механизмами, например, ингибирующими молекулами, синтез которых повышается на истощенных, инфильтрующихся в опухоль лимфоцитах (TIL). Эти ингибирующие механизмы являются серьезным препятствием для эффективного противоопухолевого иммунного ответа.

LAG-экспрессируется на толерантных TIL, что указывает на то, что они усиливают опосредуемую опухолью иммуносупрессию. Ингибирование LAG3 может привести к усиленной активации антигенспецифических Т-клеток, благодаря которой можно получить терапевтический эффект.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к связывающей PD1 молекуле (например, одиночному вариабельному домену иммуноглобулина (ISVD) или нанотелу, которые связываются с PD1 (например, PD1 человека)), содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или 2, но которая содержит мутации в одной или нескольких позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и 112, где указанные позиции нумеруются по системе Кабата (например, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L и, необязательно, E1D, или L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100a и, необязательно, E1D), содержащей CDR1, которая содержит аминокислотную последовательность: IHAMG (SEQ ID NO: 3) или GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6), CDR2, которая содержит аминокислотную последовательность: VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4; где X представляет собой W или V) или VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7; где X представляет собой W или V), и CDR3, которая содержит аминокислотную последовательность: DKNQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, где X представляет собой F или W) или DKNQSSXYDY (SEQ ID NO: 8, где X представляет собой W или V). В варианте осуществления изобретения связывающая PD1 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) содержит аминокислотный остаток в позиции 11, который выбран из L или V, аминокислотный остаток в позиции 89, выбранный из T, V или L, аминокислотный остаток в позиции 110, выбранный из T, K или Q, и/или аминокислотный остаток в позиции 112, выбранный из S, K или Q. В варианте осуществления изобретения связывающая PD1 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) содержит одну или несколько описанных мутаций, являющихся представителем, выбранным из группы, состоящей из: 89T; 89L в сочетании с 11V; 89L в сочетании с 110K или 110Q; 89L в сочетании с 112K или 112Q; 8 9L в сочетании с 11V и 110K или 110Q; 89L в сочетании с 11V и 112K или 112Q; 11V в сочетании с 110K или 110Q; 11V в сочетании с 112K или 112Q. В варианте осуществления изобретения аминокислоты в позициях 11, 89, 110 и 112 являются любыми из тех, которые указаны в табл. В в настоящем документе. В одном варианте осуществления изобретения связывающая PD1 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) содержит одну или несколько мутаций в позиции, выбранной из группы, состоящей из 1, 14, 41, 74, 83, 87 и 108, и/или одну или несколько гуманизирующих замен, известных ранее (для которых дана ссылка на прототип, указанный в настоящем документе, такой как WO 08/020079 или WO 09/138519). В варианте осуществления изобретения связывающая PD1

молекула (например, ISVD, такой как нанотело) включает удлинение С-конца на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. Например, в варианте осуществления изобретения связывающая PD1 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) содержит удлинение С-конца в соответствии с формулой $-X(n)$, где X и n являются следующими: (a) $n=1$ и $X=Ala$; (b) $n=2$ и каждый $X=Ala$; (c) $n=3$ и каждый $X=Ala$; (d) $n=2$ и по меньшей мере, один $X=Ala$, и где оставшийся аминокислотный остаток (остальные остатки) X независимо выбирают из любой природной аминокислоты;

(e) $n=3$ и по меньшей мере один $X=Ala$, и где оставшийся аминокислотный остаток (остальные остатки) X независимо выбирают из любой природной аминокислоты; (f) $n=3$ и по меньшей мере два $X=Ala$, и где оставшийся аминокислотный остаток (остальные остатки) X независимо выбирают из любой природной аминокислоты;

(g) $n=1$ и $X=Gly$; (h) $n=2$ и каждый $X=Gly$; (i) $n=3$ и каждый $X=Gly$;

(j) $n=2$ и по меньшей мере один $X=Gly$, где оставшийся аминокислотный остаток (остальные остатки) X независимо выбирают из любой природной аминокислоты; (k) $n=3$ и по меньшей мере один $X=Gly$, где оставшийся аминокислотный остаток (остальные остатки) X независимо выбирают из любой природной аминокислоты; (l) $n=3$ и по меньшей мере два $X=Gly$, где оставшийся аминокислотный остаток (остальные остатки) X независимо выбирают из любой природной аминокислоты; (m) $n=2$ и каждый $X=Ala$ или Gly ; (n) $n=3$ и каждый $X=Ala$ или Gly ; (o) $n=3$ и по меньшей мере один $X=Ala$ или Gly , где оставшийся аминокислотный остаток (остальные остатки) X независимо выбирают из любой природной аминокислоты; или (p) $n=3$ и по меньшей мере два $X=Ala$ или Gly , где оставшийся аминокислотный остаток (остальные остатки) X независимо выбирают из любой природной аминокислоты, например A, AA, AAA, G, GG, GGG, AG, GA, AAG, AGG, AGA, GGA, GAA или GAG. Настоящее изобретение также относится к связывающей PD1 молекуле (например, ISVD, такому как нанотело), содержащей одну или несколько мутаций в позициях 11, 89, 110 и 112 и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% (например, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9 или 100%) идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью, приведенной в представителе, выбранном из группы SEQ ID NO: 9-40 (в которых любое удлинение С-конца, которое может присутствовать, а также любые CDR, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей). Настоящее изобретение также относится к полиспецифичному иммуноглобулину, содержащему связывающий PD1 фрагмент (например, ISVD, такому как нанотело), который связывается с PD1, соединенному с одной или несколькими молекулами, которые связывают эпитоп, не являющийся эпитопом, с которым связывается связывающий PD1 фрагмент (например, PD1, CTLA4, LAG3, BTLA и/или CD27), например, содержащему связывающий PD1 фрагмент и связывающий CTLA4 фрагмент; связывающий PD1 фрагмент и связывающий BTLA фрагмент; связывающий PD1 фрагмент и связывающий LAG3 фрагмент; или связывающий PD1 фрагмент, связывающий LAG3 фрагмент и связывающий BTLA фрагмент, необязательно, соединенные через один или несколько линкеров, например пептидных линкеров. В одном варианте осуществления изобретения полиспецифичный иммуноглобулин содержит первое PD1-нанотело, связанное с одной или несколькими молекулами, выбранными из группы, состоящей из CTLA4-нанотела, LAG3-нанотела, BTLA-нанотела, CD27-нанотела и PD1-нанотела, которое связывается с таким же или другим эпитопом, что и первое PD1-нанотело; например, содержит связывающий PD1 фрагмент и связывающий CTLA4 фрагмент; связывающий PD1 фрагмент и связывающий BTLA фрагмент; связывающий PD1 фрагмент и связывающий LAG3 фрагмент; или связывающий PD1 фрагмент, связывающий LAG3 фрагмент и связывающий BTLA фрагмент.

Настоящее изобретение включает полипептид, ISVD или нанотело, содержащие аминокислотную последовательность, которая описана в настоящем документе, например, которая выбрана из SEQ ID NO: 9-40.

Настоящее изобретение также относится к связывающей PD1 молекуле по настоящему изобретению (например, одиночному варибельному домену иммуноглобулина (ISVD) или полиспецифичному ISVD, такому как нанотело) в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом.

В настоящем изобретении предложены инъекционные устройства и сосуды, содержащие связывающую PD1 молекулу (например, одиночный варибельный домен иммуноглобулина (ISVD) или полиспецифичный ISVD, такой как нанотело), необязательно, в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом.

Настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему связывающую PD1 молекулу (например, одиночный варибельный домен иммуноглобулина (ISVD) или полиспецифичный ISVD, такой как нанотело), или к вектору, содержащему полинуклеотид, или к клетке-хозяину, содержащей полинуклеотид или вектор.

Настоящее изобретение относится к способу получения связывающей PD1 молекулы (например, одиночного варибельного домена иммуноглобулина (ISVD) или полиспецифичного ISVD, такого как нанотело), включающему введение полинуклеотида, кодирующего иммуноглобулина в клетку-хозяина, и культивирование клетки-хозяина в среде в условиях, благоприятных для экспрессии указанного иммуноглобулина с указанного полинуклеотида и, необязательно, очистку иммуноглобулина из указанной клетки-хозяина и/или указанной среды. Связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нано-

тела), полученные такими способами, являются частью настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также относится к способу предупреждения связывания PD1 с PD-L1 и/или PD-L2, включающему контактирование указанного PD1 со связывающей PD1 молекулой (например, с одиночным вариабельным доменом иммуноглобулина (ISVD) или полиспецифичным ISVD, таким как нанотело), необязательно, в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом.

Настоящее изобретение также относится к способу усиления иммунного ответа в организме субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества связывающей PD1 молекулы по настоящему изобретению (например, одиночного вариабельного домена иммуноглобулина (ISVD) или полиспецифичного ISVD, такого как нанотело), необязательно, в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом. Кроме того, настоящее изобретение также относится к способу лечения или профилактики рака (например, метастатического рака, солидной опухоли, гематологического рака, лейкемии, лимфомы, остеосаркомы, рабдомиосаркомы, нейробластомы, рака почки, лейкемии, переходноклеточного рака мочевого пузыря, рака мочевого пузыря, опухоли Вильма, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака кости, рака легких, немелкоклеточного рака легкого, рака желудка, колоректального рака, рака шейки матки, синовиальной саркомы, рака головы и шеи, сквамозноклеточной карциномы, множественной миеломы, почечно-клеточного рака, ретинобластомы, гепатобластомы, гепатоцеллюлярной карциномы, меланомы, рабдоидной опухоли почки, саркомы Юинга, хондросаркомы, рака мозга, глиобластомы, менингиомы, аденомы гипофиза, вестибулярной шванномы, примитивной неирозктодермальной опухоли, медуллобластомы, астроцитомы, анапластической астроцитомы, олигодендроглиомы, эпендимомы, папилломы сосудистого сплетения, истинной полицитемии, тромбоцитемии, идиопатического миелофиброза, саркомы мягких тканей, рака щитовидной железы, рака эндометрия, карциноидного рака или рака печени, рака молочной железы или рака желудка) или инфекционного заболевания (бактериальной инфекции, вирусной инфекции или грибковой инфекции) в организме субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества связывающей PD1 молекулы (например, одиночного вариабельного домена иммуноглобулина (ISVD) или полиспецифичного ISVD, такого как нанотело), необязательно, в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом. В варианте осуществления изобретения субъекту также назначают дополнительный терапевтический агент или дополнительную терапевтическую процедуру в сочетании с связывающей PD1 молекулой.

В настоящем изобретении предложены связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела), которые связываются с PD1, содержащие: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность IHAMG (SEQ ID NO: 3) или GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6), CDR2, содержащую аминокислотную последовательность VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4, где X представляет собой W или V) или VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7, где X представляет собой W или V), и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность DKNQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, где X представляет собой W или F), которые содержат одну или несколько мутаций в позиции 11 (например, L11V) и 89 (например, I89L) или одну или несколько мутаций, выбранных из E1D, L11V, A14P, W52aV, N73 (Q, P или S), A74S, K83R, I89L, W100aF относительно SEQ ID NO: 1 или 2. В варианте осуществления изобретения мутациями являются E1D, L11V, A14P, K83R и I89L, или L11V, A14P, K83R и I89L. В варианте осуществления изобретения мутациями являются E1D, L11V, A14P, W52aV, N73(Q, P или S), A74S, K83R, I89L, W100aF или L11V, A14P, W52aV, N73(Q, P или S), A74S, K83R, I89L, W100aF. В варианте осуществления изобретения связывающая PD1 молекула содержит аминокислотную последовательность: DVQLVESGGG WQPGGSLRL SCAASGSIAS IHAMGWFRQA PGKEREFVAV ITWSGGITYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVY LQMNSLRPED TALYYCAGDK HQSSWYDYWG QGTLTVTVSS (SEQ ID NO: 57).

Настоящее изобретение также относится к связывающим LAG3 молекулам, которые связываются с LAG3, содержащим CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GRTFSDYVMG (SEQ ID NO: 65), CDR2, содержащую аминокислотную последовательность AISESGGRTH (SEQ ID NO: 66), и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность TLLWWTSEYAPIKMYDY (SEQ ID NO: 67), например, содержащим аминокислотную последовательность: EVQLVE SGGGWQPGG SLRLSCAASG RTFSDYVMGW FRQAPGKERE FVAISESGG RTHYADSVKG RFTISRDN SK NTLYLQMN SL RPED-TALYYC ATTLLWWTSE YAPIKMYD YWGQGTLTVTV SS (SEQ ID NO: 64).

Связывающие PD1 и LAG3 молекулы могут представлять собой одну молекулу, такую как связывающую PD1/LAG3 молекулу, которая является частью настоящего изобретения, которая связывается с PD1 и LAG3 и содержит: связывающий PD1 фрагмент, содержащий: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность IHAMG (SEQ ID NO: 3) или GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6), CDR2, содержащую аминокислотную последовательность VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4, где X представляет собой W или V) или VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7, где X представляет собой W или V), и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность DKNQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, где X представляет собой W или F); и связывающий LAG3 фрагмент, содержащий: CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GRTFSDYVMG (SEQ ID NO: 65), CDR2, содержащую аминокислотную последовательность AISESGGRTH (SEQ ID NO: 66), и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность TLLWWTSEYAPIKMYDY (SEQ ID NO: 67), и, необязательно, увеличивающий период полувыведения фрагмент, например, где связывающая PD1 молекула содержит аминокислотную последовательность

DVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGSIAS IHAMGWFRQA PGKEREVAV ITWSGGITYY
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTVY LQMNSLRPED TALYYCAGDKHQSSWYDYWG QGTLVTVSS (SEQ ID
 NO: 57); и связывающая LAG3 молекула содержит аминокислотную последовательность

EVQLVE SGGGVVQPGG SLRLSCAASG RTFSDYVMGW FRQAPGKERE FVA AISESGG
RTHYADSVKG RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RPEDTALYYC ATLLWWTSE YAPIKMYD
YWGQGTLLTV SS (SEQ ID NO: 64); и, необязательно, увеличивающий период полувыведения фраг-
мент. Например, в варианте осуществления изобретения связывающая PD1/LAG3 молекула содержит
фрагменты, например, в указанном порядке:

связывающая PD1 молекула 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) или 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73X (например, N73P или N73Q или N73S), A74S, K83R, I89L, W100aF);

пептидный линкер, такой как 9GS, 20GS или 35GS

(например, GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 70));

связывающая LAG3 молекула 11B09 или 11B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L);

пептидный линкер, такой как 9GS, 20GS или 35GS

(например, GGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGS (SEQ ID NO: 70));

увеличивающий период полувыведения фрагмент, такой как ALB11002; и, необязательно,

удлинение С-конца, такое как аланин:

или

связывающая PD1 молекула 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) или 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73X (например, N73P или N73Q или N73S), A74S, K83R, I89L, W100aF);

пептидный линкер, такой как 9GS, 20GS или 35GS

(например, GGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGS (SEQ ID NO: 70));

связывающая PD1 молекула 102C12 (L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) или 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73X (например, N73P или N73Q или N73S), A74S, K83R, I89L, W100aF);

пептидный линкер, такой как 9GS, 20GS или 35 GS

(например, GGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGS (SEQ ID NO: 70));

связывающая LAG3 молекула 11B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L);

пептидный линкер, такой как 9GS, 20GS или 35 GS

(например, GGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGS (SEQ ID NO: 70));

связывающая LAG3 молекула 11B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L);

пептидный линкер, такой как 9GS, 20GS или 35 GS

(например, GGGGSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGS (SEQ ID NO: 70));

увеличивающий период полувыведения фрагмент, такой как ALB11002; и, необязательно, удлинение С-конца, такое как аланин.

Увеличивающий период полувыведения фрагмент в варианте осуществления изобретения представляет собой связывающую альбумин сыворотки человека (HSA) молекулу, такую как ALB11002. В варианте осуществления изобретения связывающая HSA молекула содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GFTFSSFGMS (SEQ ID NO: 60), CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SISGSGSDTL (SEQ ID NO: 61), и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность GGSLSR (SEQ ID NO: 62), например, содержит аминокислотную последовательность EVQLVESGGG WQPGNSRLR SCAASGFTFS SFGMSWVRQA PGKGLEWVSS ISGSGSDTL YADSVKGRFTI SRD NAKTTLY LQMNSLRPED TALYYCTIGG SLRSSQGT L VTVSSA (SEQ ID NO: 59). Такие увеличивающие период полувыведения фрагменты сами по себе являются частью настоящего изобретения.

В варианте осуществления изобретения связывающая PD1 молекула, связывающая LAG3 молекула, связывающая HSA молекула и/или связывающая PD1/LAG3 молекула находятся в устройстве или сосуде для инъекций, необязательно, в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом. Такие устройство или сосуд являются частью настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, кодирующему любую из описанных в настоящем документе связывающих молекул, а также к любому вектору (например, плазмидному вектору), содержащему полинуклеотид, а также к любой клетке-хозяину (например, клетке CHO или клетке грибов, таких как *Pichia*, например *P. past* или *is*), включающей полинуклеотид или вектор, например, эктопический или интегрированный в одну или несколько хромосом клеток-хозяев.

Настоящее изобретение также относится к способу получения любой из описанных здесь связывающих молекул, включающему введение полинуклеотида, кодирующего связывающую молекулу, в клетку-хозяина (например, в клетку СНО или клетку грибов, таких как *Pichia*, например *P. pastoris*) и культивирование клетки-хозяина в среде в условиях, благоприятных для экспрессии указанной связывающей молекулы с указанного полинуклеотида, и, необязательно, очистку связывающей молекулы из указанной клетки-хозяина и/или указанной среды. Необязательно, вектор или полинуклеотид встроены в одну или несколько хромосом клеток-хозяев. Любая связывающая молекула, полученная таким способом, также является частью настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также относится к способу предупреждения связывания PD1 с PD-L1 и/или

PD-L2 или для ингибирования любой активности PD1, например, как описано в настоящем документе, включающему контактирование указанного PD1 со связывающей PD1 молекулой по настоящему изобретению (например, связывающей PD1/LAG3 молекулой), необязательно, в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом. Настоящее изобретение также относится к способу предупреждения связывания LAG3 с MHC класса II или для ингибирования любой активности PD1, например, как описано в настоящем документе, включающему контактирование указанного LAG3 со связывающей LAG3 молекулой по настоящему изобретению (например, связывающей PD1/LAG3 молекулой), необязательно, в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом. Настоящее изобретение также относится к способу усиления иммунного ответа в организме субъекта (например, человека), включающему введение субъекту эффективного количества связывающей молекулы по настоящему изобретению (например, связывающей PD1/LAG3 молекулы), необязательно, в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом. Настоящее изобретение также относится к способу лечения или профилактики рака (например, метастатического рака, солидной опухоли или гематологического рака) или инфекционного заболевания (например, бактериальной инфекции, вирусной инфекции или грибковой инфекции) в организме субъекта (например, человека), включающему введение субъекту эффективного количества связывающей молекулы по настоящему изобретению (например, связывающей PD1/LAG3 молекулы), необязательно, в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом. При введении субъекту связывающую PD1 и/или LAG3 молекулу по настоящему изобретению (например, связывающую PD1/LAG3 молекулу), необязательно, вводят в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом или терапевтической процедурой, например хирургическим удалением опухоли.

Описание фигур

Фиг. 1. Таблица, в которой перечислены некоторые аминокислотные позиции, которые указываются в данном документе, и их нумерация в соответствии с некоторыми альтернативными системами нумерации (такими как Aho и IMGT).

Фиг. 2 (1-5). Последовательности связывающих PD1 молекул.

Фиг. 3 (A, B). Выравнивание последовательности 102C12 с SEQ ID NO: 9-40 (см. WO 2008/071447, SEQ ID NO: 348).

Фиг. 4. Преобладающие N-связанные гликаны в моноклональных антителах, продуцируемых клетками яичника китайского хомячка (N-связанные гликаны клеток CHO) и генно-модифицированными дрожжевыми клетками (N-связанные гликаны генно-модифицированных дрожжей): квадраты: N-ацетилглюкозамин (GlcNAc); круги: манноза (Man); ромбы: галактоза (Gal); треугольники: фукоза (Fuc).

Фиг. 5. Моновалентное связывание клеток CHO-K1, экспрессирующих PD1 человека, молекулами F023700275 (1PD102C12(A14P,A74S,K83R)-FLAG3-HIS6) или F023700706 (1PD102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-FLAG3-HIS6). GAM=козьи антимышинные вторичные антитела, используемые для обнаружения мышиных антител, которые связываются с эпитопом FLAG; α-FLAG+GAM=козье антимышиное вторичное антитело, используемое совместно с мышиным антителом, которое связывается с эпитопом FLAG, находящимся на C-конце конструкции.

Фиг. 6. Моновалентное связывание клеток 3A9, экспрессирующих LAG3 человека, молекулами

F0237611B09-FLAG-His6 или F023700842

(F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-FLAG3-HIS6).

Фиг. 7 (A, B). Связывание (A) клеток CHO, экспрессирующих PD-1 человека, молекулами F023700931, F023700924, F023700933 или F023700962; или (B) клеток 3A9, экспрессирующих PD-1 макака-резуса, молекулами F023700931 (экспрессируемыми клетками Pichia или CHO), F023700924 (экспрессируемыми клетками Pichia или CHO), F023700933, F023700962, F023700678 (1PD102C12 (A14P, A74S, K83R) -35GS-ALB11002) или F023701127. ABH0074+GAM=козье антимышиное антитело, используемое совместно с мышиным антителом ABH0074, которое связывается с каркасами нанотел.

Фиг. 8 (A, B). Связывание (A) клеток CHO, экспрессирующих LAG3 человека, молекулами F023700931, F023700924 или F023700962; или (B) клеток 3A9, экспрессирующих LAG3 макака-резуса, молекулами F023700931 (экспрессируемыми клетками Pichia или CHO), F023700924 (экспрессируемыми клетками Pichia или CHO), F023700933 или F023700962.

Фиг. 9 (A-H). Блокирование связывания между (A) PD-L1-Fc человека и клетками CHO-K1, экспрессирующими PD1 человека, молекулами F023700275 или F023700706; (B) между PD-L2-Fc человека и клетками CHO-K1, экспрессирующими PD1 человека, молекулами F023700275 или F023700706; (C) между PD-L1-Fc человека и клетками CHO-K1, экспрессирующими PD1 человека, молекулами F023700931 (экспрессируемыми клетками Pichia или CHO), F023700924 (экспрессируемыми клетками Pichia или CHO), F023700933 или F023700962; (D) между PD-L2-Fc человека и клетками CHO-K1, экспрессирующими PD1 человека, молекулами F023700931 (экспрессируемыми клетками Pichia или CHO), F023700924 (экспрессируемыми клетками Pichia или CHO), F023700933 или F023700962; (E) между PD-L1-Fc человека и клетками CHO-K1, экспрессирующими PD1 человека, молекулами F023700931, F023700924, F023700933 или F023700962; (F) между PD-L2-Fc человека и клетками CHO-K1, экспрессирующими PD1 человека, молекулами F023700931, F023700924, F023700933 или F023700962; (G) между PD-L1-Fc человека и клетками CHO-K1, экспрессирующими PD1 человека, молекулами

F023700929 (1PD102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-HIS6),
 F023701190 (1PD102C12(E1D,L11V,A14P,W52aV,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6),
 F023701192 (1PD102C12(E1D,L11V,A14P,W52aV,N73Q,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6) или
 F023701193 (1PD102C12(E1D,L11V,A14P,W52aV,N73P,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6);
 (H) между PD-L2-Fc человека и клетками CHO-K1, экспрессирующими PD1 человека, молекулами
 F023700929 (1PD102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-HIS6),
 F023701190 (1PD102C12(E1D,L11V,A14P,W52aV,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6),
 F023701192 (1PD102C12(E1D,L11V,A14P,W52aV,N73Q,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6) или
 F023701193 (1PD102C12(E1D,L11V,A14P,W52aV,N73P,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6).

US=окрашенный; hPD-L1 EC30=интенсивность окрашивания hPD-L1-Fc, которая была оттитрована, чтобы дать 30% от максимальной интенсивности окрашивания, которая может быть получена; GAN=KO3be вторичное антитело к антителу человека, используемое для обнаружения Fc-участка анти-тела человека из hPD-L1-Fc.

Фиг. 10 (A-C). Блокирование связывания LAG3-FC человека с клетками Daudi молекулами (A) F0237611B09-FLAG3-HIS6, F023700842-FLAG3-HIS6 или LAG3-FC человека; (B) F023700931 (экспрессируемыми клетками Pichia или CHO), F023700924 (экспрессируемыми клетками Pichia или CHO), F023700933 или F023700962, LAG3-Fc человека; или (C) F023700924, F023700931 или F023700962 или LAG3-FC человека. Sec only=только вторичное антитело (GAN/GAM).

Фиг. 11 (A, B). Анализ близкого расположения (система анализа дополняющих фрагментов фермента бета-галактозидазы): с (A) F023700931; F023701016, F023701017, контрольным нанотелом (IRR00085, молекула, связывающая респираторный синцитиальный вирус (RSV)), F023700933 или F023700962; или с (B) F023700924; F023700969, F023700970, контрольным нанотелом, F023700933 или F023700962.

Фиг. 12 (A-E). Активация Т-клеток Jurkat (экспрессия люциферазы, функционально связанной с промотором IL2) в присутствии HSA с помощью (A) F023700706 или контрольного нанотела (IRR00043, два анти-лизоцимных нанотела, соединенных 3563-линкером, с С-концевым FLAG3-His6), (B) F023700931 (экспрессируемых клетками Pichia или CHO), F023700924 (экспрессируемых клетками Pichia или CHO), F023700933, F023700962 или контрольного нанотела (IRR00085 или IRR00087, RSV-связывающая молекула), (C) F023700924 F023700969, F023700970 или контрольного нанотела (IRR00043), (D) F023700931, F023701016, F023701017 или контрольного нанотела (IRR00043), или (E) F023700706, F023701192 (1PD102C12(E1D,L11V,A14P,W52aV,N73Q, A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6 или F023701193 (1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,W52aV, N73P,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6 или контрольного нанотела (IRR00088; RSV-связывающая молекула).

Фиг. 13 (A-R). Активация моноцитов периферической крови человека (продукция IL2) от доноров (A) 91, (B) 985, (C) 907, (D) 91, (E) 985, (F) 907, (G) 91 (с 10 нМ SEB), (H) 985 (с 10 нМ SEB), (I) 907 (с 10 нМ SEB), (J) 91 (с 25 нМ SEB), (K) 985 (с 25 нМ SEB), (L) 907 (с 25 нМ SEB) с использованием F023700931 (экспрессируемых клетками Pichia или CHO), F023700924 (экспрессируемых клетками Pichia или CHO), F023700933, F023700962 или контрольного нанотела; или от доноров (M) 91, (N) 985, (O) 907 с использованием F023700931, F023700924 или контрольного нанотела; или от доноров (P) 91, (Q) 985 или (R) 907 с использованием F023700924, F023700969, F023700970.

Фиг. 14 (A-F). Анализ с использованием смешанной популяции лимфоцитов с CD4 Т-клетками и дендритными клетками от различных доноров, с помощью которого определяют (A-C) продукцию интерферона-гамма при различных концентрациях нанотела F023700931 (экспрессируемого клетками Pichia или CHO), F023700924 (экспрессируемого клетками Pichia или CHO) или F023700933 или контрольного антитела; (D-F) продукцию интерферона-гамма при различных концентрациях нанотела F023700924, F023700969, F023700970, F023700931 F023701016 или F023701017, или контрольного нанотела.

Фиг. 15 (A-D). Анализ активации Т-клеток 3A9, экспрессирующих LAG3 человека, в присутствии HSA и в присутствии. (A) F023700656 (11B09 (E1D)), F023700842 или контрольного IgG4; (B) F023700931 (экспрессируемого клетками Pichia или CHO), F023700924 (экспрессируемого клетками Pichia или CHO), F023700933 или F023700962, или контрольного нанотела (IRR00085 или IRR00087, RSV-связывающих молекул); (C) F023700924, F023700969, F023700970 или контрольного нанотела; (D) F023700931, F023701016 или F023701017, или контрольного нанотела.

Фиг. 16 (A, B). Активация Т-клеток Jurkat, экспрессирующих LAG3 человека и PD1 человека, и антиген-представляющих клеток Raji в присутствии (A) F023700931 (экспрессируемого клетками Pichia или CHO), F023700924 (экспрессируемого клетками Pichia или CHO), F023700933 или F023700862 (оно должно быть F023700892) или контрольного нанотела; или (B) F023700924, F023700969, F023700970, F023700931, F023701016, F023701017, F023700933 или F023700962, или контрольного нанотела.

Фиг. 17 (A-C). Активация клона Т-клеток человека (продукция интерферона-гамма) в присутствии клеток JY, экспрессирующих PDL1 человека, в присутствии варьирующих концентраций (A) F023700931 (экспрессируемого клетками Pichia или CHO), F023700924 (экспрессируемого клетками Pichia или CHO), F023700933 или F023700962, или контрольного нанотела; (B) F023700924, F023700969, F023700970, F023700933 или F023700962, или контрольного нанотела; или (C) F023700931, F023701016, F023701017, F023700933 или F023700962, или контрольного нанотела.

Фиг. 18 (A-P). Последовательности по настоящему изобретению.

Фиг. 19 (A-I). Реактивность сывороточных ранее существующих антител (preAb) в отношении F023700924 и F023700931 и тривалентного контрольного нанотела T013700112 (в котором отсутствуют мутации для снижения связывания уже существующих антител) в сыворотке здоровых людей (A) через 125 с и (B) 360 с; в сыворотке больных раком людей через (C) 125 с или (D) 360 с; или в сыворотке пациентов, страдающих (E) меланомой, (F) немелкоклеточным раком легкого (NSCLC), (G) раком головы и шеи, (H) раком желудка или (I) колоректальным раком.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к ISVD, которые содержат мутации, блокирующие реактивность ранее существующих антител (преантител) к неоэпитопам в ISVD. Неоэпитопы представляют собой эпитопы в белке, которые появляются при мутагенезе белка (например, при его укорачивании) или его сворачивании. Ранее существующие антитела представляют собой антитела, существующие в организме пациента до введения ISVD. ISVD по настоящему изобретению частично основаны на лама-антителах, С-концевые константные домены которых были удалены, таким образом экспонируя неоэпитопы в С-конце полученного VHH для связывания преантителами. Было обнаружено, что комбинация мутаций по остаткам 11 и 89 (например, L11V и I89L или V89L) приводит к неожиданному отсутствию связывания преантителами. Было также показано, что мутации по остатку 112 замечательно снижают связывание преантителами. Бьюз и Буттон (Buyse&Boutton, WO2015/173325) включили данные, показывающие, что комбинация мутаций L11V и V89L значительно снижала связывание с преантителами по сравнению с только одной мутацией L11V или V89L. Например, в табл. Н на стр. 97 у Бьюза и Буттона приведены сравнительные данные для ISVD с одной мутацией V89L (с или без удлинения С-конца) и с таким же ISVD с мутацией V89L в сочетании с мутацией L11V (опять же, с или без удлинения С-конца). Кроме того, несмотря на то, что они были получены в двух отдельных экспериментах, данные, показанные в табл. Н для комбинации L11V/V89L, по сравнению с данными, приведенными в таблице В только для мутации L11V (в том же ISVD), показали, что снижение связывания с преантителами, полученное с комбинацией L11V/V89L, было выше, чем для только одной мутации L11V. Поскольку известно, что структура каркаса лама-антител является весьма консервативной, эффект мутаций в позициях 11 и 89, вероятно, будет существовать у любого ISVD. Действительно, на фиг. 19 эффект был продемонстрирован для текущих связывающих молекул, F023700924 и F023700931, которые, как было показано, имеют очень низкие уровни связывания преантител у здоровых людей и у субъектов, страдающих раком.

В настоящем изобретении аминокислотные остатки/позиции в вариабельном домене тяжелой цепи иммуноглобулина будут иметь нумерацию по системе Кабата. Для удобства на фиг. 1 приведена таблица со списком некоторых аминокислотных позиций, которые указаны в настоящем документе, и их нумерация в соответствии с некоторыми альтернативными системами нумерации (такими как Aho и IMGT). Этот момент также дополнительно обсуждается в настоящем описании.

Что касается CDR, то, как хорошо известно в данной области техники, существует множество способов определения и описания CDR в VH- или VHH-фрагменте, таких как определение Кабата (которое основано на вариабельности последовательности и является наиболее часто используемым) и определение Чотия (которое основано на местоположении областей структурных петель). Например, см. веб-сайт www.bioinf.ox.ac.uk/abs/ или g.uk/abs/. В настоящем описании и формуле изобретения, даже если могут быть указаны CDR по Кабату, наиболее предпочтительно определять CDR на основе определения Abm (которое основано на программном обеспечении для моделирования антител Oxf или d Molecular's AbM), поскольку оно считается оптимальным компромиссом между определениями Кабата и Чотия. Снова см. веб-сайт www.bioinf.ox.ac.uk/abs/. См. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Rabat, et al.; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Rabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32:1-75; Rabat, et al., (1977) J. Biol. Chem. 252:6609-6616; Chothia, et al., (1987) J Mol. Biol. 196:901-917 или Chothia, et al., (1989) Nature 342:878-883; Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; Elvin A. Rabat, Tai Te Wu, Carl Foeller, Harold M. Perry, Ray S. Gottesman (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest; Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. и Rontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). В варианте осуществления изобретения определение CDR дано по Кабату, например, где FR1 VHH содержит аминокислотные остатки в позициях 1-30, CDR1 VHH содержит аминокислотные остатки в позициях 31-35, FR2 VHH содержит аминокислоты в позициях 36-49, CDR2 VHH содержит аминокислотные остатки в позициях 50-65, FR3 VHH содержит аминокислотные остатки в позициях 66-94, CDR3 VHH содержит аминокислотные остатки в позициях 95-102, и FR4 VHH содержит аминокислотные остатки в позициях 103-113.

В варианте осуществления изобретения CDR определяются по Контерману и Дюбелю (Rontermann и Dubel, Eds., Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlin, Martin, Chapter 3, pp. 33-51, 2010).

Термин "одинокый вариабельный домен иммуноглобулина" (также называемый "ISV" или ISVD") обычно используется для описания вариабельных доменов иммуноглобулинов (которые могут быть доменами тяжелой цепи или легкой цепи, включая VH-, VHH-или VL-домены), которые могут образовывать функциональный сайт связывания антигена без взаимодействия с другим вариабельным доменом (например, без взаимодействия VH/VL, которое требуется от VH- и VL-доменов обычного 4-цепочечного

моноклонального антитела). Примеры ISVD будут очевидны для квалифицированного специалиста и, например, включают в себя нанотела (включая VHH, гуманизированные VHH и/или VH, модифицированные под антитела верблюдовых, такие как модифицированные под антитела верблюдовых VH человека), IgNAR, домены, (однодоменные) антитела (такие как dAbTM), которые представляют собой VH-домены, или которые получены из VH-доменов, и (однодоменные) антитела (таких как dAbTM), которые представляют собой VL-домены, или которые получены из VL-доменов. Обычно предпочтительны ISVD, которые основаны на и/или получены из переменных доменов тяжелой цепи (таких как VH или VHH-домены). Наиболее предпочтительно, чтобы ISVD представлял собой нанотело.

Определение термина "нанотело" в общем приведено в WO 08/020079 или WO 09/138519, и, таким образом, в конкретном аспекте он, как правило, обозначает VHH, гуманизированный VHH или модифицированный под антитела верблюдовых VH (такой как модифицированный под антитела верблюдовых VH человека) или, в общем, последовательность оптимизированного VHH (например, оптимизированного для химической стабильности и/или растворимости, максимального перекрытия с известными каркасными областями антитела человека и максимальной экспрессии). Следует отметить, что термины нанотело или нанотела являются зарегистрированными товарными знаками Ablynx N.V и поэтому могут также указываться как Нанотело® и/или Нанотела®). Примером ISVD является 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L). Другие ISVD также представлены в табл. А и С в настоящем документе.

Полиспецифичная связывающая молекула (например, полиспецифичный ISVD) представляет собой молекулу, которая содержит, например, первый связывающий PD1 или LAG3 фрагмент (например, ISVD или нанотело) и один или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5) дополнительных связывающих фрагментов (например, ISVD или нанотел), которые связываются с эпитопом, отличным от эпитопа первого связывающего PD1 или LAG3 фрагмента (например, CTLA4, CD27 и/или BTLA); например, содержит связывающий PD1 или LAG3 фрагмент и связывающий CTLA4 фрагмент, связывающий PD1 или LAG3 фрагмент и связывающий BTLA фрагмент, один или два связывающих PD1 фрагмента и один или два связывающих LAG3 фрагмента и связывающий альбумин человека фрагмент, или связывающий PD1 фрагмент, связывающий LAG3 фрагмент и связывающий BTLA фрагмент. Полиспецифичной связывающей молекулой является, например, F023700931 или F023700899.

Связывающим фрагментом или связывающим доменом или связывающей единицей является молекула, такая как ISVD или нанотело, которые связываются с антигеном. Связывающий фрагмент или связывающий домен или связывающая единица могут быть частью более крупной молекулы, такой как поливалентный или полиспецифичный иммуноглобулин, который включает более одного фрагмента, домена или единицы, и/или который содержит другой функциональный элемент, такой как, например, увеличивающий период полувыведения фрагмент (HLE), направляющая молекула и/или низкомолекулярное соединение, такое как полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Моновалентная связывающая PD1 или LAG3 молекула (например, ISVD, такое как нанотело) представляет собой молекулу, которая содержит один антигенсвязывающий домен. Двухвалентная связывающая PD1 или LAG3 молекула содержит два антигенсвязывающих домена (например, обычные антитела, включая биспецифичные антитела). Поливалентная связывающая PD1 или LAG3 молекула содержит более одного антигенсвязывающего домена.

Моноспецифичная связывающая PD1 или LAG3 молекула связывает один антиген, биспецифичная связывающая PD1 или LAG3 молекула связывается с двумя различными антигенами, а полиспецифичная связывающая PD1 или LAG3 молекула связывается с более чем одним антигеном.

Бипаратопная связывающая PD1 или LAG3 молекула является моноспецифичной, но связывается с двумя различными эпитопами одного и того же антигена. Полипаратопная связывающая PD1 или LAG3 молекула связывает один и тот же антиген, но более чем один эпитоп в антигене.

Используемый в настоящем документе термин "период полувыведения", относящийся к связывающей PD1 и/или LAG3 молекуле или ISVD, нанотелу, основанному на ISVD биосоединению, основанному на нанотеле биосоединению или любому другому полипептиду, может быть определен как описанный в пункте (o) на стр.57 в WO08/020079 и, как указано выше, относится ко времени, затрачиваемому на то, чтобы концентрация полипептида в сыворотке снижалась на 50% *in vivo*, например, из-за деградации полипептида и/или клиренса или секвестрации полипептида по естественным механизмам. Период полувыведения *in vivo* полипептида по изобретению можно определить любым известным способом, таким как фармакокинетический анализ. Подходящие методы будут понятны специалисту в данной области и в общем случае могут, например, быть такими, как описано в пункте (o) на стр. 57 в WO 08/020079. Как также указано в пункте (o) на стр. 57 в WO 08/020079, время полужизни может быть выражено с использованием таких параметров, как $t_{1/2}$ -альфа, $t_{1/2}$ -бета и площадь под кривой (AUC). В отношении этого следует отметить, что термин "период полувыведения", используемый в настоящем документе, в частности, относится к периоду полувыведения $t_{1/2}$ -бета или конечному периоду полувыведения (где $t_{1/2}$ -альфа и/или AUC, или оба этих параметра, могут не учитываться). Например, см. раздел Экспериментальная часть (ниже), а также стандартные справочники, такие как Kenneth, A et al: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists и Peters et al, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach

(1996). Также см. книгу "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, опубликованную Marcel Dekker, 2nd Rev. edition (1982). Аналогичным образом, термины "увеличение времени полужизни" или "увеличенное время полужизни", как также определено в пункте (o) на стр. 57 в WO 08/020079, в частности, относятся к увеличению $t_{1/2}$ -бета, либо с увеличением, либо без увеличения $t_{1/2}$ -альфа и/или AUC, или обоих этих параметров.

Когда определение термина прямо не приведено в данном документе, этот термин будет иметь значение, обычное в данной области техники, которое будет понятно специалисту в данной области техники. Например, можно привести ссылку на стандартные справочники, такие как Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd.Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel et al, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing и Wiley Interscience, New York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1985); Old et al., "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2nd edition, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt et al., "Immunology" (6th. Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001); Roitt et al., Roitt's Essential Immunology, 10th Ed. Blackwell Publishing, UK (2001); и Janeway et al., "Immunobiology" (6th Ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New Уилик (2005), а также на предпосылки создания изобретения, ссылки на которые приведены в данном документе.

В качестве ссылки на общее описание поливалентных и полиспецифичных полипептидов, содержащих одно или несколько нанотел, и их получение, также см. Conrath et al., J. Biol. Chem., Vol. 276, 10. 7346-7350, 2001; Muyldermans, Reviews in Molecular Biotechnology 74 (2001), 277-302; а также, например, патенты WO 96/34103, WO 99/23221, WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 или WO 2009/068627.

"Выделенные" связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела), полипептиды, полинуклеотиды и векторы по меньшей мере частично свободны от других биологических молекул из клеток или клеточной культуры, из которой они получены. Такие биологические молекулы включают нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы или другой материал, такой как клеточный дебрис и ростовая среда. "Выделенные" связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы дополнительно могут быть по меньшей мере частично свободными от компонентов экспрессионной системы, таких как биологические молекулы из клетки-хозяина или ее ростовой среды. Как правило, термин "выделенный" не предназначен для обозначения полного отсутствия таких биологических молекул или отсутствия воды, буферов или солей или компонентов фармацевтической композиции, которая включает в себя антитела или фрагменты.

Фраза "контролирующие последовательности" относится к полинуклеотидам, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в определенном организме-хозяине. Контролирующие последовательности, которые подходят для прокариот, например, включают промотор, необязательно, операторную последовательность и сайт связывания рибосом. Известно, что в случае эукариотических клеток используются промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота или полинуклеотид "функционально связаны", когда они находятся в функциональном взаимодействии с другим полинуклеотидом. Например, ДНК последовательности-предшественника или секретируемого лидера функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в виде пребелка, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если они влияют на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы обеспечить трансляцию. В общем, но не всегда, "функционально связанный" означает, что связанные последовательности ДНК являются смежными, а в случае секреторного лидера - смежными и в одной рамке считывания. Однако энхансеры не должны быть смежными. Связывание осуществляют путем лигирования по подходящим сайтам рестрикции. Если таких сайтов не существует, используют синтетические олигонуклеотидные адапторы или линкеры согласно обычной практике. Настоящее изобретение включает в себя полинуклеотиды, кодирующие связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы, которые, необязательно, функционально связаны с одной или несколькими контролирующими последовательностями, такими как промотор.

Связывающая "PD1 и/или LAG3" молекула относится к связывающей молекуле, которая включает связывающий PD1 фрагмент, или связывающий LAG3 фрагмент, или

оба связывающий PD1 фрагмент и связывающий LAG3 фрагмент (то есть, "связывающий PD1/LAG3 фрагмент") и, необязательно, другой связывающий фрагмент, который связывает, например, сывороточный альбумин человека. В варианте осуществления изобретения, связывающей PD1/LAG молекулой является

102C12 (E1D,L11V, A14P, A74S, K83R, I89L)-35GS-11B09
(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-ALB11002-A; или
102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-35GS-102C12
(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-35GS-11B09
(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-11B09

(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-35GS-ALB11002-A;

приведенные в настоящем описании.

См. F023700924 или F023700931. Связывающая PD1/LAG3 молекула включает связывающий PD1 фрагмент и связывающий LAG3 фрагмент.

В объем настоящего изобретения входит любая связывающая PD1 молекула, представленная на фиг. 18(A-P) (или любая связывающая PD1 молекула, содержащая CDR1, CDR2 и CDR3 такой связывающей PD1 молекулы), любая связывающая LAG3 молекула, представленная на фиг. 18 (A-P) (или любая связывающая LAG3 молекула, содержащая CDR1, CDR2 и CDR3 такой связывающей LAG3 молекулы) или любая связывающая PD1/LAG3 молекула, представленное на фиг. 18 (AP), или любая связывающая PD1/LAG3 молекула, содержащая CDR1, CDR2 и CDR3 ее связывающего PD1 фрагмента и/или ее связывающего LAG3 фрагмента. Связывающие молекулы, представленные на фиг. 18 (A-P), в варианте осуществления изобретения не включают удлинение С-конца (например, А), FLAG и/или HIS-метки (например, НННННН (аминокислоты 29-34 или SEQ ID NO: 68), АААНННННН (SEQ ID NO: 69) или АААДYKDHDGDKDHDIDYKDDDKGAАННННН (SEQ ID NO: 68)). Любая такая связывающая молекула или CDR могут в варианте осуществления являться вариантом последовательности, представленной на фиг. 18 (A-P), например, включающим 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 точечных мутаций (например, консервативных замен или удалений).

В общем базовая структурная единица антитела включает тетрамер. Каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, причем каждая пара включает одну "легкую" (примерно 25 кДа) и одну "тяжелую" (примерно 50-70 кДа). Аминоконцевой участок каждой цепи включает вариабельную область из примерно 100-110 или большего числа аминокислот, в основном отвечающих за распознавание антигена. Карбоксиконцевой участок тяжелой цепи относится к константной области, в основном отвечающей за эффекторную функцию. Как правило, легкие цепи антител человека подразделяются на легкие цепи каппа и лямбда. Кроме того, тяжелые цепи антител человека, как правило, подразделяются на мю, дельта, гамма, альфа или эpsilon и определяют изотип антитела, как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. В легкой и тяжелой цепях вариабельные и константные области соединены "J"-областью из примерно 12 аминокислот, причем тяжелая цепь также включает "D"-область из примерно 10 или большего числа аминокислот. В общем см. Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv-фрагменты и молекулы одноцепочечных Fv.

"Связывающая PD1 молекула" или "PD1 ISVD" или "PD1-нанотело" относятся к связывающей молекуле, либо ISVD или нанотелу соответственно, которые связываются с PD1. Аналогичное определение может быть применено в отношении молекул, которые связываются с LAG3 или CTLA4, либо другим антигеном.

Следующие свойства ассоциированы с указанными мутациями в связывающей PD1 молекуле, 102C12:

E1D: предупреждает образование пироглутаминовой кислоты в первой аминокислоте конструкции E1

L11V: уменьшает связывания преантителами

A14P: гуманизация

W52aV: предупреждает окисления W52a

N73P: предупреждает дезамидирование N73

N73Q: предупреждает дезамидирование N73

N73S: предупреждает дезамидирование N73

A74S: гуманизация

K83R: гуманизация

I89L: уменьшает связывания преантителами

W100aF: предупреждает окисление W100a

Или в связывающей LAG3 молекуле, 11B09:

L11V: уменьшает связывания преантителами

A14P: гуманизация

R41P: гуманизация

N43K: гуманизация

A62S: гуманизация

A74S: гуманизация

K83R: гуманизация

V89L: уменьшает связывания преантителами

В варианте осуществления изобретения PD1 представляет собой PD1 человека. В варианте осуществления изобретения PD1 человека содержит аминокислотную последовательность:

MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPTTFSPA LLVVTEGDNA
TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVL
PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE
VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI
GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT
IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL

(SEQ ID NO: 137).

В варианте осуществления изобретения LAG3 представляет собой LAG3 человека. В варианте осуществления изобретения LAG3 человека содержит аминокислотную последовательность:

MWEAQFLGLL FLQPLWVAPV KPLQPGAIEVP VVWAQEGAPA QLPCSPTIPL
QDLSLLRRAG
VTWQHQPDSG PPAAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT VLSVGPGLR
SGRLPLQPRV
QLDERGRQGR DFLWLRLPAR RADAGEYRAA VHLRDRALSC RLRLRLGQAS
MTASPPGSLR
ASDWVILNCS FSRPDRPASV HWFRNRGQGR VPVRESPPHH LAESFLFLPQ
VSPMDSGPWG
CILTDRDGFN VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT
RSFLTAKWTP
PGGGPDLLVT GDNGDFTLRL EDVSQAQAGT YTCHIHLEQ QLNTVTLAI
ITVTPKSFSG
PGSLGKLLCE VTPVSGQERF VWSSLDTPSQ RSFSGPWLEA QEAQLLSQPW
QCQLYQGERL
LGAAVYFTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL LLFLILGVLS LLLLVTGAFG
FHLWRRQWRP
RRFSALEQGI HPPQAQSKIE ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL

(SEQ ID NO: 138)

Связывающие PD1 молекулы.

Настоящее изобретение относится к улучшенным связывающим PD1 молекулам, например улучшенным PD1-ISVD и, в частности, к улучшенным PD1-нанотелам. Улучшенные связывающие PD1 молекулы по изобретению, также указываются в настоящем документе как "связывающие PD1 молекулы по изобретению" или "связывающие PD1 молекулы".

Обсуждаемые в настоящем документе одновалентные связывающие PD1 молекулы по настоящему изобретению будут включать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2, но включающую одну или несколько мутаций в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 или 112 (или в любой из мутационных позиций, приведенных в настоящем документе в отношении связывающих PD1 молекул по изобретению).

Обсуждаемые в настоящем документе полиспецифичные связывающие PD1 молекулы, например, которые включают LAG3, будут включать связывающие PD1 фрагменты, включая CDR1, CDR2 и CDR3, которые присутствуют в связывающих PD1 молекулах, приведенных ниже в табл. A-1 и A-2 (например, в 102C12 или в эталонной последовательности A). Необязательно, PD1-связывающий фрагмент полиспе-

цифичной связывающей молекулы содержит аминокислоты из SEQ ID NO: 1 или 2, но включает одну или несколько мутаций в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 или 112.

Настоящее изобретение относится к улучшенным связывающим PD1 молекулам, например, например улучшенным PD1-ISVD и, в частности, к улучшенным PD1-нанотелам. Связывающие PD1 молекулы по настоящему изобретению включают полипептиды, которые являются вариантами полипептидов, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2, которая мутирована по позициям 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112. Улучшенные связывающие PD1 молекулы по изобретению также указаны в настоящем описании как "связывающие PD1 молекулы по изобретению" или "связывающие PD1 молекулы". Эти термины охватывают любую молекулу, которая связывается с PD1 и включает любую из молекул, которые связываются с PD1 и приведены в настоящем документе. Например, термины включают ISVD, который содержит аминокислотную последовательность, указанную в представителе, выбранном из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-40 и 57, а также любое обычное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые включают аминокислотную последовательность, представленную в последовательностях, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-40 и 57; полиспецифичный иммуноглобулин, такой как биспецифичный иммуноглобулин (например, ISVD), который содержит аминокислотную последовательность, указанную в представителе, выбранном из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-40 и 57, связывается с PD1 и также связывается с другим антигеном, таким как другой эпитоп PD1, CD27, LAG3, CTLA4, BTLA, TIM3, ICOS, B7-H3, B7-H4, CD137, GITR, PD-L1, PD-L2, ILT1, ILT2, CEACAM1, CEACAM5, TIM3, TIGIT, VISTA, ILT3, ILT4, ILT5, ILT6, ILT7, ILT8, CD40, OX40, CD137, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, NKG2A, NKG2C, NKG2E, IL-10, IL-17, TSLP, например, содержащий связывающий PD1 фрагмент и связывающий CTLA4 фрагмент; связывающий PD1 фрагмент и связывающий BTLA фрагмент; связывающий PD1 фрагмент и связывающий LAG3 фрагмент; или связывающий PD1 фрагмент, связывающий LAG3 фрагмент и связывающий BTLA фрагмент. Поливалентная связывающая PD1 молекула содержит более одного антигенсвязывающего домена, например более одного ISVD (один или несколько из которых связываются с PD1). Моноспецифичная связывающая PD1 молекула связывает один антиген (PD1); биспецифичная связывающая PD1 молекула связывается с двумя различными антигенами (один из которых представляет собой PD1), и полиспецифичная связывающая PD молекула связывается с более чем одним антигеном (один или несколько из которых представляют собой PD1, а один или несколько из которых представляют собой другой антиген). Например, в варианте осуществления изобретения связывающая PD1 молекула содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 106-124.

Более конкретно, изобретение направлено на улучшенные связывающие PD1 молекулы, которые являются вариантами 102C12 и эталонной последовательности A, и которые хуже связываются с нежелательными факторами (обычно называемыми "ранее существовавшими антителами"), которые могут присутствовать в сыворотке некоторых здоровых людей, а также больных людей. См. WO 12/175741, WO 2013/024059, а также, например, статью Holl и et al. (J. Clin. Immunol., 2013, 33(7):1192-203), а также PCT-заявку PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325).

Как далее описано здесь, связывающие PD1 молекулы по изобретению, предпочтительно, имеют такую же комбинации CDR (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3), которые присутствуют в 102C12 или в эталонной последовательности A. В WO 2008/071447 описаны нанотела, которые могут связываться с PD1, и их применение. В SEQ ID NO: 348 из WO 2008/071447 раскрыто специфичное к PD-1 нанотело, называемое 102C12, последовательность которой приведена в настоящем документе как SEQ ID NO: 1. Кроме того, вариант 102C12 с гуманизирующей заменой Q108L (также указываемый в настоящем документе как "эталонная последовательность A") используется в настоящем изобретении в качестве эталонного соединения, и его последовательность приведена в настоящем документе как SEQ ID NO: 2. Настоящее изобретение включает связывающие PD1 молекулы, которые включают мутацию в позиции 108, например Q108L.

Настоящее изобретение включает связывающие PD1 молекулы, которые являются вариантами 102C12, и связывающие PD1/LAG3 молекулы, содержащие такие варианты 102C12, которые приведены ниже в табл. A-2. В объем настоящего изобретения входят связывающие PD1 молекулы, которые включают CDR1, CDR2 и CDR3 указанных вариантов, приведенных ниже в табл. A-2, а также связывающие PD1/LAG3 молекулы, содержащие связывающий PD1 фрагмент, который включает CDR1, CDR2 и CDR3 указанных вариантов, приведенных ниже в табл. A-2.

Таблица А-1

Связывающая PD1 молекула, 102C12

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	WO 2008/071447, SEQ ID NO: 348 (102C12) (может указываться в настоящем документе как «1PD102C12»)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA PGKEREFVAVITWSSGGITYYADSVKGRFTISRDNKNTVY LQMNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYGQGTQVTVSS
2	Эталонная последовательность А	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQA PGKEREFVAVITWSSGGITYYADSVKGRFTISRDNKNTVY LQMNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYGQGTQVTVSS

Таблица А-2

Связывающие PD1 молекулы, являющиеся оптимизированными по последовательности вариантами 102C12 (необязательно, слитыми со связывающими HSA фрагментами)

Мономерное SO 1PD102C12, 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) Мишень: hPD-1 SEQ ID NO: 57	DVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGSIAS IHAMGWFRQA PGKEREFVAVITWSSGGITYYADSVKGRFTISRDNKNTVY LQMNSLRPED TALIYYCAGDK HQSSWYDYGQGTQVTVSS
SEQ ID NO: 3	CDR1 связывающего PD1 фрагмента (по Кабату) <u>IHAMG</u>
SEQ ID NO: 4	CDR2 связывающего PD1 фрагмента (по Кабату) <u>VITXSSGGITYYADSVKG</u> где X представляет собой W или V (например, VITwSSGGITYYADSVKG или VITvSSGGITYYADSVKG)
SEQ ID NO: 5	CDR3 связывающего PD1 фрагмента (по Кабату/Abm) <u>DKHQSSXYDY</u> где X представляет собой W или F (например, DKHQSSwYDY или DKHQSSfYDY)
SEQ ID NO: 6	CDR1 связывающего PD1 фрагмента (Abm) <u>GSIASIHAMG</u>
SEQ ID NO: 7	CDR2 связывающего PD1 фрагмента (Abm) <u>VITXSSGGITY</u> где X представляет собой W или V (например, VITwSSGGITY или VITvSSGGITY)
SEQ ID NO: 8	CDR3 связывающего PD1 фрагмента (по Кабату/Abm) <u>DKHQSSXYDY</u> где X представляет собой W или F (например, DKHQSSwYDY или DKHQSSfYDY)
Название: F023700275 Описание: 1PD102C12 (A14P, A74S, K83R) Мишень: hPD-1 SEQ ID NO: 98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGK EREFVAVITWSSGGITYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSL RPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYGQGTQVTVSS
Мономерное SO 1PD102C12 Название: F023700706 или	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGK EREFVAVITWSSGGITYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSL

F023700929 Описание: 1PD102C12 (L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) Мишень: hPD-1 SEQ ID NO: 99	RPEDTALYYCAG <u>DKHOSSWYDY</u> WGQGTTLVTVSS
Моновалентное SO 1PD102C12+ALB11002 Название: F023701127 Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L)-35GS-ALB11002-A Мишень: hPD-1 SEQ ID NO: 101	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS <u>GSIASIHAMG</u> WFRQAPGK EREFVA <u>VITWSGGITYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSL RPEDTALYYCAG <u>DKHOSSWYDY</u> WGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSIISGSGSDTLYA DSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSR SSQGTTLVTVSSA
Бивалентное SO 1PD102C12+ALB11002 Название: F023700933 Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L)-35GS- 1PD102C12 (L11V, A14P, A74S, K83R, I89L)-35GS-ALB11002-A Мишень: hPD-1 SEQ ID NO: 102	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS <u>GSIASIHAMG</u> WFRQAPGK EREFVA <u>VITWSGGITYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSL RPEDTALYYCAG <u>DKHOSSWYDY</u> WGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSL RLSCAAS <u>GSIASIHAMG</u> WFRQAPGKEREFVA <u>VITWSGGITYYA</u> <u>WYDY</u> WGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSW VRQAPGKLEWVSSIISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTL YLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSA
Улучшенное мономерное SO 1PD102C12 Название: F023701190 Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, A74S, K83R, I89L, W100aF) Мишень: hPD-1 SEQ ID NO: 103 *Необязательно, F023701190 содержит мутацию N73X, такую как N73S	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS <u>GSIASIHAMG</u> WFRQAPGK EREFVA <u>VITVSGGITYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSL RPEDTALYYCAG <u>DKHOSSFYDY</u> WGQGTTLVTVSS
Улучшенное мономерное SO 1PD102C12 Название: F023701192 Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF) Мишень: hPD-1 SEQ ID NO: 104	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS <u>GSIASIHAMG</u> WFRQAPGK EREFVA <u>VITVSGGITYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSL RPEDTALYYCAG <u>DKHOSSFYDY</u> WGQGTTLVTVSS
Улучшенное мономерное SO 1PD102C12 Название: F023701193 Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF) Мишень: hPD-1 SEQ ID NO: 105	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS <u>GSIASIHAMG</u> WFRQAPGK EREFVA <u>VITVSGGITYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSL RPEDTALYYCAG <u>DKHOSSFYDY</u> WGQGTTLVTVSS
F023700641 Описание: 1PD102C12 (A14P, A74S, K83R)-35GS- 1PD102C12 (A14P, A74S, K83R)-35GS-ALB11002 Мишень: hPD-1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GSIASIHAMG</u> WFRQAPGK EREFVA <u>VITWSGGITYY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSL RPEDTAIYYCAG <u>DKHOSSWYDY</u> WGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAAS <u>GSIASIHAMG</u> WFRQAPGKEREFVA <u>VITWSGGITYYA</u> <u>DSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAIYYCAGDKHOSS</u> <u>WYDY</u> WGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG

SEQ ID NO: 126	GSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSW VRQAPGKGLEWVSSIISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTL YLQMNLSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTTLTVSS
1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF) аминокислоты 1-19 из SEQ ID NO: 113	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GSIASIHAMG WFRQAPGK EREFVA VITVSGGITYYADSVKGRFTISRDP SKNTVYLQMNLS RPEDTALYYCAG DKHQSSFYDY WGQGTTLTVSS
1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF) аминокислоты 1-19 из SEQ ID NO: 117	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GSIASIHAMG WFRQAPGK EREFVA VITVSGGITYYADSVKGRFTISR DQSKNTVYLQMNLS RPEDTALYYCAG DKHQSSFYDY WGQGTTLTVSS
1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF) аминокислоты 1-19 из SEQ ID NO: 121	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GSIASIHAMG WFRQAPGK EREFVA VITVSGGITYYADSVKGRFTISR DSSKNTVYLQMNLS RPEDTALYYCAG DKHQSSFYDY WGQGTTLTVSS

*CDR связывающих PD1 молекул подчеркнуты и/или выделены полужирным шрифтом

Настоящее изобретение включает варианты осуществления, в которых связывающая PD1 молекула содержит одну, две или три CDR, которые присутствуют в связывающей PD1 молекуле, которая указана выше в табл. A-1 или A-2 (например, SEQ ID NO: 57, 98, 99, 103, 104 или 105), но которые включают замены 0, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, например, консервативные замены, и/или имеют 100, 99, 98, 97, 96 или 95% идентичности по последовательности с CDR, указанными в табл. A-1 или A-2, где связывающая PD1 молекула, имеющая такие CDR, сохраняет способность связываться с PD1. В варианте осуществления изобретения первая аминокислота связывающей PD1 молекулы по настоящему изобретению представляет собой Е. В варианте осуществления изобретения первая аминокислота связывающей PD1 молекулы по настоящему изобретению представляет собой D. Связывающие PD1/LAG3 молекулы, содержащие такой связывающий PD1/LAG3 фрагмент, являются частью настоящего изобретения.

Настоящее изобретение включает любую связывающую PD1 молекулу, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, 98, 99, 103, 104 или 105 или аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более (например, 85%, 90%, 95% 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности по аминокислотной последовательности (т.е. при сравнение полноразмерных аминокислотных последовательностей), где связывающая PD1 молекула сохраняет способность связываться с PD1, и, необязательно, включает связывающий HSA фрагмент. Связывающие PD1/LAG3 молекулы, содержащие такой связывающий PD1/LAG3 фрагмент, являются частью настоящего изобретения.

Связывающая PD1 молекула, описанная как "102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L)" относится к связывающей молекуле, имеющей последовательность 102C12 (SEQ ID NO: 1) или эталонной последовательности A (SEQ ID NO: 2), но где последовательность содержит мутации E1D, L11V, A14P, A74S, K83R и I89L. Это примечание используется на протяжении всего описания в отношении нескольких разных связывающих молекул. Например, "11B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L)" относится к связывающей LAG3 молекуле, содержащей аминокислотную последовательность 11B09 (SEQ ID NO: 64), но где последовательность включает мутации L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R и V89L.

Номера остатков по системе Кабата для некоторых остатков связывающих PD1 молекул, указанных в табл. A, показаны в последовательности ниже:

E₁VQLVESGGGL₁₁V₁₂Q₁₃A₁₄GGSLRLSCAASG₂₆S₂₇I₂₈A₂₉S₃₀IHAMGW₃₆F₃₇R₃₈Q₃₉AP₄
 1GKEREF₄₆F₄₇V₄₈A₄₉VITW_{52a}SGGITYYADSVKGR₆₆F₆₇T₆₈I₆₉S₇₀RDN₇₃A₇₄KNTVYLQM₈₂N_{82a}S_{82b}L_{82c}K₈₃P₈₄EDT₈₇A₈₈I₈₉Y₉₀Y₉₁CAGDKHQSSW_{100a}YDYW₁₀₃G₁₀₄Q₁₀₅G₁₀₆T₁₀₇L₁₀₈V₁₀₉T₁₁₀V₁₁₁S₁₁₂S₁₁₃ (SEQ ID NO: 2) .

Номера остатков по системе Кабата для некоторых остатков 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) показаны в последовательности ниже:

D₁VQLVESGGG V₁₁VQPG₁₄GGSLRL SCAASGSIAS IHAMGWFRQA PGKEREFVAV ITWSGGITYY ADSVKGRFTI SRDNS₇₄KNTVY LQMNSLR₈₃PED TAL₈₉YYCAGDK HQSSWYDYWG QGTTLTVSS (SEQ ID NO: 57). Необязательно, остаток 1 представляет собой Е.

Мутации могут указываться в настоящем описании и обозначаться номерами по системе Кабата, как показано выше.

Некоторыми предпочтительными, но не ограничивающимися ими, связывающими PD1 молекулами по изобретению является 102C12 (E1D (необязательно), L11V, A14P, A74S, K83R, I89L), содержащие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99 или 101-105, или приведенные на фиг. 2, фиг. 3 или фиг. 18 (A-P). Связывающие PD1 молекулы из SEQ ID NO: 24-40, 101 или 102 являются примерами связывающих PD1 молекул по изобретению, имеющих удлинение С-конца аланином, то есть аланиновый остаток на С-конце последовательности ISVD (также иногда называемый "позицией 114") по сравнению с обычной С-концевой последовательностью VTVSS (SEQ ID NO: 52, присутствующей в эталонной последовательности А). Это удлинение С-конца аланином может препятствовать связыванию так называемых "ранее существовавших антител" (предположительно, IgG) с предполагаемым эпитопом, который расположен в С-концевой области ISV. Предполагается, что этот эпитоп включает среди других остатков экспонированные на поверхности аминокислотные остатки С-концевой последовательности VTVSS (SEQ ID NO: 52), а также аминокислотный остаток в позиции 14 (и аминокислотные остатки расположенные рядом/вблизи к нему в аминокислотной последовательности, такие как позиции 11, 13 и 15), и может содержать аминокислотный остаток в позиции 83 (и аминокислотные остатки расположенные рядом/вблизи к нему в аминокислотной последовательности, такие как позиции 82, 82a, 82b и 84), и/или аминокислотный остаток в позиции 108 (и аминокислотные остатки расположенные рядом/вблизи к нему в аминокислотной последовательности, такие как позиция 107).

Однако, хотя присутствие такого С-концевого аланина (или, в общем, удлинения С-конца) может значительно уменьшить (или, в некоторых случаях, по существу полностью предотвратить) связывание "ранее существовавшими антителами", которые могут быть найдены в сыворотке ряда субъектов (как здоровых субъектов, так и субъектов с патологиями или заболеваниями), было обнаружено, что сыворотка некоторых субъектов (такая как сыворотка от пациентов с некоторыми иммунными заболеваниями, такими как СКВ) может содержать ранее существующие антитела, которые могут связываться с С-концевой областью ISV (когда такая область экспонирована), даже когда ISV содержит такой С-концевой аланин (или, в более широком смысле, такое удлинение С-конца).

Соответственно одна конкретная задача изобретения заключается в том, чтобы обеспечить связывающие PD1 молекулы, которые являются улучшенными вариантами PD1-нанотела, именуемого в настоящем документе "эталонной последовательностью А", и которые имеют уменьшенное связывание так называемыми "ранее существующими антителами" и, в частности, типом антител, описанным в РСТ/ЕР 2015/060643 (WO2015/173325) (т.е. такими ранее существующими антителами, которые могут связываться с экспонированной С-концевой областью ISV даже при удлинении С-конца).

В изобретении предложены связывающие PD1 молекулы, содержащие аминокислотные последовательности, которые являются вариантами последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, которые содержат одну или несколько из нижеследующих мутаций по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2:

- 1D или 1E;
- 11V;
- 14P;
- 52aV
- 73Q, 73P или 73S
- 74S;
- 83R;
- 89T или 89L;
- 100aF
- 1D или 1E в сочетании с 11V, 14P, 74S, 83R и 89L;
- 1D в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73Q 73S или 73P, 74S, 83R, 89L и 100aF;
- 1E в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q или 73P, 74S, 83R, 89L и 100aF;
- 89L в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S, или 73Q, или 73P, 74S, 83R и 100aF, и, необязательно, 1D;
- 89L в сочетании с 11V;
- 89L в сочетании с 110K или 110Q;
- 89L в сочетании с 112K или 112Q;
- 89L в сочетании с 11V, 14P, 74S, 83R, и, необязательно, 1D;
- 110K или 110Q в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S, или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 89L и 100aF и, необязательно, 1D;
- 112K или 112Q в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S, или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 89L и 100aF и, необязательно, 1D;
- 89L в сочетании с 11V и 110K или 110Q;
- 89L в сочетании с 11V и 112K или 112Q;
- 11V в сочетании с 110K или 110Q; или
- 11V в сочетании с 112K или 112Q.

В частности, связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела), предложенные в

изобретении, включают вариант SEQ ID NO: 1 или 2, где в варианте осуществления изобретения

аминокислоту в позиции 1 выбирают из E и D;
 аминокислоту в позиции 11 выбирают из L и V;
 аминокислоту в позиции 14 выбирают из A и P;
 аминокислоту в позиции 52a выбирают из W и V;
 аминокислоту в позиции 73 выбирают из N, S, P и Q;
 аминокислоту в позиции 74 выбирают из A или S;
 аминокислоту в позиции 83 выбирают из K или R;
 аминокислоту в позиции 89 выбирают из T, V, I или L;
 аминокислоту в позиции 100a выбирают из W и F;
 аминокислоту в позиции 110 выбирают из T, K или Q; и/или
 аминокислоту в позиции 112 выбирают из S, K или Q;

например, где связывающая PD1 молекула содержит одну или несколько мутаций:

- (i) позиция 1 представляет собой D или E;
- (ii) позиция 11 представляет собой V;
- (iii) позиция 14 представляет собой P;
- (iv) позиция 52a представляет собой V;
- (v) позиция 73 представляет собой P, S или Q;
- (vi) позиция 74 представляет собой S;
- (vii) позиция 83 представляет собой R;
- (viii) позиция 89 представляет собой T или L;
- (ix) позиция 100a представляет собой F; например, содержит набор мутаций, указанных ниже:

a) позиция 1 представляет собой D или E, позиция 11 представляет собой V, позиция 14 представляет собой P, позиция 74 представляет собой S, позиция 83 представляет собой R, и позиция 89 представляет собой L;

b) позиция 1 представляет собой D или E, позиция 11 представляет собой V, позиция 14 представляет собой P, позиция 52a представляет собой V, позиция 73 представляет собой S, P или Q; позиция 74 представляет собой S, позиция 83 представляет собой R, позиция 89 представляет собой L, и позиция 100a представляет собой F;

c) позиция 89 представляет собой L, и позиция 11 представляет собой V;

d) позиция 89 представляет собой L, и позиция 110 представляет собой K или Q;

e) позиция 89 представляет собой L, и позиция 112 представляет собой K или Q;

f) позиция 1 представляет собой D или E, позиция 11 представляет собой V, позиция 14 представляет собой P, позиция 52a представляет собой V, позиция 73 представляет собой S, P или Q; позиция 74 представляет собой S, позиция 83 представляет собой R; позиция 89 представляет собой L, позиция 100a представляет собой F, и позиция 110 представляет собой K или Q;

g) позиция 1 представляет собой D или E, позиция 11 представляет собой V, позиция 14 представляет собой P, позиция 52a представляет собой V, позиция 73 представляет собой S, P или Q, позиция 74 представляет собой S, позиция 83 представляет собой R; позиция 89 представляет собой L, позиция 100a представляет собой F, и позиция 112 представляет собой K или Q;

h) позиция 89 представляет собой L, и позиция 11 представляет собой V, и позиция 110 представляет собой K или Q;

i) позиция 89 представляет собой L, и позиция 11 представляет собой V, и позиция 112 представляет собой K или Q;

j) позиция 11 представляет собой V, и позиция 110 представляет собой K или Q; и/или

k) позиция 11 представляет собой V, и позиция 112 представляет собой K или Q; относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2.

В конкретных вариантах осуществления связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению, содержащие аминокислотные последовательности, которые являются вариантами SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, в которых позиция 89 представляет собой T или L, или в которых позиция 1 представляет собой V, позиция 14 представляет собой P, позиция 74 представляет собой S, позиция 83 представляет собой R, и позиция 89 представляет собой L, или в которых позиция 11 представляет собой V, и позиция 89 представляет собой L (необязательно в подходящем сочетании с мутацией 110K или 110Q и/или мутацией 112K или 112Q, и, в частности, в сочетании с мутацией 110K или 110Q), также являются частью настоящего изобретения. Настоящее изобретение включает аминокислотные последовательности, в которых позиция 11 представляет собой V, а позиция 89 представляет собой L, необязательно, с мутацией 110K или 110Q.

Как уже было указано, связывающие PD1 молекулы, описанные в настоящем изобретении, могут связываться (и, в частности, могут специфично связываться) с PD-1. В варианте осуществления изобретения они могут связываться с PD1 и ингибировать связывание между PD1 и PD-L1 и/или PD-L2. Например, в варианте осуществления изобретения связывающие PD1 молекулы по настоящему изобретению, связываются с PD-1 и освобождают Т-клетки от PD-1-опосредованного ингибирования Т-

клеточного иммунного ответа (например, освобождая Т-клетки от опосредуемого PD1 ингибирования пролиферации и продукции цитокинов).

В таблице В перечислены некоторые неограничивающие возможные комбинации аминокислотных остатков, которые могут присутствовать в позициях 11, 89, 110 и 112 в связывающих PD1 молекулах по изобретению.

Таблица В

Возможные комбинации мутаций в аминокислотных позициях 11, 89, 110 и 112 в вариантах связывающих PD1 молекул SEQ ID NO: 1 или 2

ПОЗИЦИЯ					ПОЗИЦИЯ				
	11	89	110	112		11	89	110	112
C O M B I N A T I O N	L	T	T	S	C O M B I N A T I O N	V	T	T	S
	L	T	T	K		V	T	T	K
	L	T	T	Q		V	T	T	Q
	L	T	K	S		V	T	K	S
	L	T	Q	S		V	T	Q	S
	L	V	T	K		V	V	T	K
	L	V	T	Q		V	V	T	Q
	L	V	K	S		V	V	K	S
	L	V	Q	S		V	V	Q	S
	L	I	T	K		V	I	T	K
	L	I	T	Q		V	I	T	Q
	L	I	K	S		V	I	K	S
	L	I	Q	S		V	I	Q	S
						V	L	T	S

Эти позиции могут быть объединены с мутациями, такими как E1D, A14P, A74S и/или K83R (и/или другие).

Связывающими PD1 молекулами по изобретением дополнительно являются описанные в тексте, примерах и фигурах этого документа, а именно, они содержат CDR, которые описаны в настоящем документе и имеют общую степень идентичности по последовательности (определенную в настоящем документе) с последовательностями SEQ ID NO: 1 или 2, которые раскрыты в настоящем документе, и/или могут иметь ограниченное число "аминокислотных отличий" (как описано в настоящем документе) с этими эталонными последовательностями (одной из них).

Связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению, которые содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2 и одну или несколько мутаций в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, предпочтительно, включают следующие CDR (по системе Кабата):

CDR1 (по Кабату), которая представляет собой аминокислотную последовательность IKAMG (SEQ ID NO: 3); и

CDR2 (по Кабату), которая представляет собой аминокислотную последовательность VITXSG-GITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4, где X представляет собой W или V); и

CDR3 (по Кабату), которая представляет собой аминокислотную последовательность DKNQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, где X представляет собой W или F); необязательно, где CDR1, CDR2 и/или CDR3 имеют 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен, например, консервативных замен.

В альтернативном варианте, когда CDR приведены в соответствии с нумерацией Abm, связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению, предпочтительно, включают следующие CDR:

CDR1 (по Abm), которая представляет собой аминокислотную последовательность GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6); и

CDR2 (по Abm), которая представляет собой аминокислотную последовательность VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7, где X представляет собой W или V); и

CDR3 (по Abm), которая представляет собой аминокислотную последовательность DKNQSSXYDY (SEQ ID NO: 8, которая является такой же, как SEQ ID NO: 5, где X представляет собой W или F); необязательно, где CDR1, CDR2 и/или CDR3 имеют 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен, например, консервативных замен.

Связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению, в дополнение к CDR1, CDR2 и CDR3, изложенным выше, предпочтительно, также имеют степень идентичности по

последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95% (например, 100%) (где CDR, любое удлинение С-конца, которое может присутствовать, а также мутации в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, требуемые конкретным аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей), когда сравнение выполняется с использованием алгоритма BLAST, в котором параметры алгоритма выбираются так, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, порог ожидания: 10; размер слова: 3; максимальное совпадение в диапазоне запросов: 0; матрица BLOSUM 62; затраты на разрыв: существование 11, расширение 1; условная композиционная корректировка оценочной матрицы); и/или не более 7, например, не более 5, предпочтительно, не более 3, например, только 3, 2 или 1 "аминокислотных отличий" с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (где указанные аминокислотные различия, если они есть, могут присутствовать в каркасных областях и/или в CDR, но, предпочтительно, присутствуют только в каркасных областях, а не в CDR, не учитывая любое удлинение С-конца, которое может присутствовать, и без учета мутаций в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, требуемых в соответствии с конкретным аспектом).

Следующие ссылки относятся к алгоритмам BLAST, которые часто используются для анализа последовательности: BLAST ALGORITHMS: Altschul et al. (2005) FEBS J. 272(20): 5101-5109; Altschul, S.F., et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., et al., (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L., et al., (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F., et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., et al., (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J.C., et al., (1993) Comput. Chem. 17:149-163; Hancock, J.M. et al., (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff, M.O., et al., "A model of evolutionary change in proteins." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Schwartz, R.M., et al., "Matrices for detecting distant relationships." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), pp. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S.F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565; States, D.J., et al., (1991) Methods 3:66-70; Henikoff, S., et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919; Altschul, S.F., et al., (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; ALIGNMENT STATISTICS: Karlin, S., et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268; Karlin, S., et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Dembo, A., et al., (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; и Altschul, S.F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) pp. 1-14, Plenum, New York.

В отношении различных аспектов и предпочтительных аспектов связывающих PD1 молекул (например, ISVD, таких как нанотела) по изобретению, предложенных в изобретении, когда речь идет о степени общей идентичности по последовательности относительно SEQ ID NO: 1 или 2 и/или количестве и типе "аминокислотных отличий", которые могут присутствовать в такой связывающей молекуле по настоящему изобретению (а именно, в сравнении с последовательностями SEQ ID NO: 1 или 2), следует отметить, что, если не указано иное, когда говорится, что

(i) аминокислотная последовательность по изобретению имеет степень идентичности по последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95% (где CDR, любое удлинение С-конца, которое может присутствовать, а также мутации в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, требуемые конкретным аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей); и/или когда говорится, что

(ii) аминокислотная последовательность по изобретению имеет не более 7, предпочтительно, не более 5, например, только 3, 2 или 1 "аминокислотных отличий" с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (опять же, не учитывая любое удлинение С-конца, которое может присутствовать, и не учитывая мутации в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, требуемые конкретным аспектом), то это также включает последовательности, которые не имеют аминокислотных отличий с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2, кроме мутаций в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112 (в соответствии с требованиями конкретного аспекта) и каких-либо удлинений С-конца, которые могут присутствовать.

Таким образом, в одном конкретном аспекте изобретения связывающие PD1 молекулы по изобретению, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2, но с по меньшей мере одной аминокислотной мутацией в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, могут иметь 100%-ю идентичность по последовательности с SEQ ID NO: 1 или 2 (включая их CDR1, CDR2 и CDR3, необязательно, содержащими мутацию W52aV и/или W100aF, но не учитывая мутацию (мутации) или комбинации мутаций в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, раскрытые в данном документе, и/или любое удлинение С-конца, которое может присутствовать) и/или могут не иметь аминокислотных отличий с SEQ ID NO: 1 или 2 (то есть других, кроме мутации (мутаций) или комбинации мутаций в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, раскрытых в данном документе, и любого удлинения С-конца, которое может присутствовать).

Когда присутствуют любые аминокислотные отличия (например, кроме любого удлинения С-конца и мутаций в позициях 1, 11, 14, 52а, 73, 74, 83, 89, 100а, 110 и/или 112, которые требуются по конкретному аспекту настоящего изобретения), эти аминокислотные отличия могут присутствовать в CDR и/или в каркасных областях, но они, предпочтительно, присутствуют только в каркасных областях (определенных по системе Abm, то есть не в CDR, определенных по системе Abm), то есть они являются такими, что связывающие PD1 молекулы по изобретению имеют одинаковые CDR (определенные по системе Abm) с теми, которые присутствуют в SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 или 105.

Кроме того, когда связывающая PD1 молекула по изобретению в соответствии с любым аспектом изобретения имеет одно или несколько аминокислотных отличий с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (помимо мутаций в позициях 1, 11, 14, 52а, 73, 74, 83, 89, 100а, 110 и/или 112, которые требуются в соответствии с конкретным аспектом), тогда некоторыми конкретными, но не ограничивающими примерами таких мутаций/аминокислотных отличий, которые могут присутствовать (т.е. по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 1 или 2) являются, например, "гуманизирующие" замены; например, см. WO 09/138519 (или известный уровень техники, указанный в WO 09/138519) и WO 08/020079 (или известный уровень техники, указанный в WO 08/020079), а также в таблицы A-3 - A-8 из WO 08/020079 (которые представляют собой списки, показывающие возможные гуманизирующие замены).

Кроме того, когда связывающие PD-1 фрагменты по изобретению находятся на N-конце и/или образуют N-концевую часть полипептида, в котором они присутствуют, тогда предпочтительно, чтобы они содержали D в позиции 1 (то есть мутацию E1D по сравнению с эталонной последовательностью A). Предпочтительным, но неограничивающим примером такого N-концевого связывающего PD-1 элемента является SEQ ID NO: 24 или 57. Соответственно, в следующем аспекте изобретение относится к полипептиду (описанному далее в настоящем документе), который имеет связывающий PD-1 фрагмент (который далее описан в настоящем документе) на своем N-конце, где указанный связывающий PD-1 фрагмент имеет D в позиции 1 и представляет собой, например, SEQ ID NO: 24, 25, 57 или 101-105.

Аналогичным образом, когда связывающая PD-1 молекула по изобретению используется в одновалентном формате, предпочтительно, чтобы она имела как С-концевое удлинение X (n), описанное в настоящем документе, так и D в позиции 1. Предпочтительный, но неограничивающий пример такой одновалентной связывающей PD-1 молекулы представлен как SEQ ID NO: 40. Соответственно, в следующем аспекте изобретение относится к одновалентной связывающей PD-1 молекуле по изобретению (описанной далее в настоящем документе), которая имеет D в позиции 1 и С-концевое удлинение X (n) (которое предпочтительно представляет собой один остаток Ala). В одном конкретном аспекте указанная моновалентная связывающая PD-1 молекула представляет собой SEQ ID NO: 40, 101 или 102.

В качестве предпочтительных, но не ограничивающих примеров, SEQ ID NO: 23, 24, 39, 40 и 57 являются примерами связывающих PD-1 молекул по изобретению, имеющих аминокислотные различия с SEQ ID NO: 1 или 2, такие как A14P, A74S и/или K83R (кроме того, как указано в предыдущих параграфах, SEQ ID NO: 24 и 40 и 57 также имеют мутацию E1D). Таким образом, в конкретном аспекте изобретение относится к связывающим PD-1 молекулам по изобретению (а именно, имеющим мутации в позициях 11, 89, 110 и/или 112, описанные в настоящем документе, и, кроме этого, также являющимися такими, как описано в настоящем документе), которые по меньшей мере имеют подходящую комбинацию необязательной мутации E1D, мутации A14P, мутации A74S, мутации K83R и/или мутации I89L и, предпочтительно, подходящую комбинацию любых двух из этих мутаций, например, все эти мутации.

Связывающие PD1 молекулы по изобретению, когда они используются в одновалентном формате, и/или когда они находятся на С-конце и/или образуют С-конец полипептида, в котором они присутствуют (или когда они наоборот имеют "открытый" С-конец в таком полипептиде, что обычно означает, что С-конец ISVD не связан или не соединен с константным доменом (таким как домен CH1)); (см. WO 12/175741 и PCT/EP2015/060643 (WO-015/173325)), предпочтительно, также имеют С-концевое удлинение (X)_n, где n составляет от 1 до 10, предпочтительно, от 1 до 5, например 1, 2, 3, 4 или 5 (и, предпочтительно, 1 или 2, например, 1); и каждый X представляет собой аминокислотный остаток (предпочтительно, природный), который независимо выбирают из природных аминокислотных остатков (хотя в соответствии с одним предпочтительным аспектом он не содержит каких-либо цистеиновых остатков) и, предпочтительно, независимо выбирают из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I).

Согласно некоторым предпочтительным, но неограничивающим примерам таких С-концевых удлинений X(n), X и n могут быть следующими:

- (a) n=1 и X=Ala;
- (b) n=2, и каждый X=Ala;
- (c) n=3, и каждый X=Ala;
- (d) n=2, и по меньшей мере один X=Ala (с остальными аминокислотными остатками X, независимо выбранными из любой природной аминокислоты, но, предпочтительно, независимо выбранными из Val, Leu и/или Ile);
- (e) n=3 и по меньшей мере один X=Ala (с остальными аминокислотными остатками X, независимо выбранными из любой природной аминокислоты, но, предпочтительно, независимо выбранными из Val,

Leu и/или Ile);

(f) $n=3$, и по меньшей мере два $X=\text{Ala}$ (с остальными аминокислотными остатками X , независимо выбранными из любой природной аминокислоты, но, предпочтительно, независимо выбранными из Val, Leu и/или Ile);

(g) $n=1$, и $X=\text{Gly}$;

(h) $n=2$, и каждый $X=\text{Gly}$;

(i) $n=3$, и каждый $X=\text{Gly}$;

(j) $n=2$ и по меньшей мере один $X=\text{Gly}$ (с остальными аминокислотными остатками X , независимо выбранными из любой природной аминокислоты, но, предпочтительно, независимо выбранными из Val, Leu и/или Ile);

(k) $n=3$, и по меньшей мере один $X=\text{Gly}$ (с остальными аминокислотными остатками X , независимо выбранными из любой природной аминокислоты, но, предпочтительно, независимо выбранными из Val, Leu и/или Ile);

(l) $n=3$, и по меньшей мере два $X=\text{Gly}$ (с остальными аминокислотными остатками X , независимо выбранными из любой природной аминокислоты, но, предпочтительно, независимо выбранными из Val, Leu и/или Ile);

(m) $n=2$, и каждый $X=\text{Ala}$ или Gly;

(n) $n=3$, и каждый $X=\text{Ala}$ или Gly;

(o) $n=3$, и по меньшей мере один $X=\text{Ala}$ или Gly (с остальными аминокислотными остатками X , независимо выбранными из любой природной аминокислоты, но, предпочтительно, независимо выбранными из Val, Leu и/или Ile); или

(p) $n=3$, и по меньшей мере два $X=\text{Ala}$ или Gly (с остальными аминокислотными остатками X , независимо выбранными из любой природной аминокислоты, но, предпочтительно, независимо выбранными из Val, Leu и/или Ile);

Причем аспекты (a), (b), (c), (g), (h), (i), (m) и (n) являются особенно предпочтительными, где аспекты, в которых $n=1$ или 2, являются предпочтительными, и аспекты, в которых $n=1$, являются особенно предпочтительными.

Следует также отметить, что предпочтительно, чтобы любое удлинение С-конца, присутствующее в связывающей PD1 молекуле по изобретению, не содержало (свободного) цистеинового остатка (если только указанный остаток цистеина не используется или не предназначен для дальнейшей функционализации, например, для ПЭГилирования).

Некоторые конкретные, но не ограничивающие примеры подходящих вариантов удлинения С-конца представляют собой следующие аминокислотные последовательности: A, AA, AAA, G, GG, GGG, AG, GA, AAG, AGG, AGA, GGA, GAA или GAG.

Когда связывающие PD1 молекулы по изобретению содержат мутации в позициях 110 или 112 (необязательно, в сочетании с мутациями в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89 и/или 100a, описанными в настоящем документе), С-концевые аминокислотные остатки каркасной области 4 (начиная с позиции 109) могут в варианте осуществления изобретения быть такими, как указано в SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 100, 101, 103, 104, 105, 106 или 107, но где 5 С-концевых остатков могут быть замещены следующим образом:

(i) если нет С-концевого удлинения: VTVKS (SEQ ID NO: 42), VTVQS (SEQ ID NO: 43), VKVSS (SEQ ID NO: 44) или VQVSS (SEQ ID NO: 45); или

(ii) если есть С-концевое удлинение: VTVKSX_(n) (SEQ ID NO: 46), VTVQSSX_(n) (SEQ ID NO: 47), VKVSSX_(n) (SEQ ID NO: 48) или VQVSSX_(n) (SEQ ID NO: 49), например, VTVKSA (SEQ ID NO: 50), VTVQSA (SEQ ID NO: 51), VKVSSA (SEQ ID NO: 52) или VQVSSA (SEQ ID NO: 53).

Когда связывающие PD1 молекулы по изобретению содержат или, в альтернативном варианте, не содержат мутаций в позициях 110 или 112 (а только мутации в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89 и/или 100a, описанные в настоящем документе), С-концевые аминокислотные остатки каркасной области 4 (начиная с позиции 109) могут в варианте осуществления изобретения быть такими, как указано в SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 или 105, но где 5 С-концевых остатков могут быть замещены следующим образом:

(i) когда нет С-концевого удлинения: VTVSS (SEQ ID NO: 54) (как в последовательности SEQ ID NO: 1 или 2); или

(ii) когда есть С-концевое удлинение: VTVSSX_(n) (SEQ ID NO: 55), например, VTVSSA (SEQ ID NO: 56). В этих С-концевых последовательностях X и p являются такими, как указанные в настоящем документе для удлинения С-конца.

Некоторые предпочтительные, но не ограничивающие примеры связывающих PD1 молекул по изобретению приведены в SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 или 105, и каждая из этих последовательностей образует еще один аспект изобретения. Из них связывающие PD1 молекулы SEQ ID NO: 9-24, 57, 98, 99, 103, 104 и 105 не имеют удлинения С-конца, а связывающие PD1 молекулы SEQ ID NO: 25-40, 101 и 102 содержат С-концевой аланин (который является предпочтительным, но не ограничивающим примером С-концевого удлинения, описанного в настоящем документе).

Примеры связывающих PD1 молекул по настоящему изобретению включают аминокислотную по-

следовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, 24, 39, 40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 или 105.

Таким образом, в варианте осуществления изобретения связывающая PD1 молекула (например, ISVD, такое как нанотело) содержит:

CDR1 (по Кабату), которая представляет собой аминокислотную последовательность IHAMG (SEQ ID NO: 3); и

CDR2 (по Кабату), которая представляет собой аминокислотную последовательность

VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4, где X представляет собой W или V); и

CDR3 (по Кабату), которая представляет собой аминокислотную последовательность

DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, где X представляет собой W или F);

и также имеет:

степень идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95% (например, 100%) (в которых их CDR, необязательно, содержащие мутацию W52aV и/или W100aF, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, требуемые конкретным аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей);

и/или

не более 7, например, не более 5, предпочтительно, не более 3, например, только 3, 2 или 1 "аминокислотных отличий" (определенных в настоящем описании, и не учитывая ни одну из мутаций, приведенных в настоящем описании в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) с аминокислотой последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (где указанные аминокислотные отличия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасных областях и/или в CDR, но, предпочтительно, присутствуют только в каркасных областях, а не в CDR);

и необязательно имеет:

С-концевое удлинение (X)_n, где n составляет от 1 до 10, предпочтительно, от 1 до 5, например, 1, 2, 3, 4 или 5 (и, предпочтительно, 1 или 2, например, 1); и каждый X представляет собой аминокислотный остаток (предпочтительно, природный), который независимо выбран, и, предпочтительно, независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I);

где в варианте осуществления изобретения:

аминокислотный остаток в позиции 1 представляет собой E или D;

аминокислотный остаток в позиции 11 представляет собой L или V;

аминокислотный остаток в позиции 14 представляет собой A или P;

аминокислотный остаток в позиции 52a представляет собой W или V;

аминокислотный остаток в позиции 73 представляет собой N, S, P или Q;

аминокислотный остаток в позиции 74 представляет собой A или S;

аминокислотный остаток в позиции 83 представляет собой K или R;

аминокислотный остаток в позиции 89 представляет собой T, V, I или L;

аминокислотный остаток в позиции 100a представляет собой W или F;

аминокислотный остаток в позиции 110 представляет собой T, K или Q; а также

аминокислотный остаток в позиции 112 представляет собой S, K или Q;

например, где связывающая PD1 молекула содержит одну или несколько следующих мутаций:

(i) позиция 1 представляет собой E или D;

(ii) позиция 11 представляет собой V;

(iii) позиция 14 представляет собой P;

(iv) позиция 52a представляет собой V;

(v) позиция 73 представляет собой S, P или Q;

(vi) позиция 74 представляет собой S;

(vii) позиция 83 представляет собой R;

(viii) позиция 89 представляет собой L;

(ix) позиция 100a представляет собой F;

например, содержит следующий набор мутаций:

а) позиция 1 представляет собой D или E, позиция 11 представляет собой V, позиция 14 представляет собой P, позиция 74 представляет собой S, позиция 83 представляет собой R, и позиция 89 представляет собой L;

б) позиция 1 представляет собой D или E, позиция 11 представляет собой V, позиция 14 представляет собой P, позиция 52a представляет собой V; позиция 73 представляет собой S, P или Q, позиция 74 представляет собой S, позиция 83 представляет собой R, позиция 89 представляет собой L, и позиция 100a представляет собой F;

с) позиция 1 представляет собой D или E, позиция 11 представляет собой V, позиция 14 представляет собой P, позиция 74 представляет собой S, позиция 83 представляет собой R, и позиция 89 представляет собой L;

- d) позиция 89 представляет собой L, и позиция 11 представляет собой V;
 - e) позиция 89 представляет собой L, и позиция 110 представляет собой K или Q;
 - f) позиция 89 представляет собой L, и позиция 112 представляет собой K или Q;
 - g) позиция 89 представляет собой L, и позиция 11 представляет собой V, и позиция 110 представляет собой K или Q;
 - h) позиция 89 представляет собой L, и позиция 11 представляет собой V, и позиция 112 представляет собой K или Q;
 - i) 110K или 110Q в комбинации с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q или 73P, 74S, 83R, 89L и 100aF и, необязательно, 1D или 1E; или в комбинации с 11V, 14P, 74S, 83R, 89L и, необязательно, 1D или 1E;
 - j) 112K или 112Q в комбинации с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q или 73P, 74S, 83R, 89L и 100a F и, необязательно, 1D или 1E; или в комбинации с 11V, 14P, 74S, 83R, 89L и, необязательно, 1D или 1E;
 - k) позиция 11 представляет собой V, а позиция 110 представляет собой K или Q; или
 - l) позиция 11 представляет собой V, а позиция 112 представляет собой K или Q.
- В дополнительном аспекте изобретение относится к связывающей PD1 молекуле (например, ISVD, например нанотелу), имеющей:

CDR1 (по Кабату), которая представляет собой аминокислотную последовательность IKAMG (SEQ ID NO: 3); и

CDR2 (по Кабату), которая представляет собой аминокислотную последовательность VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4, где X представляет собой W или V); и

CDR3 (по Кабату), которая представляет собой аминокислотную последовательность DKNQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, где X представляет собой W или F); а также имеет степень идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (в которой любое удлинение С-конца, которое может присутствовать, а также их CDR, необязательно, содержащие мутацию W52aV и/или W100aF, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей) по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95% (например, 100%) (в которых CDR, любое удлинение С-конца, которое может присутствовать, а также мутации в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, требуемые конкретным аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей); и/или

не более 7, например не более 5, предпочтительно, не более 3, например, только 3, 2 или 1 "аминокислотных отличий" (определенных в настоящем документе, и не учитывая ни одну из мутаций, приведенных в настоящем документе в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая никакое удлинение С-конца, которое может присутствовать) с аминокислотой последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (в которой указанные аминокислотные отличия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасных областях и/или CDR, но, предпочтительно, присутствуют только в каркасных областях, а не в CDR);

и, необязательно, имеет

С-концевое удлинение (X)_n, в котором n составляет от 1 до 10, предпочтительно, от 1 до 5, например, 1, 2, 3, 4 или 5 (и, предпочтительно, 1 или 2, например, 1); и каждый X представляет собой аминокислотный остаток (предпочтительно природный), который независимо выбран, и, предпочтительно, независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I);

причем связывающая PD1 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) содержит в одном из вариантов осуществления изобретения один или несколько из следующих аминокислотных остатков (т.е. мутации по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2) в указанных позициях (нумерация по Кабату):

1D или 1E;

11V;

14P;

52aV;

73Q, 73P или 73S;

74S;

83R;

89T или 89L; или

100aF;

например, содержит следующий набор мутаций:

1D или 1E в комбинации с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 89L и/или 100aF;

1D или 1E в комбинации с 11V, 14P, 74S, 83R и/или 89L;

89L в комбинации с 11V;

89L в комбинации с 110K или 110Q;

89L в комбинации с 112K или 112Q;

89L в комбинации с 11V, 14P, 74S, 83R и 1D, и 1E;

110K или 110Q в комбинации с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 89L и/или 100aF, и 1D или 1E;

112K или 112Q в комбинации с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 89L и/или 100aF, и 1D или 1E;

110K или 110Q в комбинации с 11V, 14P, 74S, 83R, 89L и/или 1D, или 1E;

112K или 112Q в комбинации с 11V, 14P, 74S, 83R, 89L и/или 1D, или 1E;

89L в комбинации с 11V и 110K или 110Q;

89L в комбинации с 11V и 112K или 112Q;

11V в комбинации с 110K или 110Q; или

11V в комбинации с 112K или 112Q.

Как уже было указано, когда связывающая PD1 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) по изобретению используется в одновалентном формате и/или присутствует на С-конце полипептида (как описано в настоящем документе), предпочтительно, чтобы связывающая PD1 молекула имела С-концевое удлинение X(n), причем С-концевое удлинение может быть таким, как описано в настоящем документе для связывающих PD1 молекул по изобретению, и/или как описано в WO 12/175741 или PCT/EP2015/060643 (WO-015/173325).

Некоторые предпочтительные, но неограничивающие примеры связывающих PD1 молекул (например, ISVD, такого как нанотело) по изобретению, приведены в SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 и 105, и каждая из этих аминокислотных последовательностей индивидуально образует дополнительный аспект изобретения.

Как уже было указано, изобретение включает связывающие PD1 молекулы, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, но в которых позиция 8 9 представляет собой T; или в которых позиция 1 представляет собой E или D, позиция 11 представляет собой V, позиция 14 представляет собой P, позиция 52a представляет собой V, позиция 73 представляет собой P, S или Q, позиция 74 представляет собой S, позиция 83 представляет собой R, позиция 89 представляет собой L и/или позиция 100a представляет собой F; или в которых позиция 11 представляет собой V, и позиция 89 представляет собой L (необязательно, в подходящем сочетании с мутацией 110K или 110Q, и/или мутацией 112K или 112Q и, в частности, в сочетании с мутацией 110K или 110Q). В варианте осуществления изобретения предложены аминокислотные последовательности, в которых позиция 11 представляет собой V, а позиция 89 представляет собой L, необязательно, с мутацией 110K или 110Q.

Таким образом, в одном предпочтительном аспекте изобретение относится к связывающей PD1 молекуле (например, к одиночному вариабельному домену иммуноглобулина (ISVD), такому как нанотело), имеющей:

CDR1 (по Кабату), которая представляет собой аминокислотную последовательность IKAMG (SEQ ID NO: 3); и

CDR2 (по Кабату), которая представляет собой аминокислотную последовательность VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4, где X представляет собой W или V); и

CDR3 (по Кабату), которая представляет собой аминокислотную последовательность DKNQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, где X представляет собой W или F); и также имеющей:

степень идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (в которой любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также их CDR, необязательно, содержащие мутацию W52aV и/или W100aF, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей) по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95% (например, 100%) (в которой CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, требуемые конкретным аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей); и/или не более 7, например, не более 5, предпочтительно, не более 3, например, только 3, 2 или 1 "аминокислотных отличий" (определенных в настоящем документе, и не учитывая ни одну из мутаций, приведенных в настоящем документе в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая никакое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (в которой указанные аминокислотные отличия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасных областях и/или в CDR, но, предпочтительно, присутствуют только в каркасных областях, а не в CDR);

и, необязательно, имеющей:

С-концевое удлинение (X)_n, в котором n составляет от 1 до 10, предпочтительно, от 1 до 5, например, 1, 2, 3, 4 или 5 (и, предпочтительно, 1 или 2, например, 1); и каждый X представляет собой аминокислотный остаток (предпочтительно природный), который независимо выбран, и, предпочтительно, независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I);

где в варианте осуществления изобретения:

аминокислота в позиции 1 представляет собой E или D;

аминокислота в позиции 11 представляет собой L или V;

аминокислота в позиции 14 представляет собой А или Р;
 аминокислота в позиции 52а представляет собой W или V;
 аминокислота в позиции 73 представляет собой N, S, Р или Q;
 аминокислота в позиции 74 представляет собой А или S;
 аминокислота в позиции 83 представляет собой К или R;
 аминокислота в позиции 89 представляет собой I, Т или L;
 аминокислота в позиции 100а представляет собой W или F;

аминокислотный остаток в позиции 110 представляет собой Т, К или Q (и, предпочтительно, Т); и
 аминокислотный остаток в позиции 112 представляет собой S, К или Q (и, предпочтительно, S).

В другом предпочтительном аспекте изобретение относится к связывающей PD1 молекуле (например, к одиночному вариабельному домену иммуноглобулина (ISVD), такому как нанотело), имеющей:

CDR1 (по Кабату), которая представляет собой аминокислотную последовательность
 IHAMG (SEQ ID NO: 3); и

CDR2 (по Кабату), которая представляет собой аминокислотную последовательность
 VITXSGGITYYADSVKVG (SEQ ID NO: 4, где X представляет собой W или V); и

CDR3 (по Кабату), которая представляет собой аминокислотную последовательность
 DKNQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, где X представляет собой W или F); и имеющей:

степень идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (в которой любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также их CDR, необязательно, содержащие мутацию W52aV и/или W100aF, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей) по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95% (например, 100%) (в которой CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в позициях 1, 11, 14, 52а, 73, 74, 83, 89, 100а, 110 и/или 112, требуемые конкретным аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей); и/или

не более 7, например, не более 5, предпочтительно, не более 3, например, только 3, 2 или 1 "аминокислотных отличий" (определенных в настоящем документе, и не учитывая ни одну из мутаций, приведенных в настоящем документе в позициях 1, 11, 14, 52а, 73, 74, 83, 89, 100а, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая никакое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (в которой указанные аминокислотные отличия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасных областях и/или в CDR, но, предпочтительно, присутствуют только в каркасных областях, а не в CDR);

и, необязательно, имеющей:

С-концевое удлинение (X)_n, в котором n составляет от 1 до 10, предпочтительно, от 1 до 5, например, 1, 2, 3, 4 или 5 (и, предпочтительно, 1 или 2, например, 1); и каждый X представляет собой аминокислотный остаток (предпочтительно природный), который независимо выбран, и, предпочтительно, независимо выбран из группы, состоящей из аланина (А), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I);

в которой одно или несколько из нижеследующего является верным:

аминокислота в позиции 1 представляет собой Е или D;
 аминокислота в позиции 11 представляет собой L или V;
 аминокислота в позиции 14 представляет собой А или Р;
 аминокислота в позиции 52а представляет собой W или V;
 аминокислота в позиции 73 представляет собой S, Р, N или Q;
 аминокислота в позиции 74 представляет собой А или S;
 аминокислота в позиции 83 представляет собой К или R;
 аминокислота в позиции 89 представляет собой I, Т или L;
 аминокислота в позиции 100а представляет собой W или F;
 аминокислотный остаток в позиции 110 представляет собой Т, К или Q (и, предпочтительно, Т);

или

аминокислотный остаток в позиции 112 представляет собой S, К или Q (и, предпочтительно, S).

В одном конкретном, но неограничивающем аспекте связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению содержат один или несколько из следующих аминокислотных остатков (т.е. мутаций по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2) в указанных позициях (нумерация по Кабату):

11V в сочетании с 89L;

11V в комбинации с 14P, 52aV, 73S или 73Q или 73P, 74S, 83R, 89L и/или 100aF и, необязательно, 1D;

11V в сочетании с 14P, 74S, 83R, 89L и 1D или 1E;

11V в сочетании с 110K или 110Q;

11V в сочетании с 112K или 112Q;

11V в сочетании с 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 89L, 100aF, 110K или 110Q, и/или 1D или 1E;

11V в сочетании с 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 89L, 100aF, 112K или 112Q, и/или 1D или 1E;

11V в сочетании с 89L и 110K или 110Q;

11V в сочетании с 89L и 112K или 112Q; или

11V в сочетании с 1D или 1E, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 89L и/или 100aF;

и имеют CDR, которые являются такими же, как CDR, которые присутствуют в последовательности SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 или 105 (например, по Кабату), и имеют общую степень идентичности по последовательности с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 или 2, которая описана в данном документе.

В другом конкретном, но неограничивающем аспекте связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению содержат один или несколько из следующих аминокислотных остатков (т.е. мутаций по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2) в указанных позициях (нумерация по Кабату):

89L в сочетании с 11V;

89L в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 100aF и/или 1D, или 1E;

89L в сочетании с 11V, 14P, 74S, 83R и/или 1D, или 1E;

89L в сочетании с 110K или 110Q;

89L в сочетании с 112K или 112Q;

89L в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 100aF, 110K или 110Q, и/или 1D или 1E;

89L в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 100aF, 112K или 112Q, и/или 1D или 1E;

89L в сочетании с 11V, 14P, 74S, 83R, 110K или 110Q, и/или 1D или 1E;

89L в сочетании с 11V, 14P, 74S, 83R, 112K или 112Q, и/или 1D или 1E;

89L в сочетании с 11V и 110K или 110Q; или

89L в сочетании с 11V и 112K или 112Q;

и имеют CDR, которые являются такими же, как CDR, которые присутствуют в последовательности SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 или 105 (например, по Кабату), и имеют общую степень идентичности по последовательности с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 или 2, которая описана в данном документе.

В другом конкретном, но неограничивающем аспекте связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению содержат один или несколько из следующих аминокислотных остатков (т.е. мутаций по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2) в указанных позициях (нумерация по Кабату):

110K или 110Q в сочетании с 1D;

110K или 110Q в сочетании с 1E;

110K или 110Q в сочетании с 11V;

110K или 110Q в сочетании с 14P;

110K или 110Q в сочетании с 52aV;

110K или 110Q в сочетании с 73S или 73Q, или 73P;

110K или 110Q в сочетании с 74S;

110K или 110Q в сочетании с 83R;

110K или 110Q в сочетании с 89L;

110K или 110Q в сочетании с 100aF;

110K или 110Q в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 89L, 100aF и/или 1D, или 1E;

110K или 110Q в сочетании с 11V, 14P, 74S, 83R, 89L и/или 1D, или 1E;

110K или 110Q в сочетании с 89L; или

110K или 110Q в сочетании с 11V и 89L;

и имеют CDR, которые являются такими же, как CDR, которые присутствуют в последовательности SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 или 105 (например, по Кабату), и имеют общую степень идентичности по последовательности с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 или 2, которая описана в данном документе.

В другом конкретном, но неограничивающем аспекте связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению содержат один или несколько из следующих аминокислотных остатков (т.е. мутаций по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2) в указанных позициях (нумерация по Кабату):

112K или 112Q в сочетании с 1D или 1E;

112K или 112Q в сочетании с 11V;

112K или 112Q в сочетании с 14P;

112K или 112Q в сочетании с 52aV;

112K или 112Q в сочетании с 73S или 73Q, или 73P;

112K или 112Q в сочетании с 74S;
 112K или 112Q в сочетании с 83R;
 112K или 112Q в сочетании с 89L;
 112K или 112Q в сочетании с 100aF;
 112K или 112Q в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 89L, 100aF и/или 1D, или 1E;

112K или 112Q в сочетании с 11V, 14P, 74S, 83R, 89L и/или 1D, или 1E; или

112K или 112Q в сочетании с 11V и 89L;

и имеют CDR, которые являются такими же, как CDR, которые присутствуют в последовательности SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 или 105 (например, по Кабату), и имеют общую степень идентичности по последовательности с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 или 2, которая описана в данном документе.

В другом аспекте связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению содержат T в позиции 89 и имеют CDR, которые являются такими же, как CDR, которые присутствуют в последовательности SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 или 105 (например, по Кабату), и имеют общую степень идентичности по последовательности с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 или 2, которая описана в данном документе.

В другом аспекте связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению содержат V в позиции 11 и L в позиции 89, и имеют CDR, которые являются такими же, как CDR, которые присутствуют в последовательности SEQ ID NO: 9-40, 57, 100, 101, 102, 103, 104 или 105 (например, по Кабату), и имеют общую степень идентичности по последовательности с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 или 2, которая описана в данном документе.

Как уже было указано, предпочтительно, чтобы связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению в соответствии с вышеприведенными аспектами дополнительно содержали бы подходящее сочетание мутации A14P, мутации A74S и/или мутации K83R и, предпочтительно, подходящее сочетание любых двух этих мутаций, например, все три эти мутации (например, E1D (необязательно), L11V, A14P, W52aV, N73S или N73Q или N73P, A74S, K83R, I89L и W100aF). Когда связывающий LAG3 или связывающий HSA фрагмент присутствует на N-конце связывающей PD1 молекулы по настоящему изобретению, предпочтительно, чтобы N-концевой связывающий фрагмент содержал мутацию E1D.

В другом аспекте изобретение относится к связывающей PD1 молекуле (например, одиночному вариативному домену иммуноглобулина (ISVD), такому как нанотело), имеющей

CDR1 (по Abm), которая представляет собой аминокислотную последовательность GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6); и

CDR2 (по Abm), которая представляет собой аминокислотную последовательность VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7, где X представляет собой W или V); и

CDR3 (по Abm), которая представляет собой аминокислотную последовательность DKNQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, где X представляет собой W или F);

и также имеющей

степень идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (в которой любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также CDR, необязательно, содержащие мутацию W52aV и/или W100aF, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей) по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95% (например, 100%) (в которой CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, требуемые конкретным аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей); и/или

не более 7, например, не более 5, предпочтительно, не более 3, например, только 3, 2 или 1 "аминокислотных отличий" (определенных в настоящем документе, и не учитывая ни одну из мутаций, приведенных в настоящем документе в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая никакое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (в которой указанные аминокислотные отличия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасных областях и/или в CDR, но, предпочтительно, присутствуют только в каркасных областях, а не в CDR);

и, необязательно, имеющей

С-концевое удлинение (X)_n, в котором n составляет от 1 до 10, предпочтительно, от 1 до 5, например, 1, 2, 3, 4 или 5 (и, предпочтительно, 1 или 2, например, 1); и каждый X представляет собой аминокислотный остаток (предпочтительно природный), который независимо выбран, и, предпочтительно, независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I);

где в варианте осуществления изобретения:

аминокислота в позиции 1 представляет собой E или D;

аминокислота в позиции 11 представляет собой L или V;
 аминокислота в позиции 14 представляет собой A или P;
 аминокислота в позиции 52a представляет собой W или V;
 аминокислота в позиции 73 представляет собой N, S, P или Q;
 аминокислота в позиции 74 представляет собой A или S;
 аминокислота в позиции 83 представляет собой K или R;
 аминокислота в позиции 89 представляет собой V, I, T или L;
 аминокислота в позиции 89 представляет собой T;
 аминокислота в позиции 100a представляет собой W и F;
 аминокислотный остаток в позиции 110 представляет собой T, K или Q (и, предпочтительно, T); и
 аминокислотный остаток в позиции 112 представляет собой S, K или Q (и, предпочтительно, S);
 например, в варианте осуществления изобретения связывающая PD1 молекула содержит одну или несколько из следующих мутаций: (i) позиция 1 представляет собой D или E; (ii) позиция 11 представляет собой V; (iii) позиция 14 представляет собой P; (iv) позиция 52a представляет собой V; (v) позиция 73 представляет собой Q, P или S; (vi) позиция 74 представляет собой S;
 (vii) позиция 83 представляет собой R; (viii) позиция 89 представляет собой L или T; (ix) позиция 100a представляет собой F; например, содержит следующий набор мутаций:
 а) позиция 11 представляет собой V; позиция 14 представляет собой P; позиция 52a представляет собой V; позиция 73 представляет собой P, S или Q; позиция 74 представляет собой S; позиция 83 представляет собой R; позиция 89 представляет собой L; позиция 100a представляет собой F; и, необязательно, позиция 1 представляет собой E или D;
 б) позиция 11 представляет собой V; позиция 14 представляет собой P; позиция 74 представляет собой S; позиция 83 представляет собой R; позиция 89 представляет собой L; и, необязательно, позиция 1 представляет собой E или D;
 в) позиция 89 представляет собой L, и позиция 11 представляет собой V;
 д) позиция 89 представляет собой L, и позиция 110 представляет собой K или Q;
 е) позиция 89 представляет собой L, и позиция 112 представляет собой K или Q;
 ф) позиция 11 представляет собой V; позиция 14 представляет собой P; позиция 52a представляет собой V; позиция 73 представляет собой P, S или Q; позиция 74 представляет собой S; позиция 83 представляет собой R; позиция 89 представляет собой L; позиция 100a представляет собой F; позиция 110 представляет собой K или Q и, необязательно, позиция 1 представляет собой E или D;
 г) позиция 11 представляет собой V; позиция 14 представляет собой P; позиция 52a представляет собой V; позиция 73 представляет собой S, P или Q; позиция 74 представляет собой S; позиция 83 представляет собой R; позиция 89 представляет собой L; позиция 100a представляет собой F; позиция 112 представляет собой K или Q и, необязательно, позиция 1 представляет собой E или D;
 г) позиция 11 представляет собой V; позиция 14 представляет собой P; позиция 74 представляет собой S; позиция 83 представляет собой R; позиция 89 представляет собой L; позиция 100a представляет собой F; позиция 112 представляет собой K или Q и, необязательно, позиция 1 представляет собой E или D;
 з) позиция 11 представляет собой V; позиция 14 представляет собой P; позиция 74 представляет собой S; позиция 83 представляет собой R; позиция 89 представляет собой L; позиция 110 представляет собой K или Q и, необязательно, позиция 1 представляет собой E или D;
 и) позиция 11 представляет собой V; позиция 14 представляет собой P; позиция 74 представляет собой S; позиция 83 представляет собой R; позиция 89 представляет собой L; позиция 112 представляет собой K или Q и, необязательно, позиция 1 представляет собой E или D;
 ж) позиция 89 представляет собой L, и позиция 11 представляет собой V, и позиция 110 представляет собой K или Q;
 з) позиция 89 представляет собой L, и позиция 11 представляет собой V, и позиция 112 представляет собой K или Q;
 и) позиция 11 представляет собой V, и позиция 110 представляет собой K или Q; или
 м) позиция 11 представляет собой V, и позиция 112 представляет собой K или Q.
 В дополнительном аспекте изобретение относится к связывающей PD1 молекуле (например, одиночному варибельному домену иммуноглобулина (ISVD), такому как нанотело), имеющей CDR1 (по Abm), которая представляет собой аминокислотную последовательность GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6); и
 CDR2 (по Abm), которая представляет собой аминокислотную последовательность VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7, где X представляет собой W или V); и
 CDR3 (по Abm), которая представляет собой аминокислотную последовательность DKNQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, где X представляет собой W или F);
 и также имеющей
 степень идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (в которой любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также CDR, необязательно, содержащие мутацию W52aV и/или W100aF, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей) по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95% (например, 100%) (в которой CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или

112, требуемые конкретным аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей); и/или

не более 7, например, не более 5, предпочтительно, не более 3, например, только 3, 2 или 1 "аминокислотных отличий" (определенных в настоящем документе, и не учитывая ни одну из мутаций, приведенных в настоящем документе в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая никакое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (в которой указанные аминокислотные отличия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасных областях и/или в CDR, но, предпочтительно, присутствуют только в каркасных областях, а не в CDR);

и, необязательно, имеющей

С-концевое удлинение (X)_n, в котором n составляет от 1 до 10, предпочтительно, от 1 до 5, например, 1, 2, 3, 4 или 5 (и, предпочтительно, 1 или 2, например, 1); и каждый X представляет собой аминокислотный остаток (предпочтительно природный), который независимо выбран, и, предпочтительно, независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I);

причем одиночный вариабельный домен иммуноглобулина содержит один или несколько из следующих аминокислотных остатков (то есть мутаций по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2) в указанных позициях (нумерация по Кабату):

1D или 1E;

11V;

14P;

52aV;

73Q, 73S или 73P;

74S;

83R;

89L или 89T; или

100aF;

например, содержит следующий набор мутаций:

89T или 89L в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 100aF или 1E, или 1D;

89T или 89L в сочетании с 11V, 14P, 74S, 83R или 1E, или 1D;

89L в сочетании с 11V;

89L в сочетании с 110K или 110Q;

89L в сочетании с 112K или 112Q;

89L в сочетании с 11V, 14P, 74S, 83R, 110K или 110Q, или 1E, или 1D;

89L в сочетании с 11V, 14P, 74S, 83R, 112K или 112Q, или 1E или 1D;

89L в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 100aF, 110K или 110Q, или 1E или 1D;

89L в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 100aF, 112K или 112Q, или 1E или 1D;

89L в сочетании с 11V и 110K или 110Q;

89L в сочетании с 11V и 112K или 112Q;

11V в сочетании с 110K или 110Q; или

11V в сочетании с 112K или 112Q.

Как уже было указано, когда связывающая PD1 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) по изобретению используется в одновалентном формате и/или когда фрагмент, связывающий PD1, присутствует на С-конце полипептида (как описано в настоящем документе), предпочтительно, чтобы связывающий PD1 фрагмент имел С-концевое удлинение X(n), причем С-концевое удлинение может быть таким, как описано в настоящем документе для связывающих PD1 молекул по изобретению, и/или как описано в WO 12/175741 или PCT/EP2015/060643 (WO-015/173325).

Некоторые предпочтительные, но неограничивающие примеры связывающих PD1 молекул (например, ISVD, такого как нанотело) по изобретению, приведены в SEQ ID NO: 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 или 105, и каждая из этих аминокислотных последовательностей индивидуально образует дополнительный аспект изобретения.

Как уже было указано, в изобретении аминокислотные последовательности, в которых позиция 89 представляет собой T; или в которых позиция 1 представляет собой E или D, позиция 11 представляет собой V, позиция 14 представляет собой P, позиция 52a представляет собой V, позиция 73 представляет собой P, S или Q, позиция 74 представляет собой S, позиция 83 представляет собой R, позиция 89 представляет собой L и/или позиция 100a представляет собой F; или в которых позиция 11 представляет собой V и позиция 89 представляет собой L (необязательно, в подходящей комбинации с мутацией 110K или 110Q, и/или мутацией 112K или 112Q и, в частности, в комбинации с мутацией 110K или 110Q), являются частью настоящего изобретения. В варианте осуществления изобретения аминокислотная последовательность в позиции 11 имеет V, и в позиции 89 имеет L, необязательно, с мутацией 110K или 110Q.

Таким образом, в одном предпочтительном аспекте изобретение относится к связывающей PD1 молекуле (например, одиночному вариабельному домену иммуноглобулина (ISVD), такому как нанотело), имеющей:

CDR1 (по Abm), которая представляет собой аминокислотную последовательность GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6); и

CDR2 (по Abm), которая представляет собой аминокислотную последовательность VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7, где X представляет собой W или V); и

CDR3 (по Abm), которая представляет собой аминокислотную последовательность DKNQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, где X представляет собой W или F);

и также имеющей

степень идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (в которой любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также CDR, необязательно, содержащие мутацию W52aV и/или W100aF, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей) по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95% (например, 100%) (в которой CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, требуемые конкретным аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей); и/или

не более 7, например, не более 5, предпочтительно, не более 3, например, только 3, 2 или 1 "аминокислотных отличий" (определенных в настоящем документе, и не учитывая ни одну из мутаций, приведенных в настоящем документе в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая никакое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (в которой указанные аминокислотные отличия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасных областях и/или в CDR, но, предпочтительно, присутствуют только в каркасных областях, а не в CDR);

и, необязательно, имеющей

С-концевое удлинение (X)_n, в котором n составляет от 1 до 10, предпочтительно, от 1 до 5, например, 1, 2, 3, 4 или 5 (и, предпочтительно, 1 или 2, например, 1); и каждый X представляет собой аминокислотный остаток (предпочтительно природный), который независимо выбран, и, предпочтительно, независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I);

в которой, в варианте осуществления изобретения

аминокислотный остаток в позиции 1 представляет собой E или D;

аминокислотный остаток в позиции 11 представляет собой L или V;

аминокислотный остаток в позиции 14 представляет собой A или P;

аминокислотный остаток в позиции 52a представляет собой W или V;

аминокислотный остаток в позиции 73 представляет собой S, P, N или Q;

аминокислотный остаток в позиции 74 представляет собой A или S;

аминокислотный остаток в позиции 83 представляет собой K или R;

аминокислотный остаток в позиции 89 представляет собой T, L или I;

аминокислотный остаток в позиции 100a представляет собой W или F;

аминокислотный остаток в позиции 110 представляет собой T, K или Q (и, предпочтительно, T); и

аминокислотный остаток в позиции 112 представляет собой S, K или Q (и, предпочтительно, S).

В еще одном предпочтительном аспекте изобретение относится к связывающей PD1 молекуле (например, одиночному вариабельному домену иммуноглобулина (ISVD), такому как нанотело), имеющей

CDR1 (по Abm), которая представляет собой аминокислотную последовательность GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6); и

CDR2 (по Abm), которая представляет собой аминокислотную последовательность VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7, где X представляет собой W или V); и

CDR3 (по Abm), которая представляет собой аминокислотную последовательность DKNQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, где X представляет собой W или F);

и также имеющей

степень идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (в которой любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также CDR, необязательно, содержащие мутацию W52aV и/или W100aF, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей) по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95% (например, 100%) (в которой CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, требуемые конкретным аспектом, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей); и/или

не более 7, например, не более 5, предпочтительно, не более 3, например, только 3, 2 или 1 "аминокислотных отличий" (определенных в настоящем документе, и не учитывая ни одну из мутаций, приве-

денных в настоящем документе в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, которые могут присутствовать, и не учитывая никакое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2 (в которой указанные аминокислотные отличия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасных областях и/или в CDR, но, предпочтительно, присутствуют только в каркасных областях, а не в CDR);

и, необязательно, имеющей

С-концевое удлинение (X)_n, в котором n составляет от 1 до 10, предпочтительно, от 1 до 5, например, 1, 2, 3, 4 или 5 (и, предпочтительно, 1 или 2, например, 1); и каждый X представляет собой аминокислотный остаток (предпочтительно природный), который независимо выбран, и, предпочтительно, независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I);

в которой, например, одно или несколько из нижеследующего является верным:

аминокислотный остаток в позиции 1 представляет собой E или D;

аминокислотный остаток в позиции 11 представляет собой V;

аминокислотный остаток в позиции 14 представляет собой P;

аминокислотный остаток в позиции 52a представляет собой V;

аминокислотный остаток в позиции 73 представляет собой S, P или Q;

аминокислотный остаток в позиции 74 представляет собой S;

аминокислотный остаток в позиции 83 представляет собой R;

аминокислотный остаток в позиции 89 представляет собой L;

аминокислотный остаток в позиции 100a представляет собой F;

аминокислотный остаток в позиции 110 представляет собой T, K или Q; или

аминокислотный остаток в позиции 112 представляет собой S, K или Q.

В одном конкретном, но неограничивающем аспекте связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению содержат один из следующих наборов мутаций (т.е. мутаций по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2) в указанных позициях (нумерация по Кабату):

11V в сочетании с 89L;

11V в сочетании с 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 89L, 100aF и 1E или 1D;

11V в сочетании с 14P, 74S, 83R, 89L и 1E или 1D;

11V в сочетании с 110K или 110Q;

11V в сочетании с 112K или 112Q;

11V в сочетании с 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 89L, 100aF, 110K или 110Q, и 1E или 1D;

11V в сочетании с 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 89L, 100aF, 112K или 112Q, и 1E или 1D;

11V в сочетании с 14P, 74S, 83R, 89L, 110K или 110Q, и 1E или 1D;

11V в сочетании с 14P, 74S, 83R, 89L, 112K или 112Q, и 1E или 1D;

11V в сочетании с 89L и 110K или 110Q; или

11V в сочетании с 89L и 112K или 112Q;

и имеют CDR, которые являются такими же, как CDR, которые присутствуют в последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 или 105 (например, по Abm) и имеют общую степень идентичности по последовательности с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 или 2, которая описана в данном документе.

В другом конкретном, но неограничивающем аспекте связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению содержат один из следующих наборов мутаций (т.е. мутаций по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2) в указанных позициях (нумерация по Кабату):

89L в сочетании с 11V;

89L в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 100aF и 1E или 1D;

89L в сочетании с 11V, 14P, 74S, 83R и 1E или 1D;

89L в сочетании с 110K или 110Q;

89L в сочетании с 112K или 112Q;

89L в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 100aF, 110K или 110Q и 1E или 1D;

89L в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 100aF, 112K или 112Q и 1E или 1D;

89L в сочетании с 11V, 14P, 74S, 83R, 110K или 110Q и 1E или 1D;

89L в сочетании с 11V, 14P, 74S, 83R, 112K или 112Q и 1E или 1D;

89L в сочетании с 11V и 110K или 110Q; или

89L в сочетании с 11V и 112K или 112Q;

и имеют CDR, которые являются такими же, как CDR, которые присутствуют в последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 или 105 (например, по Abm) и имеют общую степень идентичности по последовательности с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 или 2, которая описана в данном документе.

В другом конкретном, но неограничивающем аспекте связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению содержат один из следующих наборов мутаций (т.е. мутаций по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2) в указанных позициях (нумерация по Кабату):

110K или 110Q в сочетании с 11V;
 110K или 110Q в сочетании с 89L;
 110K или 110Q в сочетании с 11V и 89L;
 110K или 110Q в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 89L и 100aF, и 1E или 1D;
 110K или 110Q в сочетании с 11V, 14P, 74S, 83R, 89L и 1D; или
 110K или 110Q в сочетании с 11V, 14P, 74S, 83R, 89L и 1E, и имеют CDR, которые являются такими же, как CDR, которые присутствуют в последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 или 105 (например, по Abm) и имеют общую степень идентичности по последовательности с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 или 2, которая описана в данном документе.

В другом конкретном, но неограничивающем аспекте связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению содержат один или несколько из следующих наборов мутаций (т.е. мутаций по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2) в указанных позициях (нумерация по Кабату):

112K или 112Q в сочетании с 11V;
 112K или 112Q в сочетании с 89L;
 112K или 112Q в сочетании с 11V и 89L;
 112K или 112Q в сочетании с 11V, 14P, 52aV, 73S или 73Q, или 73P, 74S, 83R, 89L и 100aF, и 1E или 1D; или

112K или 112Q в сочетании с 11V, 14P, 74S, 83R, 89L и 1E или 1D;
 и имеют CDR, которые являются такими же, как CDR, которые присутствуют в последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 или 105 (например, по Abm) и имеют общую степень идентичности по последовательности с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 или 2, которая описана в данном документе.

В другом аспекте связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению содержат T или L в позиции 89 и имеют CDR, которые являются такими же, как CDR, которые присутствуют в последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 или 105 (например, по Abm) и имеют общую степень идентичности по последовательности с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 или 2, которая описана в данном документе.

В другом аспекте связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению содержат V в позиции 11 и L в позиции 89, и имеют CDR, которые являются такими же, как CDR, которые присутствуют в последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 9-40, 57, 98, 99, 101, 102, 103, 104 или 105 (например, по Abm) и имеют общую степень идентичности по последовательности с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 или 2, которая описана в данном документе.

Как уже было указано, предпочтительно, чтобы связывающие PD1 молекулы по изобретению в соответствии с вышеприведенными аспектами дополнительно содержали бы подходящее сочетание мутации E1D, мутации L11V, мутации A14, мутации W52aV, мутации N73S или мутации N73Q, или мутации N73P, мутации A7 4S, мутации K83R, мутации I89L и/или мутации W100aF и, предпочтительно, подходящее сочетание любых двух этих мутаций, например, все эти мутации. Когда связывающая PD1 молекула является моновалентной, или ее связывающий PD1 фрагмент присутствует на N-конце полипептида, предпочтительно, чтобы он также имел мутацию E1D.

В другом конкретном, но неограничивающем аспекте, изобретение относится к одиночному вариативному домену иммуноглобулина, который содержит аминокислотную последовательность или состоит по существу из аминокислотной последовательности, выбранной из одной из следующих аминокислотных последовательностей: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, или SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 или SEQ ID NO: 105.

В другом конкретном, но неограничивающем аспекте, изобретение относится к одиночному вариативному домену иммуноглобулина, который представляет собой аминокислотную последовательность или состоит по существу из аминокислотной последовательности, выбранной из одной из следующих аминокислотных последовательностей: SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104 и SEQ ID NO: 105.

Также, как уже указано в настоящем документе, аминокислотные остатки связывающей PD1 молекулы (например, ISVD, такого как нанотела) нумеруются в соответствии с общей нумерацией для VH, предложенной в статье Rabat et al. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91) и примененной к VHH-доменам верблюдовых в статье Riechmann and Muyldermans, J. Immunol. Methods 2000 Jun 23; 240 (1-2): 185-195; или в ссылках в настоящем документе. Следует отметить, что, как хорошо известно в данной области для VH- и для VHH-

доменов, общее количество аминокислотных остатков в каждом из CDR может варьировать и может не соответствовать общему количеству аминокислотных остатков, указанных в системе нумерации Кабата (то есть одна или несколько позиций в соответствии с нумерацией Кабата могут быть не заняты в реальной последовательности, или фактическая последовательность может содержать больше аминокислотных остатков, чем число, допускаемое нумерацией Кабата). Это означает, что, как правило, нумерация по Кабату может соответствовать или не соответствовать фактической нумерации аминокислотных остатков в реальной последовательности. Однако, в общем, согласно нумерации Кабата и независимо от количества аминокислотных остатков в CDR, позиция 1 в соответствии с нумерацией Кабата соответствует началу FR1 и, взаимнообразно, позиция 36 в соответствии с нумерацией Кабата соответствует началу FR2 и, взаимнообразно, позиция 66 в соответствии с нумерацией Кабата соответствует началу FR3 и, взаимнообразно, а позиция 103 в соответствии с нумерацией Кабата соответствует началу FR4.

Альтернативные способы нумерации аминокислотных остатков доменов VH, которые также могут быть применены аналогично к доменам VHH верблюдовых и нанотел, представляют собой способ, описанный Chothia et al. (Nature 342, 877-883 (1989)), так называемое "определение AbM" и так называемое "контактное определение". Однако в настоящем описании, аспектах и фигурах, будет соблюдаться нумерация по Кабату, адаптированная к VHH-доменам Рихманом и Муйльдерманом, если не указано иное.

Эти и другие аспекты, варианты осуществления, преимущества, варианты применения и способы использования изобретения будут очевидны из дальнейшего описания в настоящем документе.

Соответственно, в дополнительном аспекте изобретение относится к полипептидам или другим химическим объектам, которые содержат или по существу состоят из по меньшей мере одного (такого, как один, два или три) связывающего PD1 фрагмента, описанного в настоящем документе.

Связывающие PD1 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по изобретению могут быть слиты с одной или несколькими другими аминокислотными последовательностями, химическими объектами или фрагментами. Эти другие аминокислотные последовательности, химические объекты или фрагменты могут придать одно или несколько желаемых свойств получаемым в результате связывающим PD1 молекулам по изобретению и/или могут изменить желательные свойства полученных связывающих PD1 молекул по изобретению, например, обеспечивая получаемые в результате связывающие PD1 молекулы по изобретению требуемой биологической и/или терапевтической активностью (например, обеспечивая получаемые в результате связывающие PD1 молекулы по изобретению аффинностью и предпочтительной эффективностью против другой терапевтически важной мишени, так что полученный полипептид становится "биспецифичным" в отношении PD1 и другой терапевтически значимой мишени, такой как CTLA4, LAG3, BTLA или CD27), обеспечивая желаемый период полувыведения и/или иным образом модифицируя или улучшая фармакокинетические и/или фармакодинамические свойства, нацеливая связывающую PD1 молекулу на конкретные клетки, ткани или органы (включая раковые клетки и раковые ткани) для обеспечения цитотоксического эффекта и/или для работы в качестве детектируемого тэга или метки. Некоторые неограничивающие примеры таких других аминокислотных последовательностей, химических объектов или фрагментов приведены далее:

один или несколько подходящих линкеров (таких как линкер 9GS, 15GS или 35GS (любая комбинация из 9, 15, 20 или 35 аминокислот G и S, такая как, например,

GGGGGGGS (9GS-линкер, SEQ ID NO: 125),

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGS (20GS-линкер, SEQ ID NO: 100) или

GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGS (35GS-линкер, SEQ ID NO: 58)) или (GGGS)_n, где n составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10); и/или

один или несколько связывающих фрагментов, связывающих доменов или связывающих элементов, которые направлены против терапевтически значимой мишени, отличной от PD1 (то есть, чтобы получить связывающую PD1 молекулу (например, ISVD, такой как нанотело) по изобретению, которая является биспецифичной в отношении PD1 и другой терапевтически значимой мишени, например, в отношении другого эпитопа PD1, CD27, LAG3, CTLA4, BTLA, TIM3, ICOS, B7-H3, B7-H4, CD137, GITR, PD-L1, PD-L2, ILT1, ILT2, CEACAM1, CEACAM5, TIM3, TIGIT, VISTA, ILT3, ILT4, ILT5, ILT6, ILT7, ILT8, CD40, OX40, CD137, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, NKG2A, NKG2C, NKG2E, IL-10, IL-17, TSLP); и/или

один или несколько связывающих доменов или связывающих элементов, которые обеспечивают увеличение периода полувыведения (например, связывающий домен или связывающий элемент, который может связываться с сывороточным белком, таким как сывороточный альбумин, например, сывороточный альбумин человека), например ALB11002; и/или

один или несколько связывающих доменов или связывающих элементов, которые направляют связывающую PD1 молекулу (например, ISVD, такой как нанотело) в желаемую клетку, ткань или орган (например, раковую клетку); и/или

один или несколько связывающих доменов или связывающих элементов, которые обеспечивают повышенную специфичность к PD1 (обычно они могут связываться с PD1, но, как правило, сами по себе не могут быть функциональными против PD1); и/или

связывающий домен, связывающий элемент или другой химический объект, который позволяет

связывающей PD1 молекуле (например, ISVD, такому как нанотело) интернализироваться в желаемую клетку (например, интернализирующее анти-EGFR нанотело, описанное в WO 05/044858); и/или

фрагмент, который увеличивает период полувыведения, такой как подходящая полиэтиленгликолевая группа (т.е. ПЭГилирование) или аминокислотная последовательность, которая увеличивает период полувыведения, такая как человеческий сывороточный альбумин или его подходящий фрагмент (например, слияние с альбумином) или, например, связывающий сывороточный альбумин пептид, описанный в WO 2008/068280; и/или

полезная нагрузка, такая как цитотоксическая полезная нагрузка; и/или

детектируемая метка или тэг, такие как радиоактивная метка или флуоресцентная метка; и/или

тэг, который может способствовать иммобилизации, обнаружению и/или очистке связывающей PD1 молекулы (например, ISVD, такого как нанотела), такой как HIS (например, HHHHHH, SEQ ID NO: 93, или HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH; SEQ ID NO: 94) или FLAG (DYKDDDK (SEQ ID NO: 95)) (например, FLAG3); и/или

тэг, который может быть функционализирован, например С-концевой GGC- или GGGC-тэг; и/или

С-концевое удлинение X(n) (например, -Ala), которое может представлять собой удлинение, дополнительно описанное в настоящем документе для связывающих PD1 молекул (например, ISVD, таких как нанотел) по изобретению и/или описанное в WO 12/175741 или PCT/EP2015/060643 (WO-015/173325).

В объем изобретения входят связывающая PD1 молекула (например, ISVD, такой как нанотело), которая включает одну или несколько частей или фрагментов антитела (предпочтительно, человека), например, Fc-часть или ее функциональный фрагмент или один или несколько константных доменов, и/или из антител верблюдовых, состоящих только из тяжелой цепи (например, один или несколько константных доменов).

Связывающие LAG3 молекулы.

Настоящее изобретение относится к улучшенным связывающим LAG3 молекулам, например, к улучшенным анти-LAG3-ISVD и, в частности, к улучшенным LAG3-нанотелам, например 11B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L); F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L); F0237611B09 (E1D, L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L)-35GS-ALB11002-A; или F0237611B09 (E1D, L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L)-35GS-F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L)-35GS-ALB11002-A.

Как обсуждалось, "связывающие LAG3 молекулы" по настоящему изобретению представляют собой любую из описанных в настоящем изобретении молекул, которые связываются с LAG3 (например, ISVD, такой как нанотело), а также любую поливалентную или полиспецифичную связывающую молекулу (например, связывающую PD1/LAG3), которая включает такую молекулу, слитую с другой связывающей молекулой. Например, связывающая LAG3 молекула может включать связывающий LAG3 фрагмент, слитый с фрагментом, который связывается с PD1, CD27, CTLA4, HSA, BTLA, TIM3, ICOS, B7-H3, B7-H4, CD137, GITR, PD-L1, PD-L2, ILT1, ILT2 CEACAM1, CEACAM5, TIM3, TIGIT, VISTA, ILT3, ILT4, ILT5, ILT6, ILT7, ILT8, CD40, OX40, CD137, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, NKG2A, NKG2C, NKG2E, IL-10, IL-17, TSLP. Индивидуальный связывающий LAG3 фрагмент можно назвать связывающим LAG3 фрагментом, если он является частью более крупной молекулы, например, поливалентной молекулы, где связывающий LAG3 фрагмент слит с другим связывающим фрагментом, таким как F023700924 или F023700931.

Связывающие LAG3 молекулы по настоящему изобретению включают полипептиды, которые являются вариантами полипептидов, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, но которые мутированы в позициях 1, 11, 14, 41, 43, 62, 74, 83 и/или 89.

Как дополнительно описано в настоящем документе, связывающие LAG3 молекулы по изобретению, предпочтительно, имеют одну и ту же комбинацию CDR (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3), которые присутствуют в 11B09 или в связывающей молекуле, содержащей последовательность 11B09 (SEQ ID NO: 63). См. табл. В-1.

Настоящее изобретение также включает связывающие LAG3 молекулы, которые являются вариантами 11B09, которые содержат аминокислотную последовательность, указанную ниже в таблице В-2. В объем настоящего изобретения входят связывающие LAG3 молекулы, которые включают CDR1, CDR2 и CDR3 указанных вариантов, приведенных ниже в табл. В-2.

Кроме того, настоящее изобретение включает связывающие PD1/LAG3 молекулы, содержащие связывающий LAG3 фрагмент, который включает CDR1, CDR2 и CDR3, или аминокислотную последовательность 11B09 или один из ее вариантов, приведенных ниже в табл. В-2.

Таблица В-1

Связывающая LAG3 молекула, 11B09

Описание	Последовательность
11B09 (может называться в настоящем документе «F0237611B09» или «611B09») SEQ ID NO: 63	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS GRTFSDYVMG WFRQARGNEREF VA AISESGGRTHYADAVKGRFTISRDN AKNTLYLQMN SLKPEDTAVY YCAT TLLWWTSEYAPIKANDYDY WGQGT LVTVSS

Таблица В-2

Связывающие LAG3 молекулы, являющиеся оптимизированными по последовательности вариантами 11B09

Описание	Последовательность
11B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) Название: F023700842 SEQ ID NO: 64	EVQLVE SGGGVVQPGG SLRLSCAAS GRTFSDYVMG W FRQAPGKERE FVA AISESGGRTHYADSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRPEDTALYYC AT TLLWWTSEYAPIKANDYDY WGQGT LVTVSS
CDR1 (SEQ ID NO: 65)	GRTFSDYVMG или DYVMG
CDR2 (SEQ ID NO: 66)	AISESGGRTH или AISESGGRTHYADSVKG ; где X представляет собой A или S (например, AISESGGRTHYADAVKG или AISESGGRTHYADSVKG)

CDR3 (SEQ ID NO: 67)		<u>TLLWWTSEYAPIKANDYDY</u>
Моновалентный (оптимизированный последовательности) 611B09+ALB11002 Название: F023701128 Описание: F0237611B09 (E1D, L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) -35GS-ALB11002-A Мишень: hLAG-3 SEQ ID NO: 96	SO по	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGW FRQAPGKEREFVA <u>AISESGGRTHYADSVKGRFTISR</u> DNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT <u>TLLWWTSEYA</u> <u>PIKANDYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNS LRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLTYLQMNSLRPE DTALYYCTIGGSLSRSSQGTLTVTVSSA
Бивалентный (оптимизированный последовательности) 611B09+ALB11002 Название: F023700962 Описание: F0237611B09 (E1D, L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) -35GS- F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) -35GS-ALB11002-A Мишень: hLAG-3 SEQ ID NO: 97	SO по	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGW FRQAPGKEREFVA <u>AISESGGRTHYADSVKGRFTISR</u> DNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT <u>TLLWWTSEYA</u> <u>PIKANDYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVA <u>AISE</u> <u>SGGRTHYADSVKGRFTISR</u> DNSKNTLYLQMNSLRPE DTALYYCAT <u>TLLWWTSEYAPIKANDYDY</u> WGQGLTVT VSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI SRDNAKTTLTYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSS QGTLTVTVSSA
Название: F023700594 Описание: F0237611B09-35GS-F0237611B09-35GS-ALB11002 Мишень: hLAG-3 SEQ ID NO: 127		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGW FRQARGNEREFVA <u>AISESGGRTHYADAVKGRFTISR</u> DNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAT <u>TLLWWTSEYA</u> <u>PIKANDYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGG GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGS LRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQARGNEREFVA <u>AISE</u> <u>SGGRTHYADAVKGRFTISR</u> DNKNTLYLQMNSLKPE DTAVYYCAT <u>TLLWWTSEYAPIKANDYDY</u> WGQGLTVT VSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG
		GSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTI SRDNAKTTLTYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSS QGTLTVTVSS

*CDR связывающих LAG3 молекул подчеркнуты и/или выделены полужирным шрифтом

Настоящее изобретение включает варианты осуществления, в которых связывающий LAG3 фрагмент по изобретению (например, в связывающей PD1/LAG3 молекуле) включает один, два или три CDR связывающей LAG3 молекулы, описанный выше в таблице B-1 или B-2 (например, SEQ ID NO: 63, 64, 95, 96 или 97), где каждая область содержит 0, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, например, консервативных замен, и/или имеет 100, 99, 98, 97, 96 или 95% идентичности по последовательности с последо-

вательностями CDR, приведенными в табл. В-1 или В-2, где связывающая LAG3 молекула по изобретению, содержащая такие CDR, сохраняет способность связываться с LAG3. В варианте осуществления изобретения первая аминокислота связывающей LAG3 молекулы по настоящему изобретению представляет собой Е. В одном варианте осуществления изобретения первой аминокислотой связывающей LAG3 молекулы по настоящему изобретению является Е или D.

Настоящее изобретение включает связывающую LAG3 молекулу F023700656 (11B09 (E1D), SEQ ID NO: 63 (E1D)).

Номера остатков по системе Кабата для некоторых остатков связывающих LAG3 молекул, указанных в табл. В-1 или В-2, показаны в последовательности ниже:

EVQLVE SGGGV₁₁VQP₁₄GG SRLSCAASG RTFSDYVMGW FRQAP₄₁GK₄₃ERE FVA AISESGG RTHYADS₆₂VKG RFTISRDNS₇₄K NTLYLQMNSL R₈₃PEDTAL₈₉YYC ATTLLWWTSE YAPIKANDYD YWGQGTLLTV SS (SEQ ID NO: 64). Необязательно, остатком 1 является D.

Настоящее изобретение включает любую связывающую LAG3 молекулу, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, 64 или 127 (или имеющую связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 96 или 97) (а также связывающие LAG3 молекулы, имеющее мутацию E1D или D1E), или аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более (например, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности по аминокислотной последовательности (т.е. при сравнении полноразмерных аминокислотных последовательностей), где связывающая LAG3 молекула сохраняет способность связываться с LAG3 и, необязательно, включает связывающую HSA молекулу.

Настоящее изобретение включает связывающие LAG3 молекулы, такие как LAG3 ISVD (например, нанотела), имеющие CDR1, CDR2 и CDR3 связывающей молекулы, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 63, 64, 96, 97 или 127 (или ее вариант, описанный в настоящем документе), например, содержащие следующие CDR:

CDR1, которая содержит аминокислотную последовательность GRTFSDYVMG (SEQ ID NO: 65); и

CDR2, которая содержит аминокислотную последовательность AISESGG RTH (SEQ ID NO: 66); и

CDR3, которая содержит аминокислотную последовательность TLLWWTSEYAPIKANDYDY (SEQ ID NO: 67);

и, необязательно, имеющие

степень идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 63, 64, 96, 97 или 127 (в которой любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также CDR, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей) по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95% (где CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также мутации в позициях 1, 11, 14, 41, 43, 62, 74, 76, 83, 89, 100 и/или 105 не учитываются при определении степени идентичности последовательности);

и/или

не более 7, например, не более 5, предпочтительно, не более 3, например, только 3, 2 или 1 "аминокислотных отличий" (определенных в настоящем документе, и не учитывая ни одну из мутаций, приведенных в настоящем документе в позициях 1, 11, 14, 41, 43, 62, 74, 76, 83, 89, 100 и/или 105, которые могут присутствовать, и не учитывая никакое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 63, 64, 96, 97 или 127 (где указанные аминокислотные отличия, если они присутствуют, могут находиться в каркасных областях и/или CDR, но, предпочтительно, присутствуют только в каркасных областях, а не в CDR);

и, необязательно,

С-концевое удлинение, обсуждаемое в настоящем документе, например (X)_n, в котором n составляет от 1 до 10, предпочтительно, от 1 до 5, например, 1, 2, 3, 4 или 5 (и предпочтительно, 1 или 2, 1); и каждый X представляет собой аминокислотный остаток (предпочтительно, природный), который независимо выбран и, предпочтительно, независимо выбран из группы, состоящей из аланина (А), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I).

Настоящее изобретение также включает связывающие LAG3 молекулы, слитые с одним или несколькими увеличивающими период полувыведения (время полужизни) молекулами, такими как ISVD, который связывается с сывороточным альбумином человека, например ALB11002.

Полиспецифичные связывающие молекулы.

Настоящее изобретение включает связывающие PD1 и связывающие LAG3 молекулы, которые могут быть слиты в одной поливалентной полиспецифичной молекуле, которая связывается с PD1 и LAG3 (связывающая PD1/LAG3 молекула), и в варианте осуществления изобретения такие связывающие молекулы связываются с одним или несколькими увеличивающими время полужизни молекулами, которые увеличивают период полувыведения связывающих молекул в теле субъекта. В варианте осуществления изобретения увеличивающая период полувыведения молекула представляет собой ISVD (например, нанотело), которая специфично связывается с сывороточным альбумином человека (HSA), например, ALB11002. В варианте осуществления изобретения полиспецифичная связывающая молекула представляет собой F023700899, F023700931, F023701016, F023701017, F023700924, F023700969, F023700970,

F023701163, F023701168, F023701173, F02370117, F023701176, 8, F023701161, F023701166, F023701171, F023701176, F023701162, F023701167, F023701172 или F023701177, описанные в настоящем документе.

В варианте осуществления изобретения связывающая PD1/LAG3 молекула содержит

(1) связывающий PD1 элемент, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 любой из связывающих PD1 молекул, указанных в табл. A-1 или A-2, причем, необязательно, каждый независимо содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен (например, консервативных мутаций) или

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность
IHAMG (SEQ ID NO: 3) или GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6);

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность
VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4, где X представляет собой W или V, например, W) или
VITXSGGITY (SEQ ID NO: 7, где X представляет собой W или V, например, W); и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность
DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, где X представляет собой W или F, например, W); и

(2) связывающий LAG3 элемент, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 любой из связывающих LAG3 молекул, указанных в табл. B-1 или B-2, причем, необязательно, каждый независимо содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных замен (например, консервативных мутаций) или

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность
GRTFSDYVMG (SEQ ID NO: 65);

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность
AISESGGRTH (SEQ ID NO: 66); и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность
TLLWWTSEYAPIKANDYDY (SEQ ID NO: 67),

и, необязательно, увеличивающий период полувыведения фрагмент и/или C-концевое удлинение, например связывающий HSA фрагмент, указанный в настоящем документе, и/или, необязательно, C-концевое удлинение, такое как аланин.

В варианте осуществления изобретения связывающий PD1 фрагмент является таким, как указано выше в разделе "Связывающие PD1 молекулы", например, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57, 98, 99, 103, 104 или 105 (необязательно, где остаток 1 представляет собой E или D). В варианте осуществления изобретения связывающий LAG3 элемент является таким, как указано выше в разделе "Связывающие LAG3 молекулы", например, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, 64 или 95 (необязательно, где остаток 1 представляет собой E или D).

Полиспецифичные связывающие молекулы могут включать связывающие PD1 и LAG3 фрагменты и, необязательно, связывающий HSA элемент, а также один или несколько связывающих фрагментов, которые связываются с дополнительным антигеном, таким как CD27, CTLA4, BTLA, TIM3, ICOS, B7-H3, B7-H4, CD137, GITR, PD-L1, PD-L2, ILT1, ILT2 CEACAM1, CEACAM5, TIM3, TIGIT, VISTA, ILT3, ILT4, ILT5, ILT6, ILT7, ILT8, CD40, OX40, CD137, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, NKG2A, NKG2C, NKG2E, IL-10, IL-17 или TSLP.

Когда связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела), содержат один или несколько дополнительных связывающих доменов или связывающих элементов (например, дополнительный по существу нефункциональный связывающий домен или элемент, связывающийся с PD1 и/или LAG3, который обеспечивает повышенную специфичность в отношении PD1 и/или LAG3, связывающий домен или связывающий элемент для терапевтической мишени, отличной от PD1 и/или LAG3 (например, CTLA4, BTLA или CD27), связывающий домен или связывающий элемент для мишени, такой как сывороточный альбумин человека, который обеспечивает увеличенный период полувыведения, и/или связывающий домен или связывающий элемент, который направляет на связывающую PD1 и/или LAG3 молекулу в конкретную клетку, ткань или орган, и/или который позволяет интернализироваться связывающей PD1 и/или LAG3 молекуле в клетку), эти дополнительные связывающие домены или связывающие элементы, предпочтительно, содержат один или несколько ISVD (например, нанотел) и, более предпочтительно, все представляют собой ISVD. Например, и без ограничения, данные один или несколько дополнительных связывающих доменов или связывающих элементов могут представлять собой одно или несколько нанотел (включая VHH, гуманизированный VHH и/или модифицированный под антитела верблюдовых VH, такой как модифицированный под антитела верблюдовых VH человека), однодоменное антитело, которое представляет собой VH-домен или производное VH-домена, dAb, которое представляет собой VH-домен или по существу состоит из него, или которое получено из VH-домена, или даже однодоменное антитело или dAb, которое представляет собой VL-домена или по существу состоит из него. В частности, данные один или несколько связывающих доменов или связывающих элементов, если они присутствуют, могут содержать одно или несколько нанотел, и, в частности, все являются нанотелами. В варианте осуществления изобретения ISVD (например, нанотело), который связывает мишень, отличную от PD1 и/или LAG3, связывается с другой мишенью, такой как HSA, CTLA4, BTLA или CD27.

Когда связывающая PD1 и/или LAG3 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) по изобретению имеет ISVD (например, нанотело) на своем C-конце (например, C-концевой ISVD связывается с PD1

и/или LAG3, или может, например, представлять собой, если присутствует в полипептиде, дополнительный по существу нефункциональный ISVD против PD1 и/или LAG3, который обеспечивает повышенную специфичность в отношении PD1 и/или LAG3, ISVD к терапевтической мишени, отличной от PD1 и/или LAG3, ISVD к мишени, такой как сывороточный альбумин человека, который дает увеличение периода полувыведения, или ISVD, который направляет связывающую PD1 и/или LAG3 молекулу в конкретную клетку, ткань или орган, и/или который позволяет связывающей PD1 и/или LAG3 молекуле интернализироваться в клетку), тогда связывающая PD1 и/или LAG3 молекула (то есть содержащая указанный С-концевой ISVD), предпочтительно, имеет С-концевое удлинение X(n) (например, -Ala), причем С-концевое удлинение может быть таким, как описано в настоящем документе для связывающих PD1 и/или LAG3 молекул по изобретению и/или как описано в WO 12/175741 или PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325).

Когда связывающая PD1 и/или LAG3 молекула содержит в дополнение к одному или нескольким фрагментам, которые связываются с PD1 и/или LAG3, любые другие ISVD (например, нанотела) (причем, данные один или несколько дополнительных ISVD могут, как указано, представлять собой дополнительные по существу нефункциональный ISVD к PD1 и/или LAG3, который обеспечивает повышенную специфичность в отношении PD1 и/или LAG3, ISVD к терапевтической мишени, отличной от PD1 и/или LAG3, ISVD к мишени, такой как сывороточный альбумин человека, который дает увеличенный период полувыведения, и/или ISVD, который направляет полипептид по изобретению на конкретную клетку, ткань или орган, и/или который позволяет интернализацию полипептида по изобретению в клетку), и где такие дополнительные ISVD являются нанотелами или ISVD, которые являются VH-последовательностями, или которые по существу состоят из и/или которые получены из VH-последовательностей, тогда согласно предпочтительному аспекту изобретения указанные один или несколько таких ISVD (и, предпочтительно, все), присутствующих в связывающей PD1 и/или LAG3 молекуле, будут содержать в своей последовательности одну или несколько мутаций каркасной области, которые уменьшают связывание с ранее существовавшими антителами. В частности, согласно этому аспекту изобретения такие дополнительные ISVD могут содержать подходящую комбинацию аминокислотных остатков/мутаций в позициях 1, 11, 14, 74, 83, 89, 110 и/или 112, которые описаны в PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325), и/или которые по существу являются такими, как описано в настоящем документе для связывающих PD1 и/или LAG3 молекул по изобретению. В одном конкретном аспекте, когда связывающая PD1 и/или LAG3 молекула имеет такой ISVD на своем С-конце, тогда указанный ISVD, который присутствует на С-конце и/или образует его, имеет такие мутации каркасной области, которые уменьшают связывание ранее существующими антителами; и указанный С-концевой ISVD, предпочтительно, также будет иметь С-концевое удлинение X(n) (например, -Ala), как описано в настоящем документе.

Когда связывающая PD1 и/или LAG3 молекула должна иметь увеличенный период полувыведения (то есть по сравнению с моновалентной связывающей молекулой, у которой отсутствует увеличивающий период полувыведения фрагмент, такой как ALB11002), тогда связывающая PD1 и/или LAG3 молекула, предпочтительно, содержит по меньшей мере один (например, один) ISVD (например, нанотело), который обеспечивает такой увеличенный период полувыведения (например, ALB11002). Такой ISVD в варианте осуществления изобретения направлен на подходящий сывороточный белок, такой как трансферрин или на сывороточный альбумин (человека). В частности, такой ISVD или нанотело могут представлять собой однодоменное антитело или dAb к сывороточному альбумину человека, как описано, например, в EP 2139918, WO 2011/006915, WO 2012/175400, WO 2014/111550. и могут, в частности, представлять собой связывающееся с сывороточным альбумином нанотело, описанное в WO 2004/041865, WO 2006/122787, WO 2012/175400 или PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325). Особенно предпочтительными связывающими альбумин ISVD являются нанотело Alb-1 (см. WO 2006/122787) или его гуманизированные варианты, такие как Alb-8 (WO 2006/122787, SEQ ID NO: 62), Alb-23 (WO 2012/175400, SEQ ID NO: 1) и другие гуманизированные (и, предпочтительно, также оптимизированные по последовательности) варианты Alb-1 и/или варианты Alb-8 или Alb-23 (или, в целом, ISVD, которые имеют по существу те же CDR, что и Alb-1, Alb-8 и Alb-23).

Как обсуждалось, "связывающими HSA молекулами" по настоящему изобретению являются любые молекулы, такие как описанные в настоящем документе, которые связываются с HSA (например, ISVD, такие как нанотела), а также любые поливалентные или полиспецифичные связывающие молекулы, которые включают такую молекулу, слитую с другим связывающим фрагментом. Индивидуальная связывающая HSA молекула может указываться как связывающий HSA фрагмент, если она является частью более крупной молекулы, например, поливалентной молекулы, где связывающий HSA фрагмент слит с другим связывающим фрагментом.

В варианте осуществления изобретения увеличивающий период полувыведения фрагмент представляет собой ISVD (например, нанотело), который связывается с сывороточным альбумином человека, например ALB11002, как описано ниже в табл. С.

Как дополнительно описано в настоящем документе, связывающие HSA молекулы по изобретению, предпочтительно, имеют такую же комбинацию CDR (то есть CDR1, CDR2 и CDR3), которая присутст-

вует в ALB11002, или содержат последовательность ALB11002 (SEQ ID NO: 59). См. табл. С.

Настоящее изобретение также включает связывающие HSA молекулы, которые являются вариантами ALB11002, которые содержат аминокислотную последовательность, указанную ниже в таблице С. В объем настоящего изобретения входят связывающие HSA молекулы, которые включают CDR1, CDR2 и CDR3 указанных вариантов, приведенных ниже в табл. С.

Кроме того, настоящее изобретение включает связывающие PD1/LAG3 молекулы, содержащее связывающий HSA фрагмент, который включает CDR1, CDR2 и CDR3, или аминокислотную последовательность ALB11002, или один из ее вариантов, приведенных ниже в табл. С.

Таблица С

Нанотело ALB11002 к сывороточному альбумину человека (HSA)

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
59	ALB11002 (может называться в настоящем документе «ALB201»)	EVQLVESGGG XVQPGNSLRL SCAASGFTFS <u>SFGMSWVRQA PGKGLEWVSS ISGSGSDTLY</u> ADSVKGRFTI SRDNAKTTLTY LQMNSLRPED TAXYYCTIGG <u>SLSR</u> SSQGTLY VTVSSA; где X в позициях 11 и 93 представляет собой L или V
60	CDR1	GFTFSSFGMS или SFGMS (аминокислоты 1-5 из SEQ ID NO: 60)
61	CDR2	SISGSGSDTLYADSVKG или SISGSGSDTL (аминокислоты 1-10 из SEQ ID NO: 61)
62	CDR3	GGSLSR

*Необязательно, в ALB11002 отсутствует С-концевой аланин. Необязательно, связывающая HSA молекула содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59, но которая включает мутацию E1D, V11L и/или L93V, например, содержит аминокислотную последовательность EVQLVESGGGWQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNAAKTTLTYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLYTVSS (SEQ ID NO: 59).

В варианте осуществления изобретения первая аминокислота связывающей HSA молекулы по настоящему изобретению представляет собой Е. В варианте осуществления изобретения первая аминокислота связывающей HSA молекулы по настоящему изобретению представляет собой D.

Настоящее изобретение включает варианты осуществления, в которых одна, две или три CDR связывающей HSA молекулы, каждая содержит 0, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен, например, консервативных замен и/или имеет 99, 98, 97, 96 или 95% идентичности по последовательности с последовательностями CDR, представленными в таблице С, где связывающая HSA молекула, имеющая такие CDR, сохраняет способность связываться с HSA.

В варианте осуществления изобретения увеличивающий период полувыведения фрагмент представляет собой HSA-ISVD (например, нанотело), содержащий:

CDR1, которая содержит аминокислотную последовательность GFTFSSFGMS (SEQ ID NO: 60); и

CDR2, которая содержит аминокислотную последовательность SISGSGSDTL (SEQ ID NO: 61); и

CDR3, которая содержит аминокислотную последовательность GGSLSR (SEQ ID NO: 62);

и, необязательно, имеющий

степень идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 59 (в которой любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, а также CDR, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей) по меньшей мере, 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, более предпочтительно, по меньшей мере 95% (где CDR, любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать, не учитываются при определении степени идентичности последовательностей); и/или

не более 7, например, не более 5, предпочтительно, не более 3, например, только 3, 2 или 1 "аминокислотных отличий" (не учитывая любое С-концевое удлинение, которое может присутствовать) с ами-

нокислотной последовательностью SEQ ID NO: 59 (где указанные аминокислотные отличия, если они присутствуют, могут присутствовать в каркасных областях и/или в CDR, но, предпочтительно, присутствуют только в каркасных областях, а не в CDR);

и, необязательно, имеющий:

С-концевое удлинение (X)_n, в котором n составляет от 1 до 10, предпочтительно, от 1 до 5, например, 1, 2, 3, 4 или 5 (и, предпочтительно, 1 или 2, например, 1); и каждый X представляет собой аминокислотный остаток (предпочтительно природный), который независимо выбран и, предпочтительно, независимо выбран из группы, состоящей из аланина (A), глицина (G), валина (V), лейцина (L) или изолейцина (I).

Такой связывающий сывороточный альбумин человека ISVD (например, нанотело), когда он присутствует, может содержать в своей последовательности одну или несколько мутаций каркасной области, которые уменьшают связывание ранее существовавшими антителами. В частности, когда такой связывающий сывороточный альбумин человека ISVD представляет собой нанотело или однодоменное антитело, которое по существу состоит из и/или является производным VH-домена, то связывающий сывороточный альбумин человека ISVD может содержать (подходящую комбинацию) аминокислотных остатков/мутаций в позициях 11, 89, 110 и/или 112, которые описаны в PCT/EP2015/060643 (WO 02015/173325), и/или которые по существу являются такими, как описано в настоящем документе для связывающих PD1 молекул по изобретению. Например, в PCT/EP2015/060643 (WO-015/173325) описан ряд вариантов Alb-1, Alb-8 и Alb-23, которые содержат аминокислотные остатки/мутации в позициях 11, 89, 110 и/или 112, которые уменьшают связывание с ранее существовавшими антителами, которые могут быть использованы в полипептидах по изобретению.

Когда такой связывающий сывороточный альбумин ISVD (например, нанотело) присутствует на С-конце связывающей PD1 и/или LAG3 молекулы, связывающий сывороточный альбумин ISVD (и, как результат, связывающая PD1 и/или LAG3 молекула по изобретению), предпочтительно, имеют С-концевое удлинение X (n), причем С-концевое удлинение может быть таким, как описано в настоящем документе для связывающих PD1 и/или LAG3 молекул по изобретению и/или как описано в WO 12/175741 или в PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325). Например, С-концевое удлинение может представлять собой один остаток аланина. Он также, предпочтительно, имеет мутации, которые уменьшают связывание с ранее существовавшими антителами, такие как (подходящая комбинация) аминокислотных остатков/мутаций в позициях 11, 89, 110 и/или 112, описанных в PCT/EP2015/060643 (WO2015/173325).

Однако, как было указано, в объем изобретения также входят другие способы увеличения периода полувыведения полипептида по изобретению (такие как ПЭГилирование, слияние с альбумином человека или с его подходящим фрагментом, или использование подходящего связывающего альбумин пептида).

В общем, когда связывающая PD1 и/или LAG3 молекула по изобретению имеет увеличенный период полувыведения (например, благодаря присутствию увеличивающего период полувыведения ISVD (например, нанотела) или с помощью любого другого подходящего способа увеличения периода полувыведения), полученная связывающая PD1 и/или LAG3 молекула по изобретению, предпочтительно, имеет период полувыведения (как определено в настоящем документе), который по меньшей мере в 2 раза, предпочтительно, по меньшей мере в 5 раз, например, по меньшей мере в 10 раз или более чем в 20 раз превышает период полувыведения связывающей PD1 и/или LAG3 молекулы по изобретению, не имеющей увеличивающего период полувыведения фрагмента (измеряемого у человека и/или в подходящей животной модели, такой как мыши или яванские макаки). В частности, связывающая PD1 и/или LAG3 молекула по изобретению, предпочтительно, имеет период полувыведения (определенный в настоящем документе) у человека по меньшей мере 1 день, предпочтительно, по меньшей мере 3 дня, более предпочтительно, по меньшей мере 7 дней, например, по меньшей мере 10 дней.

Из данного описания будет ясно, что связывающие PD1 и связывающие LAG3 молекулы, которые основаны на одном или нескольких ISVD (например, нанотела), могут иметь разные "форматы", т.е. по существу, являться моновалентными, двухвалентными или трехвалентными, могут быть моноспецифичными, биспецифичными, триспецифичными и могут быть бипаратопными (как определено в настоящем документе и, например, в WO 2009/68625). Например, связывающая PD1 или связывающая LAG3 молекула по изобретению может быть: одновалентной, то есть содержащей единственный связывающий PD1 или LAG3 фрагмент (например, ISVD, такой как нанотело). Как уже было указано, при использовании в одновалентном формате связывающая PD1 или связывающая LAG3 молекула по изобретению, предпочтительно, имеет С-концевое удлинение X(n), описанное выше. Такая связывающая PD1 или связывающая LAG3 молекула по изобретению также может иметь увеличенный период полувыведения;

может быть двухвалентной или трехвалентной и моноспецифичной. Например, в варианте осуществления изобретения такая связывающая PD1 или связывающая LAG3 молекула по изобретению содержит два или большее число ISVD (например, нанотел) к PD1 или к LAG3, соответственно, которые могут быть одинаковыми или разными; и когда они являются разными, они могут быть направлены против одного и того же эпитопа PD1 или LAG3, или против разных эпитопов на PD1 или LAG3 (в последнем случае, чтобы обеспечить бипаратопную или полипаратопную связывающую PD1 или связывающую LAG3 молекулу по изобретению). Такая связывающая PD1 или связывающая LAG3 молекула по изобретению

также может иметь удлиненный период полувыведения;

может быть двухвалентной, трехвалентной (или поливалентной) и биспецифичной или триспецифичной (или полиспецифичной). Например, в варианте осуществления изобретения такая связывающая PD1 молекула по изобретению будет направлена на PD1 и по меньшей мере на одну другую мишень, такую как, например, CTLA-4, LAG-3, BTLA и/или CD27; например, будет содержать связывающий PD1 фрагмент и связывающий CTLA4 фрагмент; связывающий PD1 фрагмент и связывающий BTLA фрагмент; связывающий PD1 фрагмент и связывающий LAG3 фрагмент (то есть, будет представлять собой связывающую PD1/LAG3 молекулу); или связывающий PD1 фрагмент, связывающий LAG3 фрагмент и связывающий BTLA фрагмент. Как описано в настоящем документе, указанная другая мишень может являться, например, другой терапевтически значимой мишенью (то есть отличной от PD1), таким образом давая связывающую PD1 молекулу по изобретению, которая является биспецифичной в отношении PD1 и другой терапевтической мишени. Указанная другая мишень также может являться мишенью, которая обеспечивает увеличенный период полувыведения (такой как сывороточный альбумин человека), таким образом давая связывающую PD1 молекулу по изобретению, которая имеет увеличенный период полувыведения. Как уже было указано в настоящем документе, такая другая мишень может также направлять связывающую PD1 молекулу по изобретению на конкретные клетки, ткани или органы, или может обеспечить интернализацию связывающей PD1 молекулы по изобретению в клетке. Также возможно объединение этих подходов/ISVD, например, чтобы обеспечить связывающую PD1 молекулу по изобретению, которая является биспецифичной в отношении PD1 и по меньшей мере в отношении одной другой терапевтически значимой мишени, и имеет увеличенный период полувыведения.

Кроме того, предпочтительно, чтобы когда данные связывающие PD1 и связывающие LAG3 молекулы включают один или несколько ISVD (например, нанотел), отличных от связывающего PD1 фрагмента или связывающего LAG3 фрагмента, по меньшей мере один и, предпочтительно, все эти другие ISVD содержали бы в своей последовательности одну или несколько мутаций каркасной области, которые уменьшают связывание с ранее существовавшими антителами (такие как, в частности, комбинация аминокислотных остатков/мутаций в позициях 1, 11, 14, 52a, 73, 74, 83, 89, 100a, 110 и/или 112, а именно, как описано в настоящем документе для связывающих PD1 и связывающих LAG3 молекул по изобретению, и/или как в общем описано в РСТ/EP2015/060643 (WO-015/173325)). Также, когда такие связывающие PD1 или связывающие LAG3 молекулы по изобретению содержат на своем С-конце связывающий PD1 фрагмент или связывающий LAG3 фрагмент, соответственно, тогда указанный С-концевой связывающий PD1 фрагмент или связывающий LAG3 фрагмент (и, как результат, связывающая PD1 молекула или связывающая LAG3 молекула по изобретению), предпочтительно, будут иметь С-концевое удлинение X(n), описанное в настоящем документе. Аналогично, когда такие связывающие PD1 молекулы и связывающие LAG3 молекулы по изобретению имеют другой ISVD на своем С-конце (то есть не PD1-связывающий фрагмент или LAG3-связывающий фрагмент, но, например, увеличивающий период полувыведения ISVD), тогда указанный С-концевой ISVD (и в результате связывающая PD1 молекула или связывающая LAG3 молекула по изобретению, предпочтительно, будут иметь С-концевое удлинение X(n), описанное в настоящем документе, и/или будут содержать в своей последовательности одну или несколько мутаций каркасной области, которые уменьшают связывание с ранее существующими антителами (опять же, как дополнительно описано в настоящем документе и в РСТ/EP 2015/060643 (WO 2015/173325)).

Как будет понятно специалисту в данной области техники, когда связывающая PD1 или связывающая LAG3 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) по изобретению предназначены для местного применения (например, на коже или для глаз) или, например, должны иметь местное терапевтическое действие в каком-то месте, например, в желудочно-кишечном тракте (т.е. после перорального введения или введения с помощью суппозитория) или в легких (то есть после введения путем ингаляции), или иным образом должны непосредственно наноситься на свое предполагаемое место действия (например, путем прямой инъекции), то связывающей PD1 молекуле или связывающей LAG3 молекуле по изобретению обычно не требуется увеличение периода полувыведения. Кроме того, для лечения определенных острых состояний или заболеваний может быть предпочтительным отсутствие продолжительного периода полувыведения. В этих случаях будет предпочтительным использование одновалентной связывающей PD1 молекулы или связывающей LAG3 молекулы по изобретению или другой связывающей PD1 молекулы или связывающей LAG3 молекулы по изобретению (содержащей связывающий PD1 или связывающий LAG3 элемент) без увеличения периода полувыведения, например, связывающей PD1 молекулы или связывающей LAG3 молекулы по изобретению, которая является бивалентной или бипаратопной по отношению к PD1 или LAG3.

Некоторые предпочтительные, но неограничивающие примеры таких связывающих PD1 молекул и связывающих LAG3 молекул по изобретению схематически представлены ниже в таблицах D-1a и D-1b, и каждый из них является дополнительным аспектом изобретения. Другие примеры подходящих полипептидов по изобретению без увеличения периода полувыведения будут очевидны для квалифицированного специалиста на основании описания в настоящем документе.

Таблица D-1a

Схематическое представление некоторых связывающих PD1 и/или LAG3 молекул по изобретению без увеличивающего период полувыведения ISVD

[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-X (n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]- [Другой фрагмент]- [Другой фрагмент]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]- [Другой фрагмент]- [Другой фрагмент]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]- [Другой фрагмент]- [Другой фрагмент]-X (n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]- [Другой фрагмент]- [Другой фрагмент]-X (n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-X (n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Другой фрагмент]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Другой фрагмент]-

X (n)
[Другой фрагмент]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]
[Другой фрагмент]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-X (n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Targeting unit]
[Направляющий фрагмент]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Направляющий фрагмент]-X (n)
[Направляющий фрагмент]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-X (n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Направляющий фрагмент]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Направляющий фрагмент]-X (n)
[Направляющий фрагмент]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]
[Направляющий фрагмент]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-X (n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-X (n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-X (n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Другой фрагмент]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Другой фрагмент]-X (n)
[Другой фрагмент]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]
[Другой фрагмент]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-X (n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Направляющий фрагмент]
[Направляющий фрагмент]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]

[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]–[Направляющий фрагмент]–X(n)
[Направляющий фрагмент]–[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]–X(n)
Условные обозначения: – «[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]» представляет связывающий PD1 домен или фрагмент, или элемент, такой как ISVD 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L), описанный в настоящем документе – «-» представляет либо прямую ковалентную связь, либо подходящий линкер, такой как линкер 9GS, 15GS или 35GS – «X(n)» представляет C-концевое удлинение, описанное в настоящем документе, такое как одиночный остаток аланина. – «[Другой фрагмент]» представляет связывающий домен или связывающий элемент (например, ISVD, такой как нанотело), связывающие эпитоп, который отличается от PD1, например, один или несколько из CTLA4-, BTLA-, LAG3- и/или CD27-ISVD, такой как LAG3-ISVD, 11B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L), описанный в настоящем документе – «[Направляющий фрагмент]» представляет связывающий домен или связывающий элемент (и, в частности, ISVD, такой как нанотело), которые направляют полипептид по изобретению в конкретную клетку, ткань или орган

Таблица D-Ib

Схематическое представление некоторых связывающих PD1 и/или LAG3 молекул по изобретению без увеличивающего период полувыведения ISVD

[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]–X(n)
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]–[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]–[Другой фрагмент]–[Другой фрагмент]
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]–[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]–[Другой фрагмент]–[Другой фрагмент]
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]–[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]–[Другой фрагмент]–[Другой фрагмент]–X(n)

[illegible]

X (n)
[Другой фрагмент] – [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]
[Другой фрагмент] – [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – X (n)
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – [Направляющий фрагмент]
[Направляющий фрагмент] – [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – [Направляющий фрагмент] – X (n)
[Направляющий фрагмент] – [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – X (n)
Условные обозначения:
– «[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]» представляет связывающий LAG3 домен или фрагмент, или элемент, такой как ISVD 11B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L), описанный в настоящем документе
– «-» представляет либо прямую ковалентную связь, либо подходящий линкер, такой как линкер 9GS, 15GS или 35GS
– «X (n)» представляет С-концевое удлинение, описанное в настоящем документе, такое как одиночный остаток аланина.
– «[Другой фрагмент]» представляет связывающий домен или связывающий элемент (например, ISVD, такой как нанотело), связывающие эпитоп, который отличается от PD1, например, один или несколько из CTLA4-, BTLA-, LAG3- и/или CD27-ISVD, такой как PD1-ISVD 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L), описанный в настоящем документе
– «[Направляющий фрагмент]» представляет связывающий домен или связывающий элемент (и, в частности, ISVD, такой как нанотело), которые направляют полипептид по изобретению в конкретную клетку, ткань или орган

Как будет понятно специалисту в данной области техники, когда связывающая PD1 или связывающая LAG3 молекула (например, содержащая ISVD, такой как нанотело) по изобретению предназначены для системного введения и/или для профилактики и/или лечения хронического заболевания или расстройства, обычно будет предпочтительно, чтобы указанная связывающая PD1 или связывающая LAG3 молекула по изобретению имела увеличенный период полувыведения (как описано в настоящем документе). Более предпочтительно, чтобы такая связывающая PD1 или связывающая LAG3 молекула по изобретению содержала увеличивающий период полувыведения ISVD (например, нанотело), такой как, предпочтительно, ISVD и, в частности, нанотело, связывающееся с сывороточным альбумином человека (как описано в настоящем документе).

Некоторые предпочтительные, но неограничивающие примеры такой связывающей PD1 или связывающей LAG3 молекулы по изобретению схематически представлены в таблицах D-2a и D-2b ниже, и каждый из них является дополнительным аспектом изобретения. Другие примеры подходящей связывающей PD1 или связывающей LAG3 молекулы по изобретению с увеличенным периодом полувыведения будут очевидны для квалифицированного специалиста на основании приведенного в настоящем документе описания. В общем, для полипептидов по изобретению с увлеченным периодом полувыведения предпочтительным является наличие С-концевого удлинения.

Таблица D-2a

Схематическое представление некоторых связывающих PD1 и/или LAG3 молекул по изобретению с увеличивающим период полувыведения (HLE) ISVD

[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [HLE]
[HLE] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [HLE] -X (n)
[HLE] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] -X (n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [HLE]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [HLE] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]
[HLE] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [Связывающий PD-1

фрагмент по изобретению]-[HLE]-X(n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[HLE]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-X(n)
[HLE]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-X(n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Другой фрагмент]-[HLE]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Другой фрагмент]-[Другой фрагмент]-[HLE]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Другой фрагмент]-[HLE]-X(n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Другой фрагмент]-[Другой фрагмент]-[HLE]-X(n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[HLE]-[Другой фрагмент]
[HLE]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Другой фрагмент]
[HLE]-[Другой фрагмент]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]
[Другой фрагмент]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[HLE]
[Другой фрагмент]-[HLE]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Другой фрагмент]-[HLE]-X(n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[HLE]-[Другой фрагмент]-X(n)
[HLE]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Другой фрагмент]-X(n)
[HLE]-[Другой фрагмент]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-X(n)
[Другой фрагмент]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[HLE]-X(n)

[Другой фрагмент] - [HLE] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - X (n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [Направляющий фрагмент] - [HLE]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [HLE] - [Направляющий фрагмент]
[HLE] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [Направляющий фрагмент]
[Направляющий фрагмент] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [HLE]
[Направляющий фрагмент] - [HLE] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]
[HLE] - [Направляющий фрагмент] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [Направляющий фрагмент] - [HLE] - X (n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [HLE] - [Направляющий фрагмент] - X (n)
[HLE] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [Направляющий фрагмент] - X (n)
[Направляющий фрагмент] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [HLE] - X (n)
[Направляющий фрагмент] - [HLE] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - X (n)
[HLE] - [Направляющий фрагмент] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - X (n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [Направляющий фрагмент] - [HLE]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [HLE] - [Направляющий фрагмент]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [HLE] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [Направляющий фрагмент]
[HLE] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [Направляющий фрагмент]
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению] - [PD-1 binder of the

[illegible]

[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[HLE]-X(n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[HLE]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-X(n)
[HLE]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-X(n)
[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]-[Другой фрагмент]-[HLE]
Условные обозначения: - «[Связывающий PD-1 фрагмент по изобретению]» представляет связывающий PD1 домен или связывающий элемент, такой как PD1-ISVD 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L), описанный в настоящем документе - «-» представляет либо прямую ковалентную связь, либо подходящий линкер, такой как линкер 9GS, 15GS или 35GS - «X(n)» представляет C-концевое удлинение, описанное в настоящем документе, такое как одиночный остаток аланина. - «[HLE]» представляет увеличивающий период полувыведения связывающий домен или связывающий элемент (и, в частности, увеличивающий период полувыведения ISVD, такой как нанотело), такой как ISVD (и, в частности, нанотело) к сывороточному альбумину (человека), такой как анти-HSA ISVD ALB11002, описанный в настоящем документе; - «[Другой фрагмент]» представляет связывающий домен или связывающий элемент (например, ISVD, такой как нанотело), связывающие эпитоп, который отличается от PD1, например, один или несколько из CTLA4-, BTLA-, LAG3- и/или CD27-ISVD, такой как LAG3-ISVD, 11B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L), описанный в настоящем документе «[Направляющий фрагмент]» представляет связывающий домен или связывающий элемент (и, в частности, ISVD, такой как нанотело), которые направляют полипептид по изобретению в конкретную клетку, ткань или орган

Таблица D-2b

Схематическое представление некоторых связывающих PD1 и/или LAG3 молекул по изобретению с увеличивающим период полувыведения ISVD

[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [HLE]
[HLE] - [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [HLE] - X (n)
[HLE] - [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - X (n)
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [HLE]
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [HLE] - [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]
[HLE] - [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [HLE] - X (n)
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [HLE] - [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - X (n)
[HLE] - [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - X (n)
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [Другой фрагмент] - [HLE]
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [Другой фрагмент] - [Другой фрагмент] - [HLE]
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [Другой фрагмент] - [HLE] - X (n)
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [Другой фрагмент] - [Другой фрагмент] - [HLE] - X (n)
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [HLE] - [Другой фрагмент]
[HLE] - [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [Другой фрагмент]
[HLE] - [Другой фрагмент] - [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]
[Другой фрагмент] - [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] - [HLE]

[Другой фрагмент] – [HLE] – [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – [Другой фрагмент] – [HLE] – X (n)
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – [HLE] – [Другой фрагмент] – X (n)
[HLE] – [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – [Другой фрагмент] – X (n)
[HLE] – [Другой фрагмент] – [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – X (n)
[Другой фрагмент] – [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – [HLE] – X (n)
[Другой фрагмент] – [HLE] – [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – X (n)
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – [Направляющий фрагмент] – [HLE]
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – [HLE] – [Направляющий фрагмент]
[HLE] – [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – [Направляющий фрагмент]
[Направляющий фрагмент] – [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – [HLE]
[Направляющий фрагмент] – [HLE] – [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]
[HLE] – [Направляющий фрагмент] – [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – [Направляющий фрагмент] – [HLE] – X (n)
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – [HLE] – [Направляющий фрагмент] – X (n)
[HLE] – [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – [Направляющий фрагмент] – X (n)
[Направляющий фрагмент] – [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению] – [HLE] – X (n)
[Направляющий фрагмент] – [HLE] – [Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]

[illegible]

[HLE]-[Направляющий фрагмент]-[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]-[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]-X(n)
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]-[HLE]
[HLE]-[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]-[HLE]-X(n)
[HLE]-[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]-X(n)
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]-[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]-[HLE]
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]-[HLE]-[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]
[HLE]-[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]-[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]-[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]-[HLE]-X(n)
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]-[HLE]-[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]-X(n)
[HLE]-[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]-[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]-X(n)
[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]-[Другой фрагмент]-[HLE]
Условные обозначения: - «[Связывающий LAG3 фрагмент по изобретению]» представляет связывающий LAG3 домен или фрагмент, или элемент, такой как LAG3-ISVD 11B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L), описанный в настоящем документе - «-» представляет либо прямую ковалентную связь, либо подходящий линкер, такой как линкер 9GS, 15GS или 35GS - «X(n)» представляет C-концевое удлинение, описанное в настоящем документе, такое как одиночный остаток аланина. - «[HLE]» представляет увеличивающий период полувыведения связывающий домен или связывающий элемент (и, в частности, увеличивающий период полувыведения ISVD, такой как нанотело), такой как ISVD (и, в частности, нанотело) к сывороточному альбумину (человека), такой как анти-HSA ISVD ALB11002, описанный в настоящем документе;
- «[Другой фрагмент]» представляет связывающий домен или связывающий элемент (например, ISVD, такой как нанотело), связывающие эпитоп, который отличается от PD1, например, один или несколько из CTLA4-, BTLA-, LAG3- и/или CD27-ISVD, такой как PD1-ISVD 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L), описанный в настоящем документе - «[Направляющий фрагмент]» представляет связывающий домен или связывающий элемент (и, в частности, ISVD, такой как нанотело), которые направляют полипептид по изобретению в конкретную клетку, ткань или орган

В варианте осуществления изобретения связывающие PD1/LAG3 молекулы по настоящему изобретению приведены ниже в табл. D-3.

Таблица D-3

Связывающие PD1/LAG3 молекулы по настоящему изобретению

Описание	Последовательность
Название: F023700899	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIAS <u>IHA</u>
Описание:	<u>MG</u> WFRQAPGKERE FVA <u>VITW</u> SGGITYADSVKG
1PD102C12 (A14P, A74S, K83R) -	RFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAIYYCAG <u>D</u>
35GS-	<u>KHOSSWYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGG
1PD102C12 (A14P, A74S, K83R) -	GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGL
35GS-F0237611B09-35GS-	VQPGGSLRLSCAASGSIAS <u>IHAMG</u> WFRQAPGKE
F0237611B09-35GS-ALB11002	REFVA <u>VITW</u> SGGITYADSVKGRFTISRDN SKN
Мишень: hPD-1/hLAG-3	TVYLQMNSLRPEDTAIYYCAG <u>DKHOSSWYDY</u> WG
SEQ ID NO: 106	QGTGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG
	SGGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC
	AASGRTF <u>SDYVMG</u> WFRQARGNEREFVA <u>AI</u> SESG
	<u>GR</u> THYADAVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLKP
	EDTAVYYCAT <u>TLLWWTSEYAPIKANDYDY</u> WGQG
	TLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG
	GGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAA
	SGRTF <u>SDYVMG</u> WFRQARGNEREFVA <u>AI</u> SESGGR
	<u>THYADAVKGR</u> FTISRDN AKNTLYLQMNSLKPED
	TAVYYCAT <u>TLLWWTSEYAPIKANDYDY</u> WGQGL
	VTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG
	GSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRRLSCAASG

	FTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSS
Название: F023700931 Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L))-35GS-1PD102C12 (L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) - 35GS-F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74 S, K83R, V89L) -35GS-F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74 S, K83R, V89L) -35GS-ALB11002-A Мишень: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 107	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIIHA MCWFRQAPGKEREFVAVITWSSGGITYYADSVKG RFTISRDNKNTVYLMNLSRPEDTALYYCAGD KHOSSWYDYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGG GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGV VQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMCWFRQAPGKE REFVAVITWSSGGITYYADSVKGRFTISRDNKNT TVYLMNLSRPEDTALYYCAGDKHOSSWYDYWG QGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSC AASGRTFSDYVMCWFRQAPGKEREFVAAISESG GRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMNLSRP EDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG GGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAA SGRTFSDYVMCWFRQAPGKEREFVAAISESGGR THYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMNLSRPED TALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGT TLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG GSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASG FTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNKTTLYLQMNLSRPEDTA LYYCTIGGSLSRSSQGTTLVTVSSA
Название: F023701016 Описание: 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83 R, I89L) -20GS- 102C12 (L11V, A14P, A74S, K83R, I8 9L) -20GS- F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N4 3K, A62S, A74S, K83R, V89L) -20GS- F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N4	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIIHA MCWFRQAPGKEREFVAVITWSSGGITYYADSVKG RFTISRDNKNTVYLMNLSRPEDTALYYCAGD KHOSSWYDYWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSGGG GSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASG SIASIIHAMCWFRQAPGKEREFVAVITWSSGGITY YADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNLSRPEDTA LYYCAGDKHOSSWYDYWGQGTTLVTVSSGGGGSG GSGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLR

3K, A62S, A74S, K83R, V89L) -20GS- ALB11002-A Мишень: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 108	LSCAAS<u>GRTFSDYVMGW</u>FRQAPGKEREFVA<u>AISE</u> <u>ESGGRTHYADSVKGRFT</u>ISRDN SKNTLYLQMN LRPEDTALYYCAT<u>TLLWWTSEYAPIKANDYDYW</u> GQGT LVT VSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQ LVESGGGVVQPGGSLRLS CAAS<u>GRTFSDYVMGW</u> FRQAPGKEREFVA<u>AISESGGRTHYADSVKGRFT</u> ISRDN SKNTLYLQMN SLRPEDTALYYCAT<u>TLLW</u> <u>WTSEYAPIKANDYDYW</u>GQGT LVT VSSGGGSGG GGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRL SCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMN SL RPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSA
Название: F023701017 Описание: 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83 R, I89L) -9GS- 102C12 (L11V, A14P, A74S, K83R, I8 9L) -9GS- F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N4 3K, A62S, A74S, K83R, V89L) -9GS- F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N4 3K, A62S, A74S, K83R, V89L) -9GS- ALB11002-A Мишень: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 109	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLS CAAS<u>GSIASIHA</u> <u>MGW</u>FRQAPGKEREFVA<u>VITWSGGITYYADSVKG</u> RFTISRDN SKNTVY LQMN SLRPEDTALYYCAG<u>D</u> <u>KHQS</u><u>SWDY</u>WGQGT LVT VSSGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLS CAAS<u>GSIASIHAMC</u>WF RQAPGKEREFVA<u>VITWSGGITYYADSVKGRFTI</u> SRDN SKNTVY LQMN SLRPEDTALYYCAG<u>DKHQS</u> <u>SWDY</u>WGQGT LVT VSSGGGSGGGSEVQLVESG GGVVQPGGSLRLS CAAS<u>GRTFSDYVMGW</u>FRQAP GKEREFVA<u>AISESGGRTHYADSVKGRFTISRDN</u> SKNTLYLQMN SLRPEDTALYYCAT<u>TLLWWTSEY</u> <u>APIKANDYDYW</u>GQGT LVT VSSGGGSGGGSEVQ LVESGGGVVQPGGSLRLS CAAS<u>GRTFSDYVMGW</u> FRQAPGKEREFVA<u>AISESGGRTHYADSVKGRFT</u> ISRDN SKNTLYLQMN SLRPEDTALYYCAT<u>TLLW</u> <u>WTSEYAPIKANDYDYW</u>GQGT LVT VSSGGGSGG GSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLS CAASGFTFSS FGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDN AKTTLYLQMN SLRPEDTALYYCT IGGSLSRSSQGT LVT VSSA
Название: F023700924 Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L)	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLS CAAS<u>GSIASIHA</u> <u>MGW</u>FRQAPGKEREFVA<u>VITWSGGITYYADSVKG</u> RFTISRDN SKNTVY LQMN SLRPEDTALYYCAG<u>D</u>

) -35GS- F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) -35GS-ALB11002-A Мишень: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 110	<u>KHOSSWYDY</u>WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGG GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGV VQPGGSLRLSCAAS<u>GRTFSDYVMC</u>WFRQAPGKE REFVAA<u>AISESGGRTHYADSVKGRFTISRDN</u>SKN TLYLQMNSLRPEDTALYYCAT<u>TLLWWTSEYAPI</u> <u>KANDYDY</u>WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQ PGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTL YLMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLTVT VSSA
Название: F023700969 Описание: 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) -20GS- F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) -20GS- ALB11002-A Мишень: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 111	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS<u>GSIASIHA</u> <u>MC</u>WFRQAPGKEREFVAV<u>ITWSGGITYYADSVKG</u> RFTISRDN SKNTVYLMNSLRPEDTALYYCAG<u>D</u> <u>KHOSSWYDY</u>WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGG GSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS<u>G</u> <u>RTFSDYVMC</u>WFRQAPGKEREFVAA<u>AISESGGRTH</u> <u>YADSVKGRFTISRDN</u>SKNTLYLMNSLRPEDTA LYYCAT<u>TLLWWTSEYAPIKANDYDY</u>WGQGLTVT VSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGG VVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGK GLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTVSSA
Название: F023700970 Описание: 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) -9GS-F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) -9GS-ALB11002-A Мишень: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 112	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS<u>GSIASIHA</u> <u>MC</u>WFRQAPGKEREFVAV<u>ITWSGGITYYADSVKG</u> RFTISRDN SKNTVYLMNSLRPEDTALYYCAG<u>D</u> <u>KHOSSWYDY</u>WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAAS<u>GRTFSDYVMC</u>WF RQAPGKEREFVAA<u>AISESGGRTHYADSVKGRFTI</u> SRDN SKNTLYLMNSLRPEDTALYYCAT<u>TLLWW</u> <u>TSEYAPIKANDYDY</u>WGQGLTVTVSSGGGGSGGG SEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSF GMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI

	GGSLSRSSQGLTVTVSSA
Название: F023701163 Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF) - 35GS-1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF) - 35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A Мишень: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 113	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDPKNTVYLMNSLRPEDTALYYCAGDKHOSFYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDPKNTVYLMNSLRPEDTALYYCAGDKHOSFYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGDLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSA
Название: F023701168 Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF) - 9GS-1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF) - 9GS-F023700842-9GS-F023700842-9GS-ALB11002-A Мишень: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 114	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDPKNTVYLMNSLRPEDTALYYCAGDKHOSFYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDPKNTVYLMNSLRPEDTALYYCAGDKHOSFYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFAAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMNSLRPEDTALYYCATTLLWWTSEY

	<u>APIKANDYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGSGGGSEVQ LVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS <u>GRTFSDYVMGW</u> FRQAPGKEREFVA <u>AISESGGRTHYADSVKGRFT</u> ISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT <u>TLLW</u> <u>WTSEYAPIKANDYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGSGGG GSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSS FGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCT IGGSLSRSSQGLTVTVSSA
Название: F023701173 Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A Мишень: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 115	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS <u>GSIASIHA</u> <u>MCW</u> FRQAPGKEREFVA <u>VI</u> TVSGGITYYADSVKG RFTISRDP SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGD <u>KHOSSFYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGG GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGV VQPGGSLRLSCAAS <u>GRTFSDYVMGW</u> FRQAPGKE REFVA <u>AISESGGRTHYADSVKGRFT</u> ISRDN SKN TLYLQMNSLRPEDTALYYCAT <u>TLLWWTSEYAPI</u> <u>KANDYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGG GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQ PGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTL Y LQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLTVT VSSA
Название: F023701178 Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-F023700842-9GS-ALB11002-A Мишень: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 116	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS <u>GSIASIHA</u> <u>MCW</u> FRQAPGKEREFVA <u>VI</u> TVSGGITYYADSVKG RFTISRDP SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGD <u>KHOSSFYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAAS <u>GRTFSDYVMGW</u> F RQAPGKEREFVA <u>AISESGGRTHYADSVKGRFT</u> I SRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT <u>TLLWW</u> <u>TSEYAPIKANDYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGSGGG SEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSF GMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLSRSSQGLTVTVSSA

Название: F023701161	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS <u>GSIASIHA</u>
Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF) - 35GS-1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF) - 35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A	<u>MCWFRQAPGKERE</u> FVA <u>VITVSGGITYADSVKG</u> RFTISRQSKNTVYLMNSLRPEDTALYYCAG <u>D</u> <u>KHOSSFYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSGGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS <u>GSIASIHAMG</u> WFRQAPGKE
Мишень: hPD-1/hLAG-3	REFVA <u>VITVSGGITYADSVKGR</u> RFTISRQSKNTVYLMNSLRPEDTALYYCAG <u>DKHOSSFYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS <u>GRTFSDYVMG</u> WFRQAPGKERE
SEQ ID NO: 117	FVA <u>AISESGGRTHYADSVKGR</u> RFTISRDN SKNTLYLMNSLRPEDTALYYCAT <u>TLLWWTSEYAPIKANDYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS <u>GRTFSDYVMG</u> WFRQAPGKERE
	FVA <u>AISESGGRTHYADSVKGR</u> RFTISRDN SKNTLYLMNSLRPEDTALYYCAT <u>TLLWWTSEYAPIKANDYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSA
Название: F023701166	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS <u>GSIASIHA</u>
Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF) - 9GS-1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF) - 9GS-F023700842-9GS-ALB11002-A	<u>MCWFRQAPGKERE</u> FVA <u>VITVSGGITYADSVKG</u> RFTISRQSKNTVYLMNSLRPEDTALYYCAG <u>D</u> <u>KHOSSFYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS <u>GSIASIHAMG</u> WFRQAPGKERE
Мишень: hPD-1/hLAG-3	FVA <u>VITVSGGITYADSVKGR</u> RFTISRQSKNTVYLMNSLRPEDTALYYCAG <u>DKHOS</u> <u>SFYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS <u>GRTFSDYVMG</u> WFRQAPGKERE
SEQ ID NO: 118	FVA <u>AISESGGRTHYADSVKGR</u> RFTISRDN SKNTLYLMNSLRPEDTALYYCAT <u>TLLWWTSEYAPIKANDYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQ

	LVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GRTFSDYVMGW FRQAPGKERE FVA AISESGGRTHYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNLRPEDTALYYCAT TLLW WTSEYAPIKANDYDY WGQGLTVTVSSGGGSGGG GSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSS FGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNAKTTLYLQMNLRPEDTALYYCT IGGSLSRSSQGLTVTVSSA
Название: F023701171 Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A Мишень: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 119	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GSIASIHA MCW FRQAPGKERE FVA VITVSGGITTYADSVKG RFTISRQSKNTVYLYLQMNLRPEDTALYYCAG D KHOSSFYDY WGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGG GSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGV VQPGGSLRLSCAAS GRTFSDYVMGW FRQAPGKE REFVA AISESGGRTHYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNLRPEDTALYYCAT TLLWWTSEYAPI KANDYDY WGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGVVQ PGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTL YLQMNLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLTVT VSSA
Название: F023701176 Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-9GS-F023700842-9GS-ALB11002-A Мишень: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 120	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GSIASIHA MCW FRQAPGKERE FVA VITVSGGITTYADSVKG RFTISRQSKNTVYLYLQMNLRPEDTALYYCAG D KHOSSFYDY WGQGLTVTVSSGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GRTFSDYVMGW F RQAPGKERE FVA AISESGGRTHYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNLRPEDTALYYCAT TLLWW TSEYAPIKANDYDY WGQGLTVTVSSGGGSGGG SEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSF GMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNLRPEDTALYYCTI GGSLSRSSQGLTVTVSSA
Название: F023701162	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS GSIASIHA

Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF) - 35GS-1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF) - 35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A Мишень: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 121	<u>MCWFRQAPGKERE</u>FVA<u>VITVSGGITY</u>ADSVKG RFTISRDSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAG<u>D</u> <u>KHOSSFYD</u>YWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGV VQPGGSLRLSCAAS<u>GSIASIHAMG</u>WFRQAPGKE REFVA<u>VITVSGGITY</u>ADSVKGRFTISRDSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAG<u>DKHOSSFYD</u>YWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSC AAS<u>GRTFSDYVMG</u>WFRQAPGKERE<u>FVA</u><u>AISESG</u> <u>GRTHYADSVKGR</u>FTISRDNKNTLYLQMNSLRP EDTALYYCAT<u>TLLWWTSEYAPIKANDYD</u>YWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAA S<u>GRTFSDYVMG</u>WFRQAPGKERE<u>FVA</u><u>AISESGGR</u> <u>THYADSVKGR</u>FTISRDNKNTLYLQMNSLRPED TALYYCAT<u>TLLWWTSEYAPIKANDYD</u>YWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRRLSCAASG FTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTL YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA LYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSA
Название: F023701167 Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF) - 9GS-1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF) - 9GS-F023700842-9GS-F023700842-9GS-ALB11002-A Мишень: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 122	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS<u>GSIASIH</u>A <u>MCWFRQAPGKERE</u>FVA<u>VITVSGGITY</u>ADSVKG RFTISRDSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAG<u>D</u> <u>KHOSSFYD</u>YWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAAS<u>GSIASIHAMG</u>WF RQAPGKERE<u>FVA</u><u>VITVSGGITY</u>ADSVKGRFTISRDSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAG<u>DKHO</u>S <u>SFYD</u>YWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESG GGVVQPGGSLRLSCAAS<u>GRTFSDYVMG</u>WFRQAP GKERE<u>FVA</u><u>AISESGGRTHYADSVKGR</u>FTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT<u>TLLWWTSEY</u> <u>APIKANDYD</u>YWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQ LVESGGGVVQPGGSLRLSCAAS<u>GRTFSDYVMG</u>W

	FRQAPGKEREFVA <u>AI</u> SESGGRTHYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT <u>TLLW</u> <u>WTSEYAPIKANDYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGGSGG GSEVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSS FGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCT IGGSLSRSSQGLTVTVSSA
Название: F023701172 Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF) - 35GS-F023700842-35GS-ALB11002-A Мишень: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 123	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIAS <u>HA</u> <u>MG</u> WFRQAPGKEREFVA <u>VI</u> TVSGGITTYADSVKG RFTISRDSSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAG <u>D</u> <u>KH</u> QSSFYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGV VQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFQAPGKE REFVA <u>AI</u> SESGGRTHYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRPEDTALYYCAT <u>TLLWWTSEYAPI</u> <u>KANDYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQ PGNSLRSLCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTL YLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLTVT VSSA
Название: F023701177 Описание: 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF) - 9GS-F023700842-9GS-ALB11002-A Мишень: hPD-1/hLAG-3 SEQ ID NO: 124	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIAS <u>HA</u> <u>MG</u> WFRQAPGKEREFVA <u>VI</u> TVSGGITTYADSVKG RFTISRDSSKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAG <u>D</u> <u>KH</u> QSSFYDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWF RQAPGKEREFVA <u>AI</u> SESGGRTHYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT <u>TLLW</u> <u>TSEYAPIKANDYDY</u> WGQGLTVTVSSGGGGSGGG SEVQLVESGGGVVQPGNSLRSLCAASGFTFSSF GMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTI GGSLSRSSQGLTVTVSSA

*CDR связывающих PD1 молекул и связывающих LAG3 молекул подчеркнуты и/или выделены полужирным шрифтом

Необязательно, первый остаток любого связывающего фрагмента молекулы замещен D или E, если это необходимо.

Настоящее изобретение включает любую связывающую PD1/LAG3 молекулу, содержащую, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106-124 или аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более (например, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности по аминокислотной последовательности (т.е. при сравнении полноразмерных аминокислотных последовательностей), где связывающая PD1/LAG3 молекула сохраняет способность связываться с PD1 и LAG3, и, необязательно, с HSA.

Настоящее изобретение включает любую связывающую PD1/LAG3 молекулу, имеющую следующее расположение фрагментов.

- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (A14P,A74S,K83R) -
- Пептидный линкер, например, 35GS-
- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (A14P,A74S,K83R) -
- Пептидный линкер, например, 35GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F0237611B09-
- Пептидный линкер, например, 35GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F0237611B09-
- Пептидный линкер, например, 35GS-
- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент, например, ALB11002

или

- | | | | | |
|---|-----------------------------------|------|----------|-------------|
| - | Связывающий | PD1 | фрагмент | 1PD102C12 |
| (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R,I89L) - | | | | |
| - | Пептидный линкер, например, 35GS- | | | |
| - | Связывающий | PD1 | фрагмент | 1PD102C12 |
| (L11V,A14P,A74S,K83R,I89L) - | | | | |
| - | Пептидный линкер, например, 35GS- | | | |
| - | Связывающий | LAG3 | фрагмент | F0237611B09 |
| (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L) - | | | | |
| - | Пептидный линкер, например, 35GS- | | | |
| - | Связывающий | LAG3 | фрагмент | F0237611B09 |
| (L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L) - | | | | |
| - | Пептидный линкер, например, 35GS- | | | |

- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент, например, ALB11002-
- Необязательный удлиняющий С-конец аланин
- или
- Связывающий PD1 фрагмент 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) -
- Пептидный линкер, например, 20GS-
- Связывающий PD1 фрагмент 102C12 (L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) -
- Пептидный линкер, например, 20GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) -
- Пептидный линкер, например, 20GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) -
- Пептидный линкер, например, 20GS-
- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент, например, ALB11002-
- Необязательный удлиняющий С-конец аланин
- или
- Связывающий PD1 фрагмент 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) -
- Пептидный линкер, например, 9GS-
- Связывающий PD1 фрагмент 102C12 (L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) -
- Пептидный линкер, например, 9GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) -
- Пептидный линкер, например, 9GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) -
- Пептидный линкер, например, 9GS-
- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент, например, ALB11002-
- Необязательный удлиняющий С-конец аланин
- или

- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12
(E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) -

- Пептидный линкер, например, 35GS-

- Связывающий LAG3 фрагмент F0237611B09
(L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) -

- Пептидный линкер, например, 35GS-

- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент,
например, ALB11002-

- Необязательный удлиняющий С-конец аланин
или

- Связывающий PD1 фрагмент 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) -

- Пептидный линкер, например, 20GS-

- Связывающий LAG3 фрагмент F0237611B09 (L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) -

- Пептидный линкер, например, 20GS-

- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент,
например, ALB11002-

- Необязательный удлиняющий С-конец аланин
или

- Связывающий PD1 фрагмент 102C12 (E1D, L11V, A14P, A74S, K83R, I89L) -

- Пептидный линкер, например, 9GS-

- Связывающий LAG3 фрагмент F0237611B09
(L11V, A14P, R41P, N43K, A62S, A74S, K83R, V89L) -

- Пептидный линкер, например, 9GS-

- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент,
например, ALB11002-

- Необязательный удлиняющий С-конец аланин
или

- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P,
W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF) -

- Пептидный линкер, например, 35GS-

- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV,
N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF) -

- Пептидный линкер, например, 35GS-

- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-
- Пептидный линкер, например, 35GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-
- Пептидный линкер, например, 35GS-
- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент, например, ALB11002-
- Необязательный удлиняющий С-конец аланин
- или
- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Пептидный линкер, например, 9GS-
- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Пептидный линкер, например, 9GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-
- Пептидный линкер, например, 9GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-
- Пептидный линкер, например, 9GS-
- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент, например, ALB11002-
- Необязательный удлиняющий С-конец аланин
- или
- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Пептидный линкер, например, 35GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-
- Пептидный линкер, например, 35GS-
- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент, например, ALB11002-
- Необязательный удлиняющий С-конец аланин
- или
- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Пептидный линкер, например, 9GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-
- Пептидный линкер, например, 9GS-

- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент, например, ALB11002-

- Необязательный удлиняющий С-конец аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-

- Пептидный линкер, например, 35GS-

- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-

- Пептидный линкер, например, 35GS-

- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-

- Пептидный линкер, например, 35GS-

- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-

- Пептидный линкер, например, 35GS-

- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент, например, ALB11002-

- Необязательный удлиняющий С-конец аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-

- Пептидный линкер, например, 9GS-

- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-

- Пептидный линкер, например, 9GS-

- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-

- Пептидный линкер, например, 9GS-

- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-

- Пептидный линкер, например, 9GS-

- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент, например, ALB11002-

- Необязательный удлиняющий С-конец аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-

- Пептидный линкер, например, 35GS-

- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-

- Пептидный линкер, например, 35GS-
- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент, например, ALB11002-
- Необязательный удлиняющий С-конец аланин или
- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Пептидный линкер, например, 9GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-
- Пептидный линкер, например, 9GS-
- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент, например, ALB11002-
- Необязательный удлиняющий С-конец аланин или
- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Пептидный линкер, например, 35GS-
- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Пептидный линкер, например, 35GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-
- Пептидный линкер, например, 35GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-
- Пептидный линкер, например, 35GS-
- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент, например, ALB11002-
- Необязательный удлиняющий С-конец аланин или
- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Пептидный линкер, например, 9GS-
- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Пептидный линкер, например, 9GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-
- Пептидный линкер, например, 9GS-

- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-
- Пептидный линкер, например, 9GS-
- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент, например, ALB11002-
- Необязательный удлиняющий С-конец аланин или
- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Пептидный линкер, например, 35GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-
- Пептидный линкер, например, 35GS-
- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент, например, ALB11002-
- Необязательный удлиняющий С-конец аланин или
- Связывающий PD1 фрагмент 1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)-
- Пептидный линкер, например, 9GS-
- Связывающий LAG3 фрагмент F023700842-
- Пептидный линкер, например, 9GS-
- Связывающий сывороточный альбумин человека фрагмент, например, ALB11002-
- Необязательный удлиняющий С-конец аланин.

В варианте осуществления изобретения связывающие PD1/LAG3 фрагменты по настоящему изобретению включают следующее расположение фрагментов:

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 98;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 98;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 63;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 63;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 57;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 99;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 57;
- Линкер 20GS SEQ ID NO: 100;
- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 99;
- Линкер 20GS SEQ ID NO: 100;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 20GS SEQ ID NO: 100;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 20GS SEQ ID NO: 100;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 57;
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 99;
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 57;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;

- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 57;
- Линкер 20GS SEQ ID NO: 100;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 20GS SEQ ID NO: 100;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 57;
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 105;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 105 (D1E);
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 105;
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 105 (D1E);
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 105;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 105;
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 104;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 104 (D1E);
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 104;
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 104 (D1E);
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 104;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;

- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 104;
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 103 (N73S);
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 103 (D1E, N73S);
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 103 (N73S);
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 103 (D1E, N73S);
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 103 (N73S);
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 35GS SEQ ID NO: 58;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

или

- Связывающий PD1 фрагмент SEQ ID NO: 103 (N73S);
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий LAG3 фрагмент SEQ ID NO: 64;
- Линкер 9GS SEQ ID NO: 125;
- Связывающий HSA фрагмент SEQ ID NO: 59;
- Аланин

Перекрестно блокирующие антитела.

Настоящее изобретение также относится к перекрестно-блокирующим связывающим молекулам, которые способны перекрестно блокировать связывание любой из связывающих молекул, описанных в настоящем документе (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177). Такие

перекрестно блокирующие связывающие молекулы могут представлять собой любую молекулу, которая проявляет такие перекрестно блокирующие свойства, например, ISVD, нанотело, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В общем, связывающая молекула (например, ISVD, такое как нанотело) или антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые "перекрестно блокируют" эталонную связывающую молекулу или "перекрестно конкурирует с" эталонной связывающей молекулой, относится к связывающей молекуле (например, ISVD, например нанотелу) или антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, которые блокируют связывание эталонной связывающей молекулы с ее антигеном в конкурентном анализе на 50% или более, и, наоборот, эталонная связывающая молекула блокирует связывание связывающей молекулы (например, ISVD, такого как нанотело) или антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента с их антигеном в конкурентном анализе на 50% или более. Перекрестное блокирование или перекрестная конкуренция могут быть определены любым анализом, известным в данной области, включая поверхностный плазмонный резонанс (SPR), ELISA и проточную цитометрию.

В варианте осуществления изобретения перекрестное блокирование определяют с использованием анализа Biotec. Для удобства приведена ссылка на две связывающих молекулы, объем настоящего изобретения включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, например Fab-фрагменты, которые перекрестно блокируют связывающую молекулу по настоящему изобретению. Операции на приборе Biotec (например, Biotec 3000) осуществляют в соответствии с рекомендациями производителя.

Таким образом, в одном анализе перекрестного блокирования PD1 или LAG3 связывают с чипом CM5 Biotec с использованием стандартного химического присоединения по аминокетам для получения поверхности, покрытой PD1 или LAG3. Например, 200-800 резонансных единиц PD1 или LAG3 связывают с чипом (или любое количество, которое дает легко измеряемые уровни связывания, но которое легко насыщается концентрациями используемого тестируемого реагента).

Две связывающих молекулы (называемых А* и В*), у которых необходимо оценить их способность перекрестно блокировать друг друга, смешивают в молярном соотношении один к одному участков связывания в подходящем буфере для создания тестируемой смеси.

Концентрация каждой связывающей молекулы в тестируемой смеси должна быть достаточно высокой, чтобы легко насыщать сайты связывания этой связывающей молекулы на молекулах PD1 или LAG3, захваченных на чипе Biotec. Связывающие молекулы в смеси имеют одинаковую молярную концентрацию.

Также готовят отдельные растворы, содержащие только связывающую молекулу А* и только связывающую молекулу В*. Связывающая молекула А* и связывающая молекула В в этих растворах должны находиться в том же буфере и в той же концентрации, что и в тестируемой смеси.

Тестируемую смесь пропускают через чип Biotec, покрытый PD1 или LAG3, и регистрируют общую степень связывания. Затем чип обрабатывают таким образом, чтобы удалить связанные связывающие молекулы, не повреждая связанные с чипом PD1 или LAG3. В варианте осуществления изобретения это делается путем обработки чипа 30 mM HCl в течение 60 с.

Затем через поверхность, покрытую PD1 или LAG3, пропускают раствор только связывающей молекулы А* и регистрируют степень связывания. Чип снова обрабатывают, чтобы удалить все связанные связывающие молекулы, не повреждая связанные с чипом PD1 или LAG3.

Затем через поверхность, покрытую PD1 или LAG3, пропускают раствор только связывающей молекулы В* и регистрируют степень связывания.

Затем вычисляют максимальное теоретическое связывание смеси связывающей молекулы А* и связывающей молекулы В*, и оно представляет собой сумму связывания каждой связывающей молекулы при прохождении через поверхность, покрытую PD1 или LAG3. Если фактически регистрируемое связывание смеси ниже этого теоретического максимума, то две связывающих молекулы перекрестно блокируют друг друга.

Таким образом, в общем случае перекрестно блокирующая связывающая молекула по изобретению представляет собой молекулу, которая будет связываться с PD1 или LAG3 в вышеуказанном анализе перекрестной блокировки на Biotec, так что во время анализа и в присутствии второй связывающей молекулы регистрируемое связывание составляет, например, от 80% до 0,1% (например, от 80% до 4%) от максимального теоретического связывания, например, от 75% до 0,1% (например, от 75% до 4%) от максимального теоретического связывания, например, от 70% до 0,1% (например, от 70% до 4%) от максимального теоретического связывания (как определено выше) двух связывающих молекул в комбинации.

В одном варианте осуществления изобретения используют анализ ELISA для того, чтобы определить, являются ли связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы перекрестно блокирующими, или способны к перекрестной блокировке в соответствии с изобретением.

Общий принцип анализа состоит в том, чтобы связывающими PD1 или LAG3 молекулами покрывают лунки планшета для ELISA. В раствор добавляют избыточное количество второй, потенциально перекрестно блокирующей анти-PD1 или LAG3 связывающей молекулы (то есть, не связанной с планшетом для ELISA). Затем в лунки добавляют ограниченное количество PD1 или LAG3. Имобилизованные связывающие молекулы и связывающие молекулы в растворе конкурируют за связывание ограниченного

числа молекул PD1 или LAG3. Планшет промывают для удаления PD1 или LAG3, который не связались иммобилизованными связывающими молекулами, и также удаляют вторые связывающие молекулы в растворе, а также любые комплексы, образованные между вторыми связывающими молекулами в растворе и PD1 или LAG3. Затем количество связанных PD1 или LAG3 измеряют с использованием соответствующего реагента для обнаружения PD1 или LAG3. Связывающие молекулы в растворе, способные перекрестно блокировать иммобилизованные связывающие молекулы на поверхности лунок, могут привести к уменьшению количества молекул PD1 или LAG3, которые иммобилизованные на поверхности молекулы могут связать, относительно количества молекул PD1 или LAG3, которое иммобилизованные на поверхности молекулы могут связать в отсутствие вторых связывающих молекул в растворе.

Способы экспрессии.

Настоящее изобретение включает рекомбинантные способы получения связывающих PD1 и/или LAG3 молекул (например, ISVD, таких как нанотела) по настоящему изобретению (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177), включающие (i) введение полинуклеотида, кодирующего аминокислотную последовательность указанной связывающей PD1 и/или LAG3 молекулы, например, где полинуклеотид находится в векторе и/или функционально связан с промотором; (ii) культивирование клетки-хозяина (например, CHO или *Pichia* или *Pichia pastoris*) в условиях, благоприятных для экспрессии полинуклеотида, и (iii) необязательное выделение связывающих PD1 и/или LAG3 молекул из клетки-хозяина и/или среды, в которой выращивается клетка-хозяин. См., например, WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 или WO 2009/068627.

Изобретение также относится к полинуклеотидам, которые кодируют связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы по настоящему изобретению (например, ISVD, такие как нанотела), описанные в настоящем документе (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177). Полинуклеотиды в варианте осуществления изобретения могут быть функционально связаны с одной или несколькими регуляторными последовательностями. Полинуклеотид может быть представлен в форме плазмиды или вектора. Кроме того, такие полинуклеотиды могут быть в вошем такими, как описано в опубликованных патентных заявках Ablynx N.V., таких как, например, WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 или WO 2009/068627.

Изобретение также относится к хозяевам или клеткам-хозяевам, которые содержат такие полинуклеотиды, кодирующие связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы, векторы и/или связывающий PD1 и/или LAG3 полипептид, описанный в настоящем документе (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171, F023701176, F023701162, F023701167, F023701172 или F023701177). Кроме того, такие клетки-хозяева могут быть, как правило, такими, как описано в опубликованных патентных заявках Ablynx N.V., таких как, например, WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 или WO 2009/068627. Примеры конкретных клеток-хозяев обсуждаются ниже.

Эукариотические и прокариотические клетки-хозяева, включая клетки млекопитающих в качестве хозяев для экспрессии связывающей PD1 и/или LAG3 молекулы (например, ISVD, такого как нанотело) хорошо известны в данной области и включают в себя многие иммортализованные клеточные линии, доступные в Американской коллекции типовых культур (ATCC). К ним относятся, среди прочего, клетки яичника китайского хомячка (CHO), NSO, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомячка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549, клетки 3T3, клетки HEK-293 и ряд других клеточных линий. Клетки млекопитающих включают клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяны, свиньи, козы, коров, лошадей и хомячка.

Предпочтительные клеточные линии выбирают путем определения, какие клеточные линии имеют высокие уровни экспрессии. Другими клеточными линиями, которые могут быть использованы, являются линии клеток насекомых (например, *Spodoptera frugiperda* или *Trichoplusia ni*), клетки амфибий, бактериальные клетки, растительные клетки и грибковые клетки. Грибковые клетки включают клетки дрожжей и нитевидных грибов, включая, например, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces* sp., *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces* sp., *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium* sp., *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens* и *Neurospora crassa*. *Pichia* sp., any *Saccharomyces* sp., *Hansenula polymorpha*, any *Kluyveromyces* sp., *Candida albicans*, любые *Aspergillus* sp., *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, any *Fusarium* sp., *Yarrowia lipolytica* и *Neurospora crassa*. Настоящее изобретение включает любую клетку-хозяина (например, клетку

СНО или клетку *Pichia*, например *Pichia pastoris*), содержащую связывающую PD1 и/или LAG3 молекулу по настоящему изобретению (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177) или содержащую полинуклеотид, кодирующий такую связывающую молекулу, или содержащую вектор, который содержит полинуклеотид.

Кроме того, экспрессия связывающей PD1 и/или LAG3 молекулы (например, ISVD, такого как нанотело) в продуцирующих клеточных линиях, может быть усилена с использованием ряда известных методов. Например, система экспрессии гена глутаминсинтетазы (GS-система) является стандартным подходом для усиления экспрессии при определенных условиях. GS-система обсуждается целиком или частично в европейских патентах №№ 0216846, 0256055 и 0323997 и в европейской патентной заявке № 89303964.4. Таким образом, в одном варианте осуществления изобретения клетки-хозяева из млекопитающих (например, СНО) не имеют гена глутаминсинтетазы и выращиваются в отсутствии глутамина в среде, где однако полинуклеотид, кодирующий иммуноглобулиновую цепь, содержит ген глутаминсинтетазы, который выполняет отсутствие гена в клетке-хозяине. Такие клетки-хозяева, содержащие связывающую молекулу или полинуклеотид или вектор, обсуждаемые в настоящем документе, а также способы экспрессии, обсуждаемые в настоящем документе, для получения связывающей молекулы с использованием такой клетки-хозяина, являются частью настоящего изобретения.

Настоящее изобретение включает способы очистки связывающей PD1 и/или LAG3 молекулы (например, ISVD, такого как нанотело) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177), включающие введение образца (например, культуральной среды, клеточного лизата или фракции клеточного лизата, например растворимой фракции лизата), содержащего связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы в среду очистки (например, катионообменную среду, анионообменную среду и/или гидрофобную обменную среду) и либо сбор очищенный связывающих PD1 и/или LAG3 молекул из фракции проскока для указанного образца, которые не связываются с средой; либо отбрасывая фракцию проскока элюируют связанные связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы из среды и собирают элюат. В варианте осуществления изобретения среда находится в колонке, в которую вносится образец. В варианте осуществления изобретения очистку проводят после рекомбинантной экспрессии антитела или фрагмента в клетке-хозяине, например, где клетку-хозяина сначала лизируют и, необязательно, лизат очищают от нерастворимых материалов перед очисткой на среде; или где связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы секретируются в культуральную среду клеткой-хозяином, а среду или ее фракция наносят на среду для очистки.

В общем, гликопротеины, продуцируемые в конкретной клеточной линии или в трансгенном животном, будут иметь гликозилирование, которое характерно для гликопротеинов, продуцируемых в данной клеточной линии или в данном трансгенном животном. Поэтому конкретные позиции гликозилирования связывающей PD1 и/или LAG3 молекулы (например, ISVD, такого как нанотело) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177) будут зависеть от конкретной клеточной линии или трансгенного животного, используемых для получения связывающей PD1 и/или LAG3 молекулы. PD1 и/или LAG3, содержащие только нефукозилированные N-гликаны, являются частью настоящего изобретения и могут быть полезными, поскольку, как было показано, нефукозилированные антитела проявляют большую эффективность, чем их фукозилированные аналоги как *in vitro*, так и *in vivo* (см., например, Shinkawa et al., J. Biol. Chem. 278: 3466-3473 (2003); патенты США №№ 6946292 и 7214775). Эти связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы с нефукозилированными N-гликанами вряд ли будут иммуногенными, поскольку их углеводные структуры являются нормальным компонентом популяции, которая существует в IgG сыворотки человека.

Настоящее изобретение включает связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела), включающие N-связанные гликаны, которые, как правило, добавляются к иммуноглобулинам, продуцируемым в клетках яичника китайского хомячка (N-связанные гликаны клеток СНО) или в модифицированных дрожжевых клетках (N-связанные гликаны генно-инженерно модифицированных дрожжей), таких как, например, *Pichia pastoris*. Например, в варианте осуществления изобретения связывающая PD1 и/или LAG3 молекула содержит один или несколько "N-связанных гликанов генно-инженерно модифицированных дрожжей" или "N-связанных гликанов клеток СНО", которые приведены на фиг. 4 (например, G0 и/или G0-F, и/или G1, и/или G1-F, и/или G2-F, и/или Man5). В варианте осуществления изобретения связывающая PD1 и/или LAG3 молекула содержит N-связанные гликаны генно-инженерно модифицированных дрожжей, а именно, G0 и/или G1, и/или G2, необязательно, дополнительно включая Man5. В варианте осуществления изобретения связывающая PD1 и/или LAG3 молекула содержит N-связанные гликаны клеток СНО, а именно, G0-F, G1-F и G2-F, необязательно, дополнительно включая G0 и/или G1, и/или G2, и/или Man5. В варианте осуществления изобретения от 80 до 95%

(например, примерно 80-90%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%) всех N-связанных гликанов на связывающих PD1 и/или LAG3 молекулах представляют собой N-связанные гликаны генно-инженерно модифицированных дрожжей или N-связанные гликаны клеток CHO. См. Nett et al. Yeast. 28(3): 237-252 (2011); Hamilton et al. Science. 313(5792): 1441-1443 (2006); Hamilton et al. Curr Opin Biotechnol. 18(5): 387-392 (2007). Например, в варианте осуществления изобретения генно-инженерно модифицированная дрожжевая клетка представляет собой GF15.0 или YGLY8316 или штаммы, описанные в патенте США № 7795002 или в Zha et al. Methods Mol Biol. 988:31-43 (2013). См. также публикацию международной патентной заявки № WO2013/066765.

Комбинации.

В конкретных вариантах осуществления, связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по настоящему изобретению (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177) могут использоваться отдельно или связанными с другими, дополнительными терапевтическими агентами и/или терапевтическими процедурами для лечения или профилактики любых заболеваний, таких как рак, например, обсуждаемый в настоящем документе, у субъекта, нуждающегося в таком лечении или в профилактике. Композиции или наборы, например, фармацевтические композиции, содержащие фармацевтически приемлемый носитель, содержащий такие связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы в сочетании с другими терапевтическими агентами, также являются частью настоящего изобретения.

Термин "связанные" означает, что компоненты, связывающая PD1 и/или LAG3 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) по настоящему изобретению (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177) вместе с другим агентом, таким как пембролизумаб или ниволумаб, могут быть представлены в виде одной композиции, например, для одновременной доставки, или представлены отдельно в двух или нескольких композициях (например, в наборе). Каждый компонент может вводиться субъекту в другое время относительно введения другого компонента; например, каждое введение может быть неодновременным (например, отдельным или последовательным) с интервалами в течение заданного периода времени. Кроме того, отдельные компоненты могут вводиться субъекту одним или разными способами (например, если связывающую PD1 и/или LAG3 молекулу по настоящему изобретению вводят парентерально, а паклитаксел вводят перорально).

В конкретных вариантах осуществления связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы (например, ISVD, такое как нанотело) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177) могут быть использованы связанными с противораковым терапевтическим агентом или с иммуномодулирующим лекарственным средством, таким как ингибитор иммуномодулирующего рецептора, например анти-телом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфично связывается с рецептором.

В варианте осуществления изобретения связывающая PD1 и/или LAG3 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177) связана с одним или несколькими ингибиторами (например, с низкомолекулярным органическим соединением или с антителом или антигенсвязывающим фрагментом), такими как: ингибитор MTOR (мишень рапамицина у млекопитающих), цитотоксический агент, платиновый агент, ингибитор BRAF, ингибитор CDK4/6, ингибитор EGFR, ингибитор VEGF, стабилизатор микротрубочек, таксан, ингибитор CD20, ингибитор CD52, ингибитор CD30, ингибитор RANK (рецептора, активирующего ядерный фактор каппа-B), ингибитор RANKL (лиганда рецептора, активирующего ядерный фактор каппа-B), ингибитор ERK, ингибитор MAP-киназы, ингибитор АКТ, ингибитор MEK, ингибитор PI3K, ингибитор HER1, ингибитор HER2, ингибитор HER3, ингибитор HER4, ингибитор Bcl2, ингибитор CD22, ингибитор CD79b, ингибитор ErbB2 или ингибитор фарнезилтрансферазы.

В варианте осуществления изобретения связывающая PD1 и/или LAG3 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177) связана с одним или несколькими антителами к PD1 или с их антигенсвязывающим фрагментом (например, пембролизумабом, ниволумабом, CT-011), анти-PDL1, анти-CTLA4, анти-TIM3, анти-CS1 (например, элтозумабом), анти-KIR2DL1/2/3 (например, лирилумабом), анти-CD27, анти-CD137 (например, урелумабом) GITR (например, TRX518), анти-PD-L1 (например, BMS-936559, MSB0010718C или MPDL3280A), анти-PD-L2, анти-ILT1, анти-ILT2, анти-ILT3, анти-ILT4, анти-ILT5, анти-ILT6, анти-ILT7, анти-ILT8, анти-CD40, анти-OX40, анти-CD137, анти-KIR2DL1, анти-KIR2DL2/3, анти-KIR2DL4, анти-KIR2DL5A,

анти-KIR2DL5B, анти-KIR3DL1, анти-KIR3DL2, анти-KIR3DL3, анти-NKG2A, анти-NKG2C, анти-NKG2E или любым низкомолекулярным органическим ингибитором таких мишеней; IL-10, анти-IL10, анти-TSLP (тимус-стромальным лимфопоэтином) или ПЭГилированным IL-10.

В варианте осуществления изобретения молекулярная масса полиэтиленгликолевого фрагмента (ПЭГ) на молекуле ПЭГилированного IL-10 составляет около 12000 дальтон или около 20000 дальтон. В варианте осуществления изобретения ПЭГилированный IL-10 (например, ПЭГилированный IL-10 человека) содержит одну или несколько молекул полиэтиленгликоля, ковалентно связанных через линкер (например, C₂₋₁₂-алкил, такой как -CH₂CH₂CH₂-) с одним аминокислотным остатком одной субъединицы IL-10, где указанный аминокислотный остаток представляет собой альфа-аминогруппу N-концевого аминокислотного остатка или эпислон-аминогруппу остатка лизина. В варианте осуществления изобретения ПЭГилированный IL-10 представляет собой: (ПЭГ)_b-L-NH-IL-10; где b составляет 1-9, а L представляет собой C₂₋₁₂-алкильный линкерный фрагмент, ковалентно присоединенный к азоту (N) одного аминокислотного остатка IL-10. В варианте осуществления изобретения ПЭГилированный IL-10 имеет формулу: [X--O(CH₂CH₂O)_n]_b-L-NH-IL-10, где X представляет собой H или C₁₋₄-алкил; n составляет от 20 до 2300; b составляет от 1 до 9; и L представляет собой C₁₋₁₁-алкильный линкерный фрагмент, который ковалентно присоединен к азоту (N) альфа-аминогруппы на аминоконце одной субъединицы IL-10; при условии, что, когда b больше 1, общее количество n не превышает 2300. См. US 7052686.

В варианте осуществления изобретения антитело к IL-10 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, гуманизированное антитело) содержат CDR, приведенные ниже:

CDR-L1 CDR-L2 CDR-L3 CDR-H1 CDR-H2 CDR-H3 KTSQNIFENLA (SEQ ID NO: 71)
 NASPLQA (SEQ ID NO: 72) HQYYSGYT (SEQ ID NO: 73) GFTFSDYHMA (SEQ ID NO: 74)
 SITLDATYTYRDSVRG (SEQ ID NO: 75) HRGFSVWLDY (SEQ ID NO: 76)
 (см. US 7662379).

В варианте осуществления изобретения антитело к TSLP или его антигенсвязывающий фрагмент (например, гуманизированное антитело) содержат CDR, приведенные ниже:

CDR-H1 CDR-H2 CDR-H3 CDR-L1 CDR-L2 CDR-L3 GYIFTDYAMH (SEQ ID NO: 77)
 TFIPLLDTSYDYNQNFK (SEQ ID NO: 78) MGVTHTSYVMDA (SEQ ID NO: 79)
 RASQPISISVH (SEQ ID NO: 80) FASQSIG (SEQ ID NO: 81) QQTFSLPYT (SEQ ID NO: 82)
 (см. WO2008/76321).

В варианте осуществления изобретения анти-CD27-антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, гуманизированное антитело) содержат CDR, приведенные ниже:

CDR-H1 CDR-H2 CDR-H3 CDR-L1 CDR-L2 CDR-L3
 GFIIKATYMH (SEQ ID NO: 83) RIDPANGETKYDPKFQV (SEQ ID NO: 84)
 YAWYFDV (SEQ ID NO: 85) RASENIYSFLA (SEQ ID NO: 86)
 HAKTLAE (SEQ ID NO: 87) QHYYSPLT (SEQ ID NO: 88)
 (см. WO2012/04367).

Таким образом, настоящее изобретение включает композиции, содержащие связывающую PD1 и/или LAG3 молекулу (например, ISVD, такой как нанотело) (например, F023700899; F023700931;

F023701017; F023700924; F023700969; F023700970;
 F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8;
 F023701166; F023701171; F023701176; F023701162;
 F023701172 или F023701177), связанную с
 F023701016;
 F023701163;
 F023701161;
 F023701167;

пембролизумабом; а также способы лечения или профилактики рака у субъекта, включающие введение субъекту эффективного количества связывающей PD1 и/или LAG3 молекулы в сочетании с пембролизумабом (например, пембролизумабом, вводимым по 200 мг один раз в три недели). Необязательно, субъекту также вводят еще один другой терапевтический агент.

В варианте осуществления изобретения связывающая PD1 и/или LAG3 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177) связана с антителом пембролизумабом, которое содержит тяжелую цепь иммуноглобулина (или ее CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность:

QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTN
FNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSSAST
KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL
SLGK (SEQ ID NO: 89);

и легкую цепь иммуноглобулина (или ее CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLA
SGVPARFSGSGSTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 90).

В варианте осуществления изобретения связывающая PD1 и/или LAG3 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177) связана с антителом, содержащим тяжелую цепь иммуноглобулина (или ее CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3), содержащую аминокислотную последовательность:

QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRY
YADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTTLTVTVSSASTKGPSVF
LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL
(SEQ ID NO: 91);

и легкую цепь иммуноглобулина (или ее CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), содержащую аминокислотную последовательность:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP
ARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 92).

В одном варианте осуществления изобретения связывающая PD1 и/или LAG3 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177) связана с любой одной или несколькими из 13-цис-ретиноевой кислоты, 3-[5-(метилсульфонилпиперадиметил)-индолил]-хинолона, 4-гидрокситамоксифена, 5-дезоксинуридина, 5'-дезоксидефторуридина, 5-фторурацила, б-мекаптопурина, 7-гидрокситауропоина, А-443654, абиратероанацетата, абраксана, АБТ-578, аколбифена, ADS-100380, афлиберцепта, ALT-110, альтретамина, амифостина, аминоглутетимида, амрубицина, амсакрина, анагелида, анастрозола, ангиостатина, AP-23573, ARQ-197, арзоксифена, AS-252424, AS-605240, аспарагиназы, АТ13387, АТ-9263, атрацентана, акситиниба, AZD1152, вакцины бациллы Кальметта-Герена (BCG), батабулина, BC-210, безодуткса, бевацизумаба, BGJ398, бикалутамида, Bioy, BIO140, BKM120, блеомицина, BMS-214662, BMS-247550, BMS-275291, BMS-310705, бортезимиба, бузерелина, бусульфана, кальцитриола, камптотецина, канертиниба, капецитабина, карбоплатины, кармустина, CC8490, CEA (рекомбинантной вакцины вакцинация-карциноэмбиональный антиген), це-дираниба, CG-1521, CG-781, хламидоцина, хлорамбуцила, хлоротоксина, цилегитида, цимитидина, цисплатины, кладрибина, клондроната, кобиметниба, COL-3, CP-724714, циклофосфамида, ципротерона, ципротеронацетата, цитарабина, ципропиридина, ципроцитозинарабинозида, дабрафениба, дакарбазина, дациностата, дактиномицина, далотузумаба, данусертиба, дасатаниба, даунорубицина, декатаниба, дегелина, денилейкина, дезоксикоформицина, депсипептида, диарилпропионитрила, диэтилстилбестрола,

дифтитокса, DNE03, доцетаксела, довитиниба, доксорубицина, дролоксифена, эдотекарина, меченого иттрием-90 эдотреотида, эдотреотида, ЕКВ-569, EMD121974, энкорафениба, эндостатина, энзалутамида, энзастаурина, эпирубицина, эпителина В, ERA-923, эрбитукса, эрлотиниба, эстрадиола, эстрамустина, этопозид, эверолимуса, экземестана, фиклатузумаба, финастерида, флавопиридола, флукуретидина, флударабина, флудрокортизона, флуоксистерона, флутамида, схемы FOLFOX, фулвестранта, галетерона, ганетеспиба, гефитиниба, гемцитабина, гамицина, глюкопиранозиллипида А, гозерелина, гозерелинацетата, госсипола, GSK461364, GSK690693, HMR-3339, гидроксипрогестеронкапроата, гидроксимочевина, IC87114, идарубицина, идоксифена ифосфамида, IM862, иматиниба, IMC-1C11, имиквимода, INC280, INCB24360, INO1001, интерферона, интерлейкина-2, интерлейкина-12, ипилимумаба, иринотекана, JNJ-16241199, кетоконазола, KRX-0402, лапатиниба, лазофоксифена, LEE011, летрозол, лейковорина, лейпролида, лейпролидацетата, левамизола, липосомного паклитаксела, ломустина, лонафарниба, люкантона, LY292223, LY292696, LY293646, LY293684, LY294002, LY317615, LY3009120, маримацетата, мехлорэтамидина, медроксипрогестеронацетата, мегестролацетата, MEK162, мелфалана, меркаптопурина, месны, метотрексата, митрамицина, митомидина, митотана, митоксантрона, суспензии термически инактивированных *Mycobacterium obuense*, тозасертиба, MLN8054, натитоклакса, неовастата, нератиниба, нейрадиба, нилотиниба, нилутимида, нолатрекседа, NVP-BE235, облимерсена, октреотида, отатумумаба, ореговумаба, орнатузумаба, ортерола, оксалиплатины, паклитаксела, палбоциклиба, памидроната, панитумаба, пазопаниба, PD0325901, PD184352, ПЭГ-интерферона, пеметрекседа, пентостатина, перифозина, фенилаланинмустарда, PI-103, пителилиба, PIK-75, пипеноксифена, PKI-166, пликамицина, поли-ICLC, порфимера, преднизона, прокарбазина, прогестинов, полисахарида, связанного с белком PSK (полученного из *Basidiomycete coriolus versicolor*), PLX8394, PX-866, R-763, ралоксифена, ралтитрекса, разоксина, ридафоролимуса, ритуксимаба ромадипсина, RTA744, рубитекана, скриптейда, SdxIO2, селициклиба, селуметиниба, семаксаниба, SF1126, сиролимуса, SN36093, сорафениба, спиронолактона, скваламина, SR13668, стрептозоцина, SU6668, субероиланилалид-гидроксамовой кислоты, сунитиниба, синтетического эстрогена, талампанели, талимоген-лагерпарепвека, тамоксифена, темозоломида, темсиролимуса, тенипозид, тесмилифена, тестостерона, тетраандрина, TGX-221, талидомида, б-тиогуанина, тиотепы, тицилимумаба, тифофарниба, тивозаниба, TKI-258, TLK286, TNF α (фактора некроза опухоли альфа), топотекана, торемифенцитрата, трабектедина, траметиниба, трастузумаба, третиноина, трихостатина А, моногидрата трицирибинфосфата, трифорелинпамоата, TSE-424, урамустина, вальпроевой кислоты, валрубицина, вандетаниба, ваталаниба, ловушки VEGF, вемурафениба, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбина, витаксина, вориностата, VX-745, вортманина, Xr311, Z-100, экстракта *Bacillus tuberculosis* в горячей воде, занолимумаба, ZK186619, ZK-304709, ZM336372 или ZSTK474.

В одном варианте осуществления изобретения связывающая PD1 и/или LAG3 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177) связана с одним или несколькими противораковыми средствами, включая, но не ограничиваясь ими: казопитант (GlaxoSmithKline), нетупитант (MGI-Helsinn) и другие антагонисты рецептора NK-1, палоносетрон (продается как Алокси от MGI Pharma), апрепитант (продается как Эменд от Merck and Co.; Rahway, NJ), дифенгидрамин (продается как Бенадрил® от Pfizer, New York, NY), гидроксизин (продается как Атаракс® от Pfizer, New York, NY), метоклопрамид (продается как Реглан® от AH Robins Co, Richmond, VA), лоразепам (продается как Ативан® от Wyeth, Madison, NJ), альпразолам (продается как Ксанакс® от Pfizer, New York, NY), галоперидол (продается как Халдол® от Ortho-McNeil; Raritan, NJ), дроперидол (Инапсин®), дронабинол (продается как Маринол® от Solvay Pharmaceuticals, Inc, Marietta, GA), дексаметазон (продается как Декадрон® от Merck and Co, Rahway, NJ), метилпреднизолон (продается как Медрол® от Pfizer, New York, NY), прохлорперазин (продается как Компазин® от Glaxosmithkline, Research Triangle Park, NC), гранисетрон (продается как Китрил® от Hoffmann-La Roche Inc, Nutley, NJ), ондансетрон (продается как Зофран® от Glaxosmithkline; Research Triangle Park, NC), доласетрон (продается как Анземет® от Sanofi-Aventis, New York, NY), трописетрон (продается как Навобан® от Novartis, East Hanover, NJ).

Другие побочные эффекты лечения рака включают истощение красных и белых кровяных клеток. Соответственно, в варианте осуществления изобретения связывающая PD1 и/или LAG3 молекула (например, ISVD, такой как нанотело) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F023701168; F023701173; F023701168; F023701176; 8; F023701161; F023701166, F023701171, F023701176, F023701162, F023701167, F023701172 или F023701177) связана с агентом, который лечит или предупреждает такое истощение, как, например, филграстим, ПЭГ-филграстим, эритропоэтин, эпоэтин-альфа или дарбепоэтин-альфа.

В варианте осуществления изобретения связывающая PD1 и/или LAG3 молекула (например, ISVD, такое как нанотело) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177), связана с

вакциной. В варианте осуществления изобретения вакцина представляет собой противораковую вакцину, пептидную вакцину или ДНК-вакцину. Например, в варианте осуществления изобретения вакцина представляет собой опухолевую клетку (например, облученную опухолевую клетку) или дендритную клетку (например, дендритную клетку, обогащенную опухолевым пептидом).

В варианте осуществления изобретения связывающую PD1 и/или LAG3 молекулу (например, ISVD, такой как нанотело) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177) вводят совместно с терапевтической процедурой. Терапевтическая процедура представляет собой одну или несколько стадий, выполняемых врачом или клиницистом при лечении субъекта, которые предназначены для облегчения одного или нескольких симптомов (например, рака и/или инфекционного заболевания) у получающего лечение субъекта, либо путем уменьшения или устранения таких симптомов, либо путем ингибирования развития таких симптомов, например, симптомом ракового заболевания, таких как рост опухоли или метастазирование, в любой клинически измеримой степени.

В варианте осуществления изобретения терапевтическая процедура представляет собой противораковую лучевую терапию. Например, в варианте осуществления изобретения лучевая терапия представляет собой внешнюю лучевую терапию (ЕВТ): способ доставки пучка высокоэнергетического рентгеновского излучения в место расположения опухоли. Луч генерируется вне пациента (например, линейным ускорителем) и направляется на участок опухоли. Эти рентгеновские лучи могут разрушать раковые клетки, а тщательное планирование лечения позволяет не затрагивать окружающие здоровые ткани. Никакие радиоактивные источники не размещаются внутри тела пациента. В варианте осуществления изобретения лучевая терапия представляет собой терапию протонным лучом: тип конформной терапии, которая бомбардирует пораженную ткань протонами вместо рентгеновских лучей. В варианте осуществления изобретения лучевая терапия представляет собой конформную лучевую терапию внешним лучом: процедуру, в которой используются передовые технологии для адаптации лучевой терапии к структурам тела человека.

В варианте осуществления изобретения лучевая терапия представляет собой брахитерапию: временное размещение радиоактивных материалов внутри тела, обычно используемая для получения дополнительной дозы или для усиления излучения в конкретной области.

В варианте осуществления изобретения хирургической процедурой, проводимой совместно с введением связывающей PD1 и/или LAG3 молекулы (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177), является хирургическое удаление опухоли.

Варианты терапевтического применения

Изобретение включает в себя способ профилактики и/или лечения по меньшей мере одного заболевания или расстройства, которое можно предупредить или вылечить с помощью связывающей PD1 и/или LAG3 молекулы (например, ISVD, такого как нанотело) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176, 8, F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172, или F023701177) по настоящему изобретению, необязательно, в сочетании с дополнительным терапевтическим агентом или терапевтическим способом, который включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтически активного количества связывающих PD1 и/или LAG3 молекул и/или содержащей их фармацевтической композиции.

"Лечение" или "воздействие" означает введение связывающих PD1 и/или LAG3 молекул (например, ISVD, таких как нанотело) по настоящему изобретению (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176, 8, F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177) субъекту, имеющему один или несколько симптомов заболевания, в отношении которых связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы являются эффективными, например, для лечения субъекта, имеющего рак или инфекционное заболевание, или предположительно имеющего рак или инфекционное заболевание, в отношении которого агент обладает терапевтической активностью. Как правило, связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы вводят в "эффективном количестве" или "эффективной дозе", которые будут уменьшать один или несколько симптомов (например, рака или инфекционного заболевания) у получающего лечение субъекта или популяции, либо путем уменьшения или устранения таких симптомов, либо путем ингибирования развития таких симптомов, например, симптомов рака, таких как рост опухоли или метастазирование, в любой клинически измеримой степени. Эффективное количество связывающей PD1 и/или LAG3 молекулы может варьировать в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст и вес пациента, а также способность лекарственного средства вызывать желаемый ответ у субъекта.

Подлежащим лечению может быть любое теплокровное животное, но, в частности, это может быть млекопитающее и, в частности, человек. Как будет понятно специалисту в данной области, субъект, под-

лежащий лечению, будет, в частности, представлять собой человека, страдающего от или имеющего риск заболеваний и патологий, указанных в настоящем документе. В общем, схема лечения будет соблюдаться до тех пор, пока не будет достигнут желаемый терапевтический эффект и/или до тех пор, пока необходимо сохранить желаемый терапевтический эффект. Опять же, это может определить лечащий врач.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере одну аминокислотную последовательность, связывающую PD1 и/или LAG3 молекулу (например, ISVD, такой как нанотела), полипептид или соединение, описанные в настоящем документе, такие как F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177, и, необязательно, по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. Такие препараты, носители, вспомогательные вещества и разбавители обычно могут быть такими, как описано в опубликованных патентных заявках Ablynx NV, таких как, например, WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 или WO 2009/068627.

Для получения фармацевтических или стерильных композиций связывающих PD1 и/или LAG3 молекул (например, ISVD, таких как нанотела) по настоящему изобретению (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161, F023701166, F023701171, F023701176, F023701162, F023701167, F023701172 или F023701177), связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences и US Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Такие композиции являются частью настоящего изобретения.

В объем настоящего изобретения входят обезвоженные, например, лиофилизированные композиции, содержащие связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177) или их фармацевтическую композицию, которая включает фармацевтически приемлемый носитель, но по существу не содержит воды.

Составы терапевтических и диагностических агентов могут быть получены путем смешивания с приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, взвесей, водных растворов или суспензий (см., например, Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Genaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY).

В общем, для профилактики и/или лечения заболеваний и расстройств, указанных в настоящем документе, и в зависимости от конкретного заболевания или расстройства, подлежащего лечению, эффективности и/или периода полувыведения конкретных слитых белков или конструкций, которые будут использоваться, и используемые способ введения и конкретный фармацевтический состав или композиция, наночастицы и полипептиды по изобретению обычно вводят в количестве от 1 до 0,01 мкг/кг массы тела в день, предпочтительно от 0,1 до 0,1 мкг на кг массы тела в день, например около 1, 10, 100 или 1000 мкг/кг массы тела в день, либо непрерывно (например, путем инфузии), либо в виде разовой суточной дозы, либо в виде нескольких разделенных доз в течение дня. В общем лечащий врач может определить подходящую суточную дозу в зависимости от факторов, указанных в настоящем документе. Также будет ясно, что в конкретных случаях лечащий врач может выбрать отклонение от этих количеств, например, на основе приведенных выше факторов и его экспертного заключения. В общем, некоторые рекомендации по вводимым количествам могут быть получены из количеств, обычно вводимых для сопоставимых обычных антител или фрагментов антител против той же мишени, вводимых по существу таким же путем, однако учитывая различия в аффинности/авидности, эффективности, биораспределении, периоде полувыведения и аналогичных факторах, хорошо известных специалисту.

Способ введения субъекту связывающих PD1 и/или LAG3 молекул (например, ISVD, таких как нанотела) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161, F023701166, F023701171, F023701176, F023701162, F023701167, F023701172 или F023701177) может варьировать. Способы введения включают пероральный, ректальный, через слизистые, кишечный, парентеральный, внутримышечный, подкожный, внутрикожный, интрамедуллярный, интратекальный, прямой внутривенный, внутривенный, внутривенный, интраназальный, интравенный, ингаляционный, инсультационный, местный, кожный, трансдермальный или интравенный.

Определение соответствующей дозы производится лечащим врачом, например, с использованием параметров или факторов, которые как известно или предполагается в данной области влияют на лече-

ние. Как правило, при определении дозировки ее начинают с количества, несколько меньшего оптимальной дозы, а затем понемногу увеличивают до тех пор, пока не будет достигнут желаемый или оптимальный эффект по сравнению с любыми отрицательными побочными эффектами. Важные диагностические параметры включают в себя такие симптомы как, например, воспаление или уровень продуцируемых воспалительных цитокинов. В общем, желательно, чтобы биологические соединения, которые будут использоваться, были получены из тех же видов, что и животное, которое будет получать лечение, тем самым сводя к минимуму любой иммунный ответ на реагент. В случае человека, например, могут быть желательными химерные, гуманизированные и полностью человеческие антитела. Рекомендации по подбору подходящих доз связывающих PD1 и/или LAG3 молекул (например, F023700924 или F023700931) являются доступными (см., например, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom et al. (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon et al. (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602).

Оценить, был ли облегчен симптом заболевания, можно с помощью любого клинического метода анализа, обычно используемого лечащими врачами или другими медицинскими работниками для оценки тяжести или статуса развития этого симптома. Хотя вариант осуществления настоящего изобретения (например, способ лечения или изделие) может не являться эффективным для облегчения симптома(ов) целевого заболевания у каждого субъекта, он должен облегчить симптом(ы) целевого заболевания у статистически значимого числа субъектов, определяемого любым статистическим тестом, известным в данной области, таким как t-критерий Стьюдента, критерий хи-квадрат, U-критерий по Манну и Уитни, критерий Крускал-Уоллиса (H-тест), критерий Джонкхиера-Терпстра и критерий Уилкоксона.

Поскольку связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы по настоящему изобретению (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177) способны связываться с PD1 (например, ISVD, например нанотела), их можно, в частности, использовать для лечения или профилактики рака, метастатического рака, солидной опухоли, гематологического рака, лейкемии, лимфомы, остеосаркомы, рабдомиосаркомы, нейробластомы, рака почки, лейкемии, переходноклеточного рака мочевого пузыря, рака мочевого пузыря, опухоли Вильма, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака кости, рака легких, мелкоклеточного рака легкого, рака желудка, колоректального рака, рака шейки матки, синовиальной саркомы, рака головы и шеи, сквамозноклеточной карциномы, множественной миеломы, почечно-клеточного рака, ретинобластомы, гепатобластомы, гепатоцеллюлярной карциномы, меланомы, рабдоидной опухоли почки, саркомы Юинга, хондросаркомы, рака мозга, глиобластомы, менингиомы, аденомы гипофиза, вестибулярной шванномы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, медуллобластомы, астроцитомы, анапластической астроцитомы, олигодендроглиомы, эпендимомы, папилломы сосудистого сплетения, истинной полицитемии, тромбоцитемии, идиопатического миелофиброза, саркомы мягких тканей, рака щитовидной железы, рака эндометрия, карциноидного рака или рака печени, рака молочной железы и рака желудка.

Связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения или профилактики инфекционных заболеваний, таких как, например, вирусная инфекция, бактериальная инфекция, грибковая инфекция или паразитарная инфекция. В варианте осуществления изобретения вирусная инфекция представляет собой инфекцию вирусом, выбранным из группы, состоящей из вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса эболы, вируса гепатита (A, B или C), вируса герпеса (например, VZV, HSV-I, HAV-6, HSV-II и CMV, вирус Эпштейна-Барра), аденовируса, вируса гриппа, флавивирусов, эховируса, риновируса, вируса коксаки, коронавируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса эпидемического паротита, ротавируса, вируса кори, вируса краснухи, парвовируса, вируса коревой оспы, вируса HTLV, вируса лихорадки денге, папилломавируса, вируса контагиозного моллюска, полиовируса, вируса бешенства, JC-вируса или вируса арбовирусного энцефалита. В варианте осуществления изобретения бактериальная инфекция представляет собой инфекцию бактериями, выбранными из группы, состоящей из хламидий, риккетсиальных бактерий, микобактерий, стафилококков, стрептококков, пневмококков, менингококков и гонококков, клебсиеллы, протеев, сераций, псевдомоназ, *Legionella*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Salmonella*, *bacilli*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium tetan*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepromatosis* и *Borriella*. В варианте осуществления изобретения грибковая инфекция представляет собой инфекцию грибами, выбранными из группы, состоящей из *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* и т.д.), рода *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*. В варианте осуществления изобретения паразитарная инфекция представляет собой инфекцию паразитом, выбранным из группы, состоящей из *Entamoeba histo-*

lytica, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium*, *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

Настоящее изобретение также включает способы:

- ингибирования связывания LAG3 с молекулами МНС класса II;
- конкурирования с молекулами МНС класса II по связыванию с LAG3;
- связывания связывающей LAG3 молекулы, например связывающей PD1/LAG3 молекулы, с нативным LAG3 на поверхности активированных CD4+ и/или CD8+ Т-клеток;
- ингибирования гомодимеризации LAG3; и/или стимулирования антигенспецифичной продукции IL-2 Т-клетками в организме субъекта путем введения субъекту связывающей PD1/LAG3 молекулы (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700924; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177); или *in vitro* путем контактирования LAG3 с связывающими PD1/LAG3 молекулами. Такое действие может быть опосредовано связывающими LAG3 молекулами. Таким образом, такие способы могут также выполняться с использованием любой связывающей молекулы, которая включает связывающий LAG3 фрагмент.

Настоящее изобретение также включает в себя способы:

- блокирования связывания между PD1 и PD-L1 и/или PD-L2;
- связывания связывающей PD1, например, PD1/LAG3 молекулы с В-клеткам и/или Т-клетками;
- блокирования PD1-опосредованного ингибирования Т-клеток, апоптоза Т-клеток и/или истощения Т-клеток в организме субъекта путем введения субъекту связывающих PD1/LAG3 молекул (например, F023700924 или F023700931); или *in vitro* путем контакта PD1 с связывающими PD1/LAG3 молекулами. Такие действия могут быть опосредованы связывающей PD1 молекулой. Таким образом, такие способы могут также выполняться с любыми связывающими молекулами, которые включает связывающий PD1 фрагмент.

Настоящее изобретение дополнительно включает способы увеличения периода полувыведения связывающей молекулы, такой как связывающая PD1 и/или LAG3 молекула, путем слияния связывающей молекулы со связывающим сывороточный альбумином человека фрагментом, таким как ALB11002.

Изобретение также относится к способам лечения вышеуказанных заболеваний и расстройств, которые обычно включают введение субъекту, нуждающемуся в этом (т.е. страдающему одним из вышеуказанных заболеваний), терапевтически эффективного количества связывающих PD1 и/или LAG3 молекул (например, ISVD, таких как нанотела) по изобретению (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177). Изобретение также относится к связывающей PD1 и/или LAG3 молекуле по изобретению для использования при профилактике или лечении одного из вышеупомянутых заболеваний или расстройств.

Связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы (например, ISVD, такие как нанотела) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161; F023701166; F023701171; F023701176; F023701162; F023701167; F023701172 или F023701177), полипептиды, соединения и полинуклеотиды (например, векторы), описанные в настоящем документе, предпочтительно, вводят в кровоток. По существу, их можно вводить любым подходящим способом, который позволяет ввести в кровоток связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы, полипептиды, соединения и полинуклеотиды, например внутривенно, путем инъекции или инфузии или любым другим подходящим способом (включая пероральное введение, подкожное введение, внутримышечное введение, введение через кожу, интраназальное введение, введение через легкие и т. д.), который позволяет ввести в кровоток связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы, полипептиды, соединения и полинуклеотиды. Подходящие способы и пути введения будут очевидны специалисту в данной области, опять же, например, из изучения опубликованных патентных заявок Ablynx NV, таких как, например, WO 04/041862, WO 2006/122786, WO 2008/020079, WO 2008/142164 или WO 2009/068627.

Настоящее изобретение также относится к устройству для инъекций, содержащему любые из связывающих PD1 и/или LAG3 молекул (например, ISVD, например, нанотел) (например, F023700899; F023700931; F023701016; F023701017; F023700924; F023700969; F023700970; F023701163; F023701168; F023701173; F02370117 F023701176; 8; F023701161, F023701166, F023701171, F023701176, F023701162, F023701167, F023701172 или F023701177), полипептиды или полинуклеотиды, представленных в настоящем документе, или их фармацевтическую композицию. Инъекционное устройство представляет собой устройство, которое вводит вещество в тело пациента парентеральным путем, например, внутримышечно, подкожно или внутривенно. Например, инъекционным устройством может быть шприц (например, предварительно заполненный фармацевтической композицией, такой как автоинжектор), который, например, включает цилиндр или емкость для удержания текучей среды, подлежащей инъекции (например, содержащий связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы или их фармацевтическую компози-

цию), иглу для прокалывания кожи и/или кровеносных сосудов для инъекции жидкости; и плунжер для выталкивания жидкости из цилиндра и через отверстие иглы. В варианте осуществления изобретения инъекционное устройство, которое содержит связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы или их фармацевтическую композицию), представляет собой внутривенное (IV) инъекционное устройство. Такое устройство включает в себя связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы или их фармацевтическую композицию) в канюле или троакаре/игле, которые могут быть прикреплены к шлангу, который может быть прикреплен к мешку или резервуару для удерживания жидкости (например, физиологического раствора или лактатного раствора Рингера, содержащего NaCl, лактат натрия, KCl, CaCl₂ и, необязательно, включающего глюкозу), вводимой в организм субъекта через канюлю или троакар/иглу. Связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы или их фармацевтическая композиция могут в варианте осуществления изобретения вводиться в устройство после того, как троакар и канюля вводятся в вену субъекта, и троакар удаляется из вставленной канюли. IV-устройство, например, может быть вставлено в периферическую вену (например, на кисти или на руке); верхнюю полую вену или нижнюю полую вену или внутрь правого предсердия сердца (например, центральный внутривенный катетер); или в подключичную, внутреннюю яремную или бедренную вену и, например, продвигаться к сердцу до достижения верхней полой вены или правого предсердия (например, центральная венозная линия). В варианте осуществления изобретения инъекционное устройство представляет собой автоинжектор, струйный инжектор или внешний инфузионный насос. В струйном инжекторе используется тонкая струя жидкости высокого давления, которая проникает в эпидермис, чтобы ввести связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы или их фармацевтическую композицию в организм пациента. Внешние инфузионные насосы представляют собой медицинские устройства, которые доставляют связывающие PD1 и/или LAG3 молекулы или их фармацевтическую композицию в организм пациента заданном количестве. Внешние инфузионные насосы могут иметь электропитание или могут быть механическими. Различные насосы работают по разным принципам, например, шприцевой насос удерживает жидкость в резервуаре шприца, а подвижный поршень контролирует доставку жидкости; эластомерный насос удерживает жидкость в растяжимом баллонном резервуаре, и давление от упругих стенок баллона обеспечивает доставку жидкости. В перистальтическом насосе набором роликов зажимается отрезок на гибкой трубке, проталкивая жидкость вперед. В многоканальном насосе жидкости могут поступать из нескольких резервуаров с несколькими скоростями.

Следует также отметить, что чертежи, любой список последовательностей и экспериментальная часть/примеры приведены только для дополнительной иллюстрации изобретения и не должны истолковываться или приниматься, как ограничивающие объем изобретения и/или прилагаемой формулы изобретения любым способом, если явно не указано иное.

Другие аспекты, варианты осуществления, преимущества и варианты применения изобретения станут понятны из дальнейшего описания в настоящем документе.

Примеры

Эти примеры предназначены для иллюстрации настоящего изобретения, не являясь его ограничением. Композиции и способы, представленные в примерах, являются частью настоящего изобретения.

Пример 1. Связывание моновалентного анти-PD-1 человека нанотела с CHO.Hpd-1.

Связывание с экспрессируемым клетками PD-1 человека оценивали на клетках CHO, сверхэкспрессирующих PD-1 человека. Серийные разбавления нанотела приготавливали в буфере для анализа: PBS/10% FBS/0,05% азида натрия. 1×10^5 клеток/лунку переносили в 96-луночный V-образный планшет и ресуспендировали в 100 мкл разведенных нанотел. После 30-минутной инкубации при 4°C клетки промывали буфером для анализа по 100 мкл/лунку и ресуспендировали в 100 мкл/лунку 1 мкг/мл раствора анти-FLAG (Sigma, F1804) или анти-HIS (AbD Serotec, MCA 1396) антител. Образцы инкубировали в течение 30 минут при 4°C, промывали буфером для анализа по 100 мкл/лунку и ресуспендировали в 100 мкл/лунку 5 мкг/мл раствора PE-меченных козьих антител против мышиных IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-116-071). Образцы инкубировали в течение 30 мин при 4°C, промывали и ресуспендировали в 100 мкл/лунку 5 нМ раствора TOPRO3 (Life Technologies, T3606) перед анализом на FACS CANTO II (BD). Данные этих экспериментов приведены на фиг. 5.

Этот пример продемонстрировал, что моновалентное нанотело F023700706 к PD-1 человека связывается с PD-1 человека аналогично моновалентному нанотелу F023700275, из которого оно было получено.

Пример 2. Связывание моновалентного анти-LAG-3 человека нанотела с 3A9.hLAG-3.

Связывание с экспрессируемым клетками LAG-3 человека оценивали на клетках 3A9, сверхэкспрессирующих LAG-3 человека. Серийные разбавления нанотела приготавливали в буфере для анализа: PBS/10% FBS/0,05% азида натрия. 1×10^5 клеток/лунку переносили в 96-луночный V-образный планшет и ресуспендировали в 100 мкл разведенных нанотел. После 30-минутной инкубации при 4°C клетки промывали буфером для анализа по 100 мкл/лунку и ресуспендировали в 100 мкл/лунку 1 мкг/мл раствора анти-FLAG (Sigma, F1804) антител. Образцы инкубировали в течение 30 минут при 4°C, промывали буфером для анализа по 100 мкл/лунку и ресуспендировали в 100 мкл/лунку раствора 5 мкг/мл PE-меченных козьих антител против мышиных IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-116-071). Образцы инкубировали в течение 30 мин при 4°C, промывали и ресуспендировали в 100 мкл/лунку 5 нМ раствора TO-

PRO3 (LifeTechnologies, T3606) перед анализом на FACS CANTO II (BD). Данные этих экспериментов приведены на фиг. 6.

Этот пример продемонстрировал, что оптимизированное по последовательности моновалентное нанотело F023700842 к LAG-3 человека связывается с LAG-3 человека аналогично исходному моновалентному нанотелу F02376611B09, из которого оно было получено.

Пример 3. Связывание полиспецифичного нанотела, содержащего нанотело против PD-1 человека, с CHO.hPD-1 и 3A9.rhesusPD-1.

Связывание с экспрессируемым клетками PD-1 человека и PD-1 макака-резуса оценивали на клетках CHO, сверхэкспрессирующих PD-1 человека, и клетках 3A9 сверхэкспрессирующих PD-1 макака-резуса, соответственно. Серийные разбавления нанотела приготавливали в буфере для анализа: PBS/10% FBS/0,05% азида натрия. 1×10^5 клеток/лунку переносили в 96-луночный V-образный планшет и ресуспендировали в 100 мкл разведенных нанотел. После 30-минутной инкубации при 4°C клетки промывали буфером для анализа по 100 мкл/лунку и ресуспендировали в 100 мкл/лунку 3 мкг/мл раствора ABH0074, моноклонального антитела, которое распознавало нанотело, связывающее фрагмент альбумина, увеличивающий время полужизни. Образцы инкубировали в течение 30 минут при 4°C, промывали буфером для анализа по 100 мкл/лунку и ресуспендировали в 100 мкл/лунку раствора 5 мкг/мл PE-меченных козьих антител против мышиных IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-116-071). Образцы инкубировали в течение 30 мин при 4°C, промывали и ресуспендировали в 100 мкл/лунку 5 нМ раствора TOPRO3 (LifeTechnologies, T3606) перед анализом на FACS CANTO II (BD). Данные этих экспериментов приведены на фиг. 7 (A-B).

Этот пример продемонстрировал, что биспецифичные анти-PD-1 человека/LAG-3 нанотела F023700931 и F023700924 связываются как с PD-1 человека, так и с PD-1 макака-резуса. Также приведены данные для моноспецифичных, бивалентных контрольных нанотел F023700933 (анти-PD-1 человека) и F023700962 (анти-LAG-3 человека).

Пример 4. Связывание полиспецифичного нанотела, содержащего нанотело против LAG-3 человека, с CHO.hLAG3 и CHO.rhesus/cynoLAG3.

Связывание с экспрессируемым клетками LAG-3 человека и обезьян (внеклеточный домен идентичен у яванского макака и макака-резуса, поэтому ген будет относиться к LAG-3 яванского макака и макака-резуса) оценивали на клетках CHO, сверхэкспрессирующих LAG-3 человека, а также яванского макака и макака-резуса. Серийные разбавления нанотел приготавливали в буфере для анализа: PBS/10% FBS/0,05% азида натрия. 1×10^5 клеток/лунку переносили в 96-луночный V-образный планшет и ресуспендировали в 100 мкл разведенных нанотел. После 30-минутной инкубации при 4°C клетки промывали буфером для анализа по 100 мкл/лунку и ресуспендировали в 100 мкл/лунку 1-3 мкг/мл раствора ABH0074, моноклонального антитела, которое распознавало нанотело, связывающее фрагмент альбумина, увеличивающий время полужизни. Образцы инкубировали в течение 30 мин при 4°C, промывали буфером для анализа по 100 мкл/лунку и ресуспендировали в 100 мкл/лунку раствора 5 мкг/мл PE-меченных козьих антител против мышиных IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-116-071). Образцы инкубировали в течение 30 мин при 4°C, промывали и ресуспендировали в 100 мкл/лунку 5 нМ раствора TOPRO3 (LifeTechnologies, T3606) перед анализом на FACSArray (BD). Данные этих экспериментов приведены на фиг. 8 (A-B).

Этот пример продемонстрировал, что биспецифичные анти-PD-1 человека/LAG-3 нанотела F023700931 и F023700924 связываются как с LAG-3 человека, так и с LAG-3 макака-резуса/яванского макака. Также приведены данные для моноспецифичных, бивалентных контрольных нанотел F023700933 (анти-PD-1 человека) и F023700962 (анти-LAG-3 человека).

Пример 5. Биофизический анализ блокады PD-L1-Fc и PD-L2-Fc.

Лиганд-конкурентные анализы проводили на клетках CHO, сверхэкспрессирующих PD-1 человека. Серийные разбавления нанотела приготавливали в буфере для анализа: PBS/10% FBS/0,05% азида натрия. Приготавливали пятикратные серийные разведения нанотел, начиная от 1 мкМ (2х), и заранее разводили в 11 нМ (2х) PD-L1_человека-hFc или 29 нМ (2х) PD-L2_человека-hFc в общем объеме 220 мкл. Клетки в количестве 2×10^4 /лунку высевали в 96-луночные V-образные планшеты и ресуспендировали в 200 мкл/лунку разведенных растворов нанотело/лиганд. После инкубации в течение 90 минут при 4°C клетки промывали буфером для анализа по 100 мкл/лунку и ресуспендировали в меченых по PE-меченных козьих антителах против IgG человека (Southern Biotech, 2043-09). Образцы инкубировали в течение 30 минут при 4°C, промывали и ресуспендировали в 100 мкл/лунку 5 нМ раствора TOPRO3 (LifeTechnologies, T3606) перед анализом на FACS CANTO II (BD). Данные этих экспериментов приведены на фиг. 9 (A-H).

В этом примере продемонстрировано, что моновалентный модуль (нанотело) к PD-1 человека, F023700706, связывается с PD-1 человека, полностью блокируя его взаимодействие с PD-L1 (фиг. 9(A)) и с PD-L2 (фиг. 9 (B)), аналогично исходному моновалентному модулю F023700275, из которого он был получен. Кроме того, этот пример показал, что биспецифичные нанотела против PD-1/LAG-3 человека, F023700931 и F023700924, связывались с PD-1 человека и полностью блокировали его взаимодействие с

PD-L1 (фиг. 9 (C)) и с PD-L2 (фиг. 9 (D)). Также приведены данные для оптимизированных по последовательности, моноспецифичных, бивалентных контрольных нанотел против PD-1 человека (F023700933) и LAG-3 человека (F023700962) (фиг. 9 (E-F)). Наконец, в этом примере было продемонстрировано, что дополнительные аминокислотные варианты моновалентного модуля (нанотела) F023700929 против PD-1 человека связываются с PD-1 человека, полностью блокируя его взаимодействие с PD-L1 (фиг. 9 (G)) и PD-L2 (фиг. 9 (H)). Следует отметить, что F023700706 и F023700929 содержали идентичное моновалентное нанотело против PD-1 человека либо в виде слитого с FLAG3-HIS6 белка, либо в виде слитого с HIS6 белка, соответственно.

Пример 6. Биофизический анализ блокады LAG-3-Fc.

Лиганд-конкурентные анализы проводили на клетках Daudi человека, которые имеют высокую эндогенную экспрессию основного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса. Серию разбавлений нанотел приготавливали в буфере для анализа: HBSS/2% FBS. Перед экспериментом Fc-рецепторы на клетках Daudi блокировали блокирующим Fc человека агентом (BD Pharmingen, 564220) и 5 мкг/мл козьих IgG (Jackson ImmunoResearch, 005-000-003) в течение 30 минут при 4°C. Пятикратные серийные разведения нанотела начинали с 2 мкМ (2х) и заранее разводили 80 нМ (2х) LAG-3 человека-hFc в общем объеме 120 мкл высевали по 1×10^5 клеток/лунку в 96-луночные V-образные планшеты и ресуспендировали в 100 мкл/лунку разведений нанотело/лиганд. После 30-минутной инкубации при 4°C клетки промывали и ресуспендировали в РЕ-меченных козьих антителах против IgG человека (Southern Biotech, 2043-09). Образцы инкубировали в течение 15 минут при 4°C, промывали и ресуспендировали в 100 мкл/лунку 5 нМ раствора TOPRO3 (Life Technologies, T3606) перед анализом на FACS CANTO II (BD). Данные этих экспериментов приведены на фиг. 10 (A-C).

Этот пример продемонстрировал, что моновалентный модуль (нанотело) F023700842 к LAG-3 человека связывался с LAG-3 человека, полностью блокируя его взаимодействие с МНС класса II, аналогично исходному моновалентному нанотелу F0237611B09, из которого он был получен (фиг. 10 (A)). Кроме того, в этом примере было продемонстрировано, что биспецифичные нанотела против PD-1/LAG-3 человека, F023700931 и F023700924, связывались с LAG-3 человека и полностью блокировали его взаимодействие с МНС II класса (фиг. 10 (B-C)). Также приведены данные для моноспецифичных, бивалентных контрольных нанотел F023700933 (анти-PD-1 человека) и F023700962 (анти-LAG-3 человека).

Пример 7. Анализ димеризации по близости расположения.

Использовали анализ димеризации по близости расположения, который основан на системе анализа бета-галактозидазной ферментативной активности дополняющих друг друга фрагментов. В анализе используют слитый белок, получаемый с тэгом, называемым ProLink (PK), и дополняющий (комплементарный) белок, в котором фермент-акцепторный белок (EA) слит со вторым белком. Клетки U2OS стабильно трансфицировали внеклеточным доменом LAG-3 (1-477), слитым с субъединицей EA, и внеклеточным доменом PD-1 (1-199), слитым с PK-субъединицей. Клеточную линию U2OS.LAG3(1-477)-EA.PD1(1-199)-PK № 9 высевали в квадрупликатах по 5000 клеток/лунку в среде для посева DiscoverX CP5 на 384-луночные планшеты. Клетки оставляли прикрепляться в течение 4 часов при 37°C в инкубаторе с 5%-м содержанием диоксида углерода. Затем к клеткам добавляли 11 серийных разбавлений (1:3) нанотела и инкубировали в течение ночи (16 часов) при 37°C в инкубаторе с 5%-м содержанием диоксида углерода. В лунки добавляли реагент обнаружения PathHunter, инкубировали один час при комнатной температуре в темноте, и затем планшет считывали на люминометре Envision. Данные этих экспериментов приведены на фиг. 11 (A-B).

Этот пример продемонстрировал, что биспецифичное анти-PD-1/LAG-3 человека нанотело F023700931 одновременно связывается с PD-1 человека и LAG-3 человека, экспрессируемыми на клеточной мембране, поскольку субъединицы PK и EA объединяются с образованием активного фермента, давая световой сигнал (фиг. 11 (A)). Отдельные моноспецифичные бивалентные контрольные антитела против PD-1 человека (F023700933) и F023700962 против LAG-3 человека не могли одновременно связывать обе мишени и, поэтому, не давали световой сигнал. Индивидуальные модули в биспецифичном анти-PD-1/LAG-3 человека нанотеле, F023700931, были связаны глицин-сериновым линкером длиной 35 аминокислот (35GS). Биспецифичные анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела, F023701016 и F023701017, содержали идентичные модули анти-PD-1 и анти-LAG-3, как F023700931, но глицин-сериновый линкер между этими модулями в конструкциях составлял 20 аминокислот в длину (20GS) или 9 аминокислот в длину (9GS), соответственно. Этот пример показал, что сокращение длины глицин-серинового линкера с 35GS до 9GS оказывает минимальное влияние на способность одновременно связывать обе мишени на клеточной мембране и генерировать световой сигнал. В совокупности эти данные показали, что биспецифичное анти-PD-1/LAG-3 человека нанотело F023700931 может связывать обе мишени одновременно, если обе мишени экспрессируются на одной клетке.

Этот пример также продемонстрировал, что биспецифичное анти-PD-1/LAG-3 человека нанотело F023700924 одновременно связывается с PD-1 человека и LAG-3 человека, экспрессируемыми на клеточной мембране (фиг. 11 (B)). Индивидуальные модули в биспецифичном анти-PD-1/LAG-3 человека нанотеле, F023700924, связаны глицин-сериновым линкером длиной 35 аминокислот (35GS). Биспецифичные анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела, F023700969 и F023700970, содержали идентичные модули

анти-PD-1 и анти-LAG-3, как F023700924, но глицин-сериновый линкер между этими модулями в конструкциях составлял 20 аминокислот в длину (20GS) или 9 аминокислот в длину (9GS), соответственно. Этот пример показал, что сокращение длины глицин-серинового линкера с 35GS до 9GS оказывает минимальное влияние на способность одновременно связывать обе мишени на клеточной мембране и генерировать световой сигнал. В совокупности эти данные показали, что биспецифичное анти-PD-1/LAG-3 человека нанотело F023700924 может связывать обе мишени одновременно, если обе мишени экспрессируются на одной клетке.

Пример 8. Анализ с использованием генно-модифицированных клеток Jurkat.hPD-1.IL21uc и THP-1.PD-L1.

Клон DT999A1 представляет собой экспрессирующий трансген PD-1 клон клеток Jurkat с люциферазным репортером под контролем IL-2 (Jurkat.hPD-1.IL21uc). Клетки Jurkat.hPD-1.IL21uc выращивали в среде RPMI (Corning Cellgro 10 040-CV), содержащей 10% температурно инактивированной FBS (Hyclone SH30910.03), 2 mM L-глутамина (Cellgro 25-005-CI), 2 мкг/мл пуромицина (Sigma P9620) и 0,5 мг/мл генетицина (Gibco 10131 027). Клетки пересевали два раза в неделю после первичного посева клеток с плотностью 2×10^5 клеток/мл, и пересевали, когда плотность превышала 1×10^6 клеток/мл. Экспрессирующие трансген PD-L1 клетки THP-1 (THP-1.PD-L1) выращивали в среде RPMI, содержащей 10% температурно инактивированной FBS, 2 mM L-глутамина и 0,5 мкг/мл пуромицина. Клетки пересевали дважды в неделю после первичного посева с плотностью 3×10^5 клеток/мл и пересевали, когда они достигали плотности 1×10^6 клеток/мл.

Биологический анализ проводили с использованием среды для анализа (среда RPMI без Фенолового Красного (Gibco 11835 030) с добавлением 10% диализованной FBS (Hyclone, SH30079.03). Приготавливали исходный 600 мкМ раствор альбумина человека (Sigma, A8763). 4-кратный (120 мкМ) раствор приготавливали с использованием среды для анализа и добавляли по 25 мкл в планшеты с белыми стенками, обработанные для культивирования клеток (Costar 3903). Нанотела разводили с использования среды для анализа, чтобы получить 4-кратную начальную концентрацию. После этого делали шесть серийных 10-кратных разведений нанотел. Добавляли по 25 мкл разведений нанотел в содержащие альбумин планшеты с белыми стенками, обработанные для культивирования клеток. Инкубировали раствор нанотел с альбумином в течение 20-30 мин при комнатной температуре. Собирали клетки THP-1.PD-L1 из флакона T-75, клетки центрифугировали и ресуспендировали в 10 мл среды для анализа. Подсчитывали число клеток в суспензии, и его подвоили, чтобы получить клеточную суспензию 4×10^6 клеток/мл. Собирали клетки Jurkat.hPD-1.IL21uc из флакона T-75, клетки центрифугировали и ресуспендировали в 10 мл среды для анализа. Подсчитывали число клеток в суспензии, и его подвоили, чтобы получить суспензию клеток Jurkat.hPD-1.IL21uc 1×10^6 клеток/мл. Смешивали равный объем клеток THP-1.PD-L1 и клеток Jurkat.hPD-1.IL21uc. К этой суспензии добавляли 2 нг/мл LPS (2x) и 100 нг/мл IFN- γ (2x). Добавляли суспензию 50 мкл, содержащую стимуляторы [IFN- γ (R & D системы 285-IF/CF)+LPS (Sigma L4391)] к разведениям нанотел. Инкубировали клетки с разведениями нанотел в течение приблизительно 22 часов в инкубаторе. По истечении 22 часов аккуратно добавляли по 10 мкл 55 нг/мл раствора анти-CD3 антитела (BD Pharmingen 555336, 11x рабочий раствор) и оставляли в инкубаторе еще на два часа. После двух часов инкубации на дно планшета наклеивали белую пленку (Perkin Elmer 6005199) и добавляли по 100 мкл реагента One-Glo (Promega E6120).

Инкубировали при встряхивании при комнатной температуре в течение 3 мин. Люминесценцию регистрировали на планшетном ридере, способном регистрировать люминесцентное излучение с временем интегрирования 0,1 с. Исходные данные в RLU (относительные световые единицы) могут быть нанесены на график напрямую, или могут быть нанесены на график в размах изменения люциферазного сигнала, полученных делением сигнала из экспериментальных лунок, на сигнал из лунок, в которых не было нанотела. Данные этих экспериментов приведены на фиг. 12 (A-E).

Этот пример показал, что моновалентное анти-PD-1 человека нанотело F023700706, связываясь с PD-1 человека, экспрессируемым линией Т-клеток, блокирует взаимодействие PD-1 с PD-L1, экспрессируемым совместно культивируемой клеточной линией, снимая опосредованную PD-L1 супрессию Т-клеток, тем самым позволяя Т-клетке в большей степени реагировать на агонист Т-клеточного рецептора благодаря ингибированию процесса супрессии, опосредованной PD-L1 (фиг. 12 (A)). Кроме того, этот пример продемонстрировал, что биспецифичные анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела, F023700931 и F023700924, связываясь с PD-1 человека, экспрессируемым линией Т-клеток, блокировали взаимодействие PD-1 с PD-L1, тем самым позволяя Т-клетке в большей степени реагировать на агонист Т-клеточного рецептора благодаря ингибированию процесса супрессии, опосредованной PD-L1 (фиг. 12 (B)). Также приведены данные для моноспецифичных бивалентных контрольных нанотел против PD-1 человека (F023700933) и против LAG-3 человека (F023700962). Кроме того, этот пример показал, что биспецифичные анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела F023700969 и F023700970, содержащие 20GS- или 9GS-линкеры, соответственно, имели аналогичную активность с исходной молекулой F023700924, содержащей 35GS-линкер (фиг. 12 (C)). Аналогичным образом, биспецифичные анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела F023701016 и F023701017, содержащие 20GS или 9GS линкеры, соответственно, имели аналогич-

ную активность с исходной молекулой F023700931, содержащей 35GS-линкер (фиг. 12 (D)). Кроме того, этот пример продемонстрировал, что дополнительные аминокислотные варианты оптимизированного по последовательности моновалентного анти-PD-1 человека нанотела F023700706, связываются с PD-1 человека, экспрессируемым линией Т-клеток, блокируя взаимодействие PD-1 с PD-L1, тем самым, позволяя Т-клетке реагировать в большей степени на агонист Т-клеточного рецептора благодаря ингибированию PD-L1-опосредованной супрессии Т-клеток (фиг. 12 (E)).

Пример 9. Анализ с использованием SEB-активированных PBMC человека.

Размораживали мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) в полной среде RPMI с 10%-й сывороткой крови человека (RPMI 1640 Glutamax (Thermo Fisher Scientific, кат. 11875085), 1× смесью пенициллина-стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, кат. № 15140148), 1× бета-меркаптоэтанолом (Thermo Fisher Scientific, кат. № 21985023), 1× HEPES (Thermo Fisher Scientific, кат. № 15630080), 1× пируватом натрия (Thermo Fisher Scientific, кат. № 11360070), 1× незаменимыми аминокислотами (Thermo Fisher Scientific, кат. № 11140076), сывороткой человека (Sigma, кат. 1 H4522-100ML, лот # SLBP2783V). Клетки ресуспендировали до плотности $2,5 \times 10^6$ клеток/мл и разносили по 100 мкл на лунку в 96-луночного U-образного планшета по $2,5 \times 10^5$ клеток/лунку. Приготавливали серию 3-кратных разведений для получения 4-кратных рабочих растворов и построения 6-точечной кривой доза-эффект. Добавляли по 50 мкл раствора нанотела в лунки и инкубировали 15-30 минут при комнатной температуре, приготавливая при этом раствор стрептококкового эндотоксина В (SEB). Исходный раствор SEB (Toxin Technology Inc, кат. № BT202) приготавливали восстановлением SEB до 1 мг/мл в дистиллированной воде и замораживая его при -80°C . Рабочий раствор 2 мкМ получали путем добавления 2 мкл на мл среды, и 2 мкМ рабочий раствор серийно разбавляли (с кратностью 1:10), чтобы получить кривую титрования. Добавляли по 50 мкл в соответствующие лунки для построения кривой титрования в качестве внутреннего стандарта для того, чтобы подтвердить, что анализ проходит, как ожидалось, и для определения максимального ответа, который может быть вызван у разных доноров. Рабочий раствор SEB (2 мкМ) разбавляли до концентрации 40 нМ и добавляли по 50 мкл в лунки для стимуляции PBMC (конечная концентрация SEB составляла 10 нМ). Инкубировали в течение 72 часов при 38°C и 5% CO_2 . 100 мл супернатанта переносили в новый 96-луночный планшет и разбавляли 1:2 для анализа на IL-2 с использованием набора MSD V-plex human IL-2 (MesoScale Discovery, K151QQD-1). Остаток хранили при -80°C . Данные этих экспериментов приведены на фиг. 13 (A-R).

Этот пример продемонстрировал, что биспецифичные анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела F023700931 и F023700924 давали увеличение уровня IL-2 после стимуляции агонистами Т-клеточных рецепторов мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), полученных от нескольких доноров (A-R).

Пример 10. Анализ реакции смешанной популяции лимфоцитов (MLR).

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) очищали из лейкоцитарной массы и замораживали в криостате с жидким азотом. Замороженные PBMC человека оттаивали, разбавляли в полной RPMI (RPMI с добавлением 10%-й сыворотки человека), центрифугировали при $450 \times g$ в течение 5 минут, и осадок клеток ресуспендировали в полной RPMI (среда Gibco RPMI 1640 (ThermoFisher Scientific, 11875-119) с сывороткой человека (Sigma-Aldrich, H4522-100 mL). Моноциты обогащали с использованием набора для обогащения моноцитов человека (STEMCELL technologies, 19059). Клетки переносили в 6-луночные планшеты с плотностью 1×10^6 клеток/мл (5 мл/лунку) в полной RPMI, содержащей 100 нг/мл GM-CSF (R & D Systems, 215-GM-110) и 50 нг/мл IL-4 человека (R & D Systems, 204-IL-010/CF). Моноциты инкубировали при 37°C в течение 5 дней, чтобы получить дендритные клетки (DC). Дендритные клетки, полученные из моноцитов (Mo-DC), собирали на 6-й день, подсчитывали и использовали в MLR-анализе в качестве стимуляторов.

В день начала эксперимента замороженные PBMC человека оттаивали и разводили в два раза в полной RPMI, содержащей пенициллин/стрептомицин. CD4^+ Т-клетки от каждого донора обогащали с использованием набора для выделения Т4 клеток EasySep Human CD4 (STEMCELL technologies, 17952). Выделенные CD4^+ Т-клетки ресуспендировали с плотностью 1×10^6 клеток/мл в полной RPMI. Mo-DC смешивали в соотношении 1:10 (1×10^5 клеток/мл) с CD4^+ Т-клетками (1×10^6 клеток/мл), и смесь клеток высевали в 96-луночный U-образный планшет в количестве 200 мкл/лунку. Нанотела серийно разводили (1:4) и получали 5-кратные рабочие растворы. 50 мкл каждого разведения добавляли к 200 мкл культуры, получая 1× конечную концентрацию нанотел. Культуральные супернатанты собирали на 5-й день после начала эксперимента для количественного определения $\text{IFN}\gamma$ с использованием V-plex Human Pro-inflammatory Panel I (MesoScale Discovery, K15052D-1). Данные этих экспериментов приведены на фиг. 14 (A-F).

Этот пример продемонстрировал, что биспецифичные анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела F023700931 и F023700924 повышали уровень $\text{IFN}\gamma$ после первичной стимуляции CD4^+ Т-клеток с использованием аллогенных Mo-DC, полученных от разных доноров (A-F).

Пример 11. Анализ с использованием генно-инженерно модифицированных клеток 3A9.hLAG-3.

Линия 3A9.hLAG3 представляет собой экспрессирующую трансген LAG-3 человека мышиную Т-

клеточную гибридому 3A9. Линия LK35.2 (ATCC; HB-98) представляет собой мышиную В-клеточную гибридому, которая несет поверхностные молекулы I-Ad^k и I-Ed^k, которые представляют специфичный антиген (а именно, пептид яичного лизоцима кур (HEL) DGSTDYGILQINSRWW) ограниченной МНС класса II Т-клеточной гибридоме 3A9. Клетки 3A9.hLAG3 подсчитывали и ресуспендировали с плотностью 4×10^6 клеток/мл в свежей среде [RPMI (Invitrogen, 61870 036) с добавлением 10% FBS и пенициллина/стрептомицина]. Клетки LK35.2 подсчитывали и ресуспендировали с плотностью 1×10^6 клеток/мл в свежей среде. Добавляли по 25 мкл клеток 3A9.hLAG3 (клетки 1Е5) в лунки 96-луночного плоскодонного планшета (Corning 3610). Приготавливали 4х (200 мкМ) раствор альбумина человека (Sigma, A8763) и добавляли по 25 мкл к клеткам. Нанотела разводили до концентрации 5х в полной среде и добавляли по 20 мкл 5-кратного раствора нанотел к клеткам. Клетки 3A9.hLAG3 инкубировали с нанотелами в течение 30 мин при 37°C. Приготавливали 500 мкМ исходный раствор HEL-пептида. (GenScript custom peptide) и хранили при 20°C. Разводили исходный раствор HEL-пептида 1:20 (до 25 мкМ) в клеточной культуральной среде, а затем дополнительно разводили HEL-пептид 1:833 в клетках LK35.2 (конечная концентрация HEL ≈ 30 нМ). Клетки LK35.2 инкубировали с пептидом в течение 30 минут при 37°C. Добавили по 33 мкл экспонированных с пептидом клеток LK35.2 в 96-луночный планшет, содержащий экспонированные с нанотелом клетки 3A9.hLAG 3. Инкубировали культуру при 37°C в течение 24 ч. Открывали планшеты при 300хg в течение 5 мин и собирали супернатант для анализа на IL-2 (IL-2 Mesoscale V-Plex, Mesoscale K152QQD-4). Данные этих экспериментов представлены на фиг. 15 (A-D).

Этот пример показал, что моновалентное анти-LAG-3 человека нанотело F023700842 связывается с LAG-3 человека, экспрессируемым Т-клеточной линией и блокирует взаимодействие LAG-3 с МНС класса II, экспрессируемым совместно культивируемой клеточной линией, снимая супрессию Т-клеток, опосредуемую МНС класса II, тем самым позволяя Т-клетке реагировать в большей степени на агониста Т-клеточного рецептора благодаря ингибированию супрессии, опосредованной МНС класса II. Эффективность ингибирования МНС класса II моновалентным анти-LAG-3 человека нанотелом F023700842 было аналогично активности родительского aF023700656, из которого оно было получено (фиг. 15 (A)). Кроме того, этот пример продемонстрировал, что биспецифичные анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела F023700931 и F023700924 связываются с LAG-3 человека, экспрессируемым Т-клеточной линией и блокируют взаимодействие LAG-3 с МНС класса II, тем самым позволяя Т-клетке реагировать в большей степени на агониста Т-клеточного рецептора благодаря ингибированию супрессии, опосредованной МНС II класса (фиг. 15 (B)). Также приведены данные для моноспецифичных бивалентных контрольных нанотел против PD-1 человека (F023700933) и против LAG-3 человека (F023700962). Кроме того, этот пример показал, что биспецифичные анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела F023700969 и F023700970, содержащие 20GS- или 9GS-линкеры, соответственно, имели аналогичную активность относительно исходной молекулы F023700924, содержащей 35GS-линкер (фиг. 15 (C)). Аналогичным образом, биспецифичные анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела F023701016 и F023701017, содержащие 20GS- или 9GS-линкеры, соответственно, имели аналогичную активность с исходной молекулой F023700931, содержащей 35GS-линкер (фиг. 15 (D)).

Пример 12. Биологический анализ с использованием генно-инженерно модифицированных клеток Jurkat.hPD-1.LAG-3.

Создание клеток Jurkat.LAG-3.PD-1 (клон DT1088-G10PD1).

Трансген LAG-3 человека вводили в клетки Jurkat (Je6.2.11) с использованием ретровирусной системы доставки с пуromицином в качестве селективного маркера. Для отбора клона (DT1088G10) с оптимальной экспрессией LAG-3 и CD3 использовали метод предельных разведений. Трансген PD-1 человека вводили в клон DT1088G10 с использованием лентивирусной системы доставки с гентицином в качестве селективного маркера. Клетки были отсортированы на FACS (сортере флуоресцентно-активируемых клеток) по высокому уровню экспрессии LAG-3 и PD-1. Пул отсортированных клеток поддерживали и субкультивировали в полной среде RPMI [RPMI (Corning 10-040-CV), дополненной 10% FBS (Hyclone SH30910.03), 1 мМ пируватом натрия (BioWhittaker, 13-115E), 2 мМ L-глутамином (Corning CellGro, 25-005-CI), 10 мМ HEPES (Corning, 26-060-CI), 1х незаменимыми аминокислотами (Sigma, M7145), 0,2 мкг/мл пуromицина (Sigma P9620) и 0,5 мг/мл G418 (Gibco 10131-027)].

Создание экспрессирующих клеток Raji.PD-L1.

Трансген PD-L1 человека вводили в клетки Raji (ATCC CCL-86) с использованием ретровирусной системы доставки с пуromицином в качестве селективного маркера. Клетки сортировали для обогащения по экспрессии PD-L1 и МНС класса II (эндогенной). Обогащенный пул клеток поддерживали и субкультивировали в полной среде RPMI (среда RPMI, дополненная 10% FBS (Hyclone), 2 мМ L-глутамин, 10 мМ HEPES и 0,25 мкг/мл пуromицина).

Исходный раствор SED-токсина приготавливали восстановлением SED (Toxin technology, DT303) до концентрации 1 мг/мл в стерильной дистиллированной воде и хранили при -80°C. Клетки Raji.PD-L1 предварительно нагружали токсином путем инкубации суспензии $0,27 \times 10^6$ клеток Raji-PD-L1/мл с SED-токсином ($1,3 \times 130$ нг/мл, конечная концентрация 100 нг/мл) в среде RPMI, содержащей 10% диализованной FBS (Hyclone SH30079.03), в течение 30 минут при 37°C в инкубаторе. Приготавливали суспен-

зию клеток Jurkat.LAG-3.PD-1 с плотностью 8×10^6 /мл в среде RPMI, содержащей 10% диализованной FBS. Приготавливали 8-точечные серийные 4-кратные разведения нанотел (12×120 мкг/мл) с начальной концентрацией в анализе 10 мкг/мл.

45 мкл суспензии клеток Jurkat.LAG-3.PD-1 (8×10^6 клеток/мл) инкубировали с 45 мкл разведенных нанотел при комнатной температуре в течение 30 минут в круглодонном планшете (Corning 3359). После 30 минут к смеси клеток Jurkat.LAG-3.PD-1 и нанотел добавляли по 36 мкл альбумина человека (Sigma, A8763; 15×450 мкМ для получения конечной концентрации в анализе - 30 мкМ). В аналитические планшеты (Thermo Scientific № 167008) добавляли по 115 мкл нагруженных SED клеток Raji.PD-L1. На SED-нагруженные клетки Raji.PD-L1 аккуратно наслаивали по 35 мкл смеси клеток Jurkat.LAG-3.PD-1, нанотел и альбумина. Аналитические планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. После 24-часовой инкубации 75 мл супернатанта переносили в планшет (Corning, № 3605) и замораживали при -80°C. Образцы анализировали с использованием набора V-plex MS-IL-2 (Mesoscale devices, кат.№ K151QQD). Значения EC₅₀ рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Данные этих экспериментов представлены на фиг. 16 (А-В).

Этот пример продемонстрировал, что биспецифичные анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела F023700931 и F023700924 связываются как с PD-1 человека, так и с LAG-3 человека, экспрессируемыми линией Т-клеток, блокируют взаимодействие PD-1 с PD-L1, блокируют взаимодействие LAG-3 с МНС класса II, тем самым позволяя Т-клеткам в большей степени реагировать на агонист Т-клеточного рецептора благодаря ингибированию двойной супрессии Т-клеток, опосредуемой PD-L1 и МНС класса II (фиг. 16 (А)). Моноспецифичные бивалентные контрольные нанотела против PD-1 человека (F023700933) и против LAG-3 человека (F023700862) были способны только блокировать один из двух ингибирующих механизмов, что приводило к гораздо более скромному ответу Т-клеток на агонист Т-клеточного рецептора. Кроме того, этот пример показал, что биспецифичные анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела F023700969 и F023700970, содержащие 20GS- или 9GS-линкеры, соответственно, имели аналогичную активность с исходной молекулой F023700924, содержащей 35GS-линкер. Аналогично биспецифичные анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела F023701016 и F023701017, содержащие 20GS- или 9GS-линкеры, соответственно, имели активность аналогичную исходной молекуле F023700931, содержащей 35GS-линкер (фиг. 16 (В)).

Пример 13. Анализ с использованием клона Т-клеток человека и JY.hPD-L1.

Создание и культивирование клона CD4⁺ Т-клеток человека МНС класса II аллоантиген-специфичный CD4⁺ Т-клеточный клон BC4-49 был создан 2 раундами реакции смешанной популяции лейкоцитов с EBV-трансформированной В-клеточной линией JY и клонирован предельными разведениями. Клон повторно стимулировали аллоспецифичными антигенами с интервалом в 2 недели и культивировали в среде Иссела (IMDM, Gibco 12440-053, с сывороткой человека (AB), Gemini 100512, пеницилином/стрептомицином, Mediatech 30-002-CI, альбумином человека, Sigma A9080, ITS-X, Gibco 51500056, трансферинном, Roche 10652202001, PA Bioxtra Sigma p5585, LA-OA-альбумином, Sigma L9655). Свежие РВМС выделяли из двух лейкоцитарных пленок человека, полученных Центром крови Стэнфорда, и объединяли в соотношении клеток 1:1. Перед использованием РВМС облучали в гамма-излучателе дозой 4000 рад. Клетки JY дикого типа приготавливали и облучали дозой 5000 рад. Клоны Т-клеток культивировали с питающими клетками в 24-луночном планшете в объеме 1 мл на лунку с конечными концентрациями CD4⁺ Т-клеток $0,2 \times 10^6$ /мл, облученных РВМС 1×10^6 /мл, облученных JY $0,1 \times 10^6$ /мл и 100 нг/мл РНА (Sigma L9017). Рекombинантный IL-2 человека (R & D Systems, 202-IL/CF) добавляли до конечной концентрации 100 нг/мл на 3-й день после повторной стимуляции и восполняли каждые 3-4 дня на протяжении всего процесса размножения клеток. Клетки пассировали до оптимальной концентрации между $0,5-1,0 \times 10^6$ /мл. На 7-й день после повторной стимуляции на поверхности Т-клеток экспрессировался LAG-3 на высоком уровне и PD-1 на среднем уровне.

Функциональный анализ с CD4⁺ Т-клетками человека Аллоантиген-специфичные CD4⁺ Т-клетки собирали из 24-луночных культуральных планшетов на 7-й день после повторной стимуляции антигеном, затем дважды промывали 20 мл PBS (Hyclone, SH3002802), содержащим 2 мМ ЭДТА (Invitrogen, 15575-38), с помощью центрифугирования. Осадки повторно ресуспендировали до моноклеточной суспензии в среде Иссела. Для тестируемых нанотел готовили 5-кратные серийные разведения в среде Иссела, начиная с самой высокой концентрации 133 нМ с общим количеством 7 разведений в объеме 100 мкл в 96-луночных U-образных культуральных планшетах (Falcon, 353077). Пятьдесят микролитров суспензии Т-клеток с плотностью 4×10^5 клеток/мл добавляли в лунки, содержащие разведения нанотел. Смесь нанотел и Т-клеток предварительно инкубировали в течение 1 часа в инкубаторе при 37°C с 5% CO₂. Трансген PD-L1 человека, экспрессируемый клетками JY (JY.hPD-L1), использовали в совместном культивировании, чтобы обеспечить аллоспецифичные антигены. JY.hPD-L1, культивированные во флаконе Т-75 (Thermo Scientific, 156499) в среде RPMI (Corning Cellgro, 10-040-CV) с 10% FCS, собирали и облучали в гамма-излучателе дозой 5000 рад, затем дважды промывали PBS, содержащим 2 мМ ЭДТА, с помощью центрифугирования. Осадок повторно ресуспендировали в среде Иссела и фильтровали через клеточный фильтр 40 мкм перед посевом. По 50 мкл/лунку суспензии JY.hPD-L1 с плотностью 2×10^5

клеток/мл добавляли к предварительно инкубированной смеси нанотел и Т-клеток, при этом соотношение Т-клеток и клеток JY.hPD-L1 составляло 2:1. Все точки выполняли в дубликатах. После приблизительно 3-дневного культивирования собирали 100 мкл надосадочной жидкости/лунку для количественного определения IFN γ человека. Твердофазный ИФА на IFN γ проводили для оценки уровня IFN γ для пула супернатантов из дубликатов с использованием набора hIFN γ Quantikine (R & D Systems, SIF50). Анализ проводили в соответствии со стандартным протоколом, предоставленным производителем. Значения EC₅₀ рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Данные этих экспериментов приведены на фиг. 17 (A-C).

Этот пример продемонстрировал, что биспецифичные анти-PD-1 человека/LAG-3 нанотела F023700931 и F023700924 связывались как с PD-1 человека, так и с LAG-3 человека, экспрессируемым клоном Т-клеток, блокировали взаимодействие PD-1 с PD-L1, блокировали взаимодействие LAG-3 с MHC Class II, тем самым позволяя Т-клеткам в большей степени реагировать на аллогенную стимуляцию благодаря ингибированию двойной супрессии, опосредованной PD-L1 и MHC класса II (фиг. 17 (A)). Моноспецифичные бивалентные контрольные нанотела против PD-1 человека (F023700933) и против LAG-3 человека (F023700862) были способны блокировать только один из двух ингибирующих механизмов, что приводило к гораздо меньшему ответу Т-клеток на аллогенную стимуляцию. Кроме того, этот пример показал, что биспецифичные анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела F023700969 и F023700970, содержащие 20GS- или 9GS-линкеры, соответственно, имели аналогичную активность с исходной молекулой F023700924, содержащей 35GS-линкер (фиг. 17(C)). Аналогично, биспецифичные анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела F023701016 и F023701017, содержащие 20GS- или 9GS-линкеры, соответственно, имели аналогичную активность с исходной молекулой F023700931, содержащей 35GS-линкер (фиг. 17 (B)).

Пример 14. Оценка связывания ранее существовавших антител ("преантител") с F023700924 и F023700931.

Связывание преантител с нанотелами, захваченными на сывороточном альбумине человека (HSA), оценивали с использованием ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). PBS/Tween (забуференный фосфатом физиологический раствор, pH 7,4, 0,005% Tween 20) использовали в качестве аналитического буфера, и эксперименты проводили при 25°C. Лигандные дорожки чипа ProteOn GLC Sensor Chip активировали EDC/NHS (скорость потока 30 мкл/мин), и наносили сывороточный альбумин человека в концентрации 10 мкг/мл в буфере ProteOn Acetate pH 4,5 (скорость потока 100 мкл/мин), чтобы получить иммобилизацию на уровне приблизительно 3600 RU. После иммобилизации поверхности дезактивировали этаноламином-HCl (скорость потока 30 мкл/мин). Нанопреантитела прогоняли в течение 2 минут при 45 мкл/мин через HSA-поверхности, чтобы получить уровень захвата нанотел приблизительно 600 RU для трехвалентного F023700924 и приблизительно 1000 RU для пентавалентного F023700931. Образцы, содержащие ранее существовавшие антитела, разводили 1:10 в PBS-Tween20 (0,005%) перед прогоном в течение 2 минут при 45 мкл/мин с последующей стадией диссоциации в течение 400 с. После каждого цикла (т.е. перед новой стадией захвата нанотела и стадией прогона крови) HSA-поверхности регенерировали 2-минутным прогоном HCl (100 mM) со скоростью 45 мкл/мин. Обработка данных сенсограмм и анализ данных выполняли с помощью ProteOn Manager 3.1.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Сенсограммы, показывающие связывание ранее существовавшими антителами, были получены после двойной нормализации путем вычитания 1) диссоциации нанотело-HSA и 2) неспецифичного связывания в контрольной дорожке, содержащей только HSA. Уровни связывания с преантителами определяли в заданной точке 125 с (через 5 с после окончания связывания). В качестве контроля образцы, содержащие ранее существовавшие антитела, также тестировали на связывание с трехвалентным нанотелом, которое не было модифицировано для уменьшения связывания с этими преантителами (T013700112). Данные этих экспериментов приведены на фиг. 19 (A-I).

Биспецифичное нанотело к PD-1/LAG-3 человека, F023700924, содержало три модуля (один модуль на PD-1, один модуль на LAG-3 и один модуль на альбумин); тогда как F023700931 представляет собой пентамодульное нанотело (дублирующие модули на PD-1, дублирующие модули на LAG-3 и один модуль на альбумин). Одним из компонентов подхода оптимизации последовательности было включение аминокислотных замен в каркасные последовательности нанотела, которые снижали реактивность, присутствующую в сыворотке человека, на модули нанотела. Этот пример продемонстрировал, что ранее существовавшая реактивность, обнаруженная в панели сывороток от здоровых доноров на 3-модульное биспецифичное анти-PD-1/LAG-3 человека нанотело F023700924, снизилась по сравнению с реактивностью преантител к другому 3-модульному нанотелу T013700112, которое не содержит этих каркасных аминокислотных замен (в двух временных точках). Реактивность в отношении 5-модульного биспецифичного анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела F023700931 была выше, чем на 3-модульное нанотело F023700924 (фиг. 19 (A-B)). Кроме того, этот пример продемонстрировал, что реактивность преантител, обнаруженная в панели сывороток от больных раком, на 3-модульное биспецифичное анти-PD-1/LAG-3 человека нанотело F023700924 снизилась по сравнению с реактивностью преантител на другое 3-модульное нанотело T013700112, которое не содержало эти аминокислотные замены в каркасной области (в двух вре-

менных точках). Реактивность в отношении 5-модульного биспецифичного анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела F023700931 была выше, чем на 3-модульное нанотело F023700924 (фиг. 19 (C-D)). Наконец, реактивность панели сывороток от пациентов с онкологическими заболеваниями в отношении F023700924 и F023700931 была разделена на основании вида рака (фиг. 19 (E-I)).

Пример 15. Измерение аффинности оптимизированных по последовательности нанотел против LAG-3 человека с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Кинетический анализ нанотел проводили с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием прибора Biacore T100 (GE Healthcare). HBS-EP+(0,01 М HEPES pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05 об.% Surfactant P20) использовали в качестве аналитического буфера, и эксперименты проводили при 25°C. Две проточных дорожки Series S Sensor Chip CM5 активировали с помощью EDC (200 мМ) /NHS (50 мМ), и анти-IgG (Fc) человека (GE Healthcare, BR100839) пропускали в концентрации 5 мкг/мл в поставляемом иммобилизационном буфере (10 мМ ацетата натрия, pH 5,0), чтобы получить уровень иммобилизации приблизительно 2000 RU. После иммобилизации поверхности дезактивировали 1М этаноламина/HCl (pH 8,5). Скорость потока во время подготовки сенсора задавали 5 мкл/мин.

В кинетическом анализе LAG3-hFc (62,5 нМ) человека пропускали в течение 1 минуты при 10 мкл/мин через одну поверхность анти-IgG человека (Fc), чтобы получить уровень захвата приблизительно 600 RU. 2,5-кратные серийные разведения нанотел (а именно, от 5 мкМ до 3,3 нМ для F023700842) приготавливали в аналитическом буфере перед прогоном в течение 2 минут при 45 мкл/мин с последующей диссоциацией в течение 900 с. После каждого цикла (т.е. перед новым прогоном нанотела и захвата LAG3 человека-hFc) анти-hIgG (Fc)-поверхности регенерировали путем 2-минутного пропускания MgCl₂ (3М) со скоростью 10 мкл/мин.

Обработку сенсограмм и анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения Biacore T100 Evaluation Software Version 2.0.4 (GE Healthcare). Сенсограммы, показывающие связывание нанотел, были получены после двойной нормализации путем вычитания 1) диссоциации LAG3-человека-hFc/анти-hIgG (Fc) и 2) неспецифического связывания с эталонным проточным каналом. Обработанные кривые оценивали путем подгонки к модели "Ленгмюр с переносом масс".

Этот пример продемонстрировал, что моновалентное нанотело F023700842 к LAG-3 человека с высоким сродством связывалось с LAG-3 человека.

Таблица Е
Измерение аффинности нанотел к LAG-3 человека с помощью поверхностного плазмонного резонанса

		k _a (1/Мс)	k _d (1/с)	KD (М)
F023700929	PD-1-Fc человека	2.0E+06	5.9E-04	2.9E-10
F023701192		2.5E+06	3.2E-03	1.3E-09
F023701193		3.2E+06	7.5E-03	2.4E-09
F023700842	LAG-3-Fc человека	9.2E+05	1.9E-02	2.1E-08
F023700924	Сывороточный альбумин человека	6.4E+04	7.7E-03	1.2E-07
F023700931		3.2E+04	8.2E-03	2.5E-07
F023700924	Сывороточный альбумин макака-резуса	6.9E+04	7.9E-03	1.2E-07
F023700931		3.2E+04	8.4E-03	2.7E-07

Пример 16. Измерение аффинности оптимизированных по последовательности нанотел против PD-1 человека с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Кинетический анализ нанотел проводили SPR-методом с использованием прибора Biacore T100 (GE Healthcare). HBS-EP+(0,01 М HEPES pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05 об.% Surfactant P20) использовали в качестве аналитического буфера, и эксперименты проводили при 25°C. Две проточных дорожки Series S Sensor Chip CM5 активировали с помощью EDC (200 мМ)/NHS (50 мМ). hPD-1-hFc вводили (4 раза) в концентрации 5 мкг/мл в подходящем иммобилизационном буфере (10 мМ ацетата натрия, pH 4,5), чтобы получить уровень иммобилизации приблизительно 303 RU. После иммобилизации поверхности дезактивировали 1М этаноламина/HCl (pH 8,5). Скорость потока во время подготовки сенсора задавали 5 мкл/мин.

В кинетическом анализе приготавливали 2,5-кратные серийные разведения нанотел (а именно, от 1 мкМ до 0,46 нМ для F023700929, F023701192 и F023701193) в аналитическом буфере перед введением в течение 2 минут при 45 мкл/мин с последующей диссоциацией в течение 900 с. После каждого цикла (т.е. перед стадией ведения нового нанотела) поверхности hPD1-hFc регенерировали 1-минутным введением 10 мМ глицина, pH 1,5, при 45 мкл/мин. Обработку сенсограмм и анализ данных выполняли с использованием Biacore T100 Evaluation Software Version 2.0.4 (GE Healthcare). Сенсограммы, показывающие связывание нанотел, были получены после двойной нормализации путем вычитания 1) неспецифического связывания с эталонным проточным каналом и 2) данных прогона буфера HBS-EP+. Обработанные кривые оценивали путем подгонки к модели "Ленгмюр с переносом масс".

Этот пример продемонстрировал, что моновалентное антитело к PD-1 человека с высоким сродст-

вом связывается с PD-1 человека. Кроме того, этот пример продемонстрировал, что дополнительные аминокислотные варианты оптимизированной последовательности моновалентного анти-PD-1 человека нанотела F023700929 (а именно, F023701192 и F023701193) связываются с высоким сродством с PD-1 человека.

Таблица F

Измерение аффинности оптимизированных по последовательности нанотел к PD-1 человека с помощью поверхностного плазмонного резонанса

	k_a (1/Mc)	T(ka)	k_d (1/c)	T(kd)	Rmax (RU)	T(Rmax)	KD (M)	kt (RU/Ms)	χ^2_{fit} (RU ²)	$\chi^2_{\text{fit}}/R_{\text{max}}$ (%)
F023700929	2.0E+06	220	5.9E-04	150	32.0	500	2.9E-10	2.9E+15	1.8	5
F023701192	2.5E+06	63	3.2E-03	66	27.9	380	1.3E-09	8.7E+07	0.8	3
F023701193	3.2E+06	49	7.5E-03	49	29.5	450	2.4E-09	4.2E+07	1.2	4

Пример 17. Измерение аффинности оптимизированного по последовательности полиспецифичного нанотела к PD-1/LAG-3 человека в отношении альбумина из различных биологических видов с помощью поверхностного плазмонного резонанса.

Кинетический анализ нанотел проводили SPR-методом с использованием прибора Biacore T100 (GE Healthcare). HBS-EP+(0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,05 об.% Surfactant P20) использовали в качестве аналитического буфера, и эксперименты проводили при 25°C. Четыре проточных дорожки Series S Sensor Chip CM5 были активированы EDC (200 mM)/NHS (50 mM), и сывороточный альбумин человека (Sigma, A3782, партия SLBD72 04V) или сывороточный альбумин макака-резуса (BioWorld, кат.№ 22070099-1, партия L15091001DA) пропускали со скоростью 5 мкг/мл в 10 mM ацетате натрия, pH 4,5, чтобы получить уровни иммобилизации 179-312 RU на трех проточных дорожках соответственно. После иммобилизации поверхности дезактивировали 1M этаноламином/HCl (pH 8,5). Скорость при подготовке сенсора задавали на 5 мкл/мин.

В кинетическом анализе 3-кратные серийные разведения нанотел (а именно, от 6 мкМ до 2,7 нМ) приготавливали в аналитическом буфере перед прогоном в течение 2 мин при 45 мкл/мин с последующей диссоциацией в течение 900 с. После каждого цикла (то есть перед введением новой концентрации нанотел) все поверхности регенерировали 10-секундным введением 10 mM глицина, pH 1,5, со скоростью 100 мкл/мин. Обработку сенсограм и анализ данных выполняли с помощью Biacore T100 Evaluation Software Version 2.0.4 (GE Healthcare). Сенсограммы, показывающие связывание нанотел, были получены после двойной нормализации путем вычитания 1) неспецифичного связывания с эталонным проточным каналом и 2) среднего значения для двух прогонов буфера HBS-EP+ на рабочих проточных каналах. Обработанные кривые оценивали путем подгонки на модель "Ленгмюр с переносом масс".

Этот пример продемонстрировал, что биспецифичные анти-PD-1/LAG-3 человека нанотела F023700931 и F023700924 связываются как с альбумином человека, так и с альбумином макака-резуса с аналогичной аффинностью.

Таблица G

Измерение аффинности оптимизированных по последовательности полиспецифичных анти-PD-1/LAG-3 человека нанотел в отношении альбумина из различных биологических видов методом поверхностного плазмонного резонанса

Нанотело	Валентность	HSA			RhSA			MSA		
		k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	KD (M)	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	KD (M)	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	KD (M)
F023700924-CHO-EXPI	Тример	6,4E+04	7,7E-03	1,2E-07	6,9E+04	7,9E-03	1,2E-07	>5,0E+05	<6,0E-01	-1,9E-06
F023700931-CHO-EXPI	Пентамер	3,2E+04	8,2E-03	2,5E-07	3,2E+04	8,4E-03	2,7E-07	>5,0E+05	<6,0E-01	-4,1E-06

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающая LAG-3 молекула, содержащая одиночный варибельный домен иммуноглобулина (ISVD), который связывается с LAG-3, содержащий

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность

GRTFSDYVMG (SEQ ID NO: 65) или DYVMG (аминокислоты 6-10 из SEQ ID NO: 65);

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность

AISESGGRTHYADSVKG (SEQ ID NO: 66) или AISESGGRTH (аминокислоты 1-10 из SEQ ID NO: 66);

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность TLLWWTSEYAPIKANDYDY (SEQ ID NO: 67).

2. Связывающая LAG-3 молекула по п.1, где одиночный варибельный домен иммуноглобулина содержит аминокислотную последовательность

EVQLVE SGGGVVQPGG SRLSCAASG RTFSDYVMGW FRQAPGKERE FVA AISESGG RTHYADSVKG RFTISRDNSK NTLYLQMNSL RPEDTALYYC ATTLLWWTSE YAPIKANDYD YWGQGTLLTV SS

(SEQ ID NO: 64); или указанную последовательность, содержащую мутацию E1D.

3. Биспецифичная связывающая молекула, связывающаяся с PD1 и LAG3, содержащая одиночный варибельный домен иммуноглобулина (ISVD), который связывается с PD1, содержащий

- CDR1, содержащую аминокислотную последовательность
IHAMG (SEQ ID NO: 3) или GSIASIHAMG (SEQ ID NO: 6);
CDR2, содержащую аминокислотную последовательность
VITXSGGITYYADSVKG (SEQ ID NO: 4; где X представляет собой W или V) или VITXSGGITY
(SEQ ID NO: 7; где X представляет собой W или V); и
CDR3, содержащую аминокислотную последовательность
DKHQSSXYDY (SEQ ID NO: 5, где X представляет собой W или F); и
одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, который связывается с LAG-3, содержащий
CDR1, содержащую аминокислотную последовательность
GRTFSDYVMG (SEQ ID NO: 65) или DYVMG (аминокислоты 6-10 из SEQ ID NO: 65);
CDR2, содержащую аминокислотную последовательность
AISESGGRTHYADSVKG (SEQ ID NO: 66) или AISESGGRTH (аминокислоты 1-10 из SEQ ID NO: 66);
и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность
TLLWWTSEYAPIKANDYDY (SEQ ID NO: 67).
4. Биспецифичная связывающая молекула по п.3, где одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, который связывается с PD1, содержит аминокислотную последовательность
DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAV
ITWSSGGITYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTL
VTSS
(SEQ ID NO: 57);
EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGGITY
YADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTSS
(SEQ ID NO: 99);
DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSSGGITY
YADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTSS
(аминокислоты 1-119 из SEQ ID NO: 101);
DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSSGGITY
YADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLVTSS
(SEQ ID NO: 103);
DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSSGGITY
YADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLVTSS
(SEQ ID NO: 104);
DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSSGGITY
YADSVKGRFTISRDPKNTVYLMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGTLVTSS
(SEQ ID NO: 105);
одиночный вариабельный домен иммуноглобулина, который связывается с LAG-3, содержит аминокислотную последовательность
EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTH
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLMNSLRPEDTALYYCATLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTL
VTSS
(SEQ ID NO: 64); или
DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFVAAISESGGRTH
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLMNSLRPEDTALYYCATLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTL
VTSS
(аминокислоты 1-128 из SEQ ID NO: 96).
5. Связывающая молекула по любому из пп.1-4, дополнительно содержащая удлинение С-конца, где удлинение С-конца представляет собой аланин.
6. Полиспецифичная связывающая молекула, связывающаяся с PD1 и LAG3, содержащая
PD1-ISVD, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57;
35GS-линкер, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58;
PD1-ISVD, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 99;
35GS-линкер, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58;
LAG3-ISVD, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 64;
35GS-линкер, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58;
LAG3-ISVD, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 64;
35GS-линкер, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58;
HSA-ISVD, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59; и
С-концевой аланин
или
PD1-ISVD, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57;
20GS-линкер, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 100;
PD1-ISVD, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 99;

- HSA-ISVD, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59; и С-концевой аланин
или
PD1-ISVD, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 103 (N73S);
35GS-линкер, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58;
LAG3-ISVD, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 64;
35GS-линкер, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58;
HSA-ISVD, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59; и С-концевой аланин
или
PD1-ISVD, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 103 (N73S);
9GS-линкер, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 125;
LAG3-ISVD, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 64;
9GS-линкер, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 125;
HSA-ISVD, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59; и С-концевой аланин.
7. Полиспецифичная связывающая молекула по п.6, содержащая аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 106-124.
8. Биспецифичная связывающая молекула по любому из пп.3 или 4, дополнительно содержащая увеличивающий период полувыведения фрагмент, где увеличивающий период полувыведения фрагмент представляет собой ISVD к сывороточному альбумину человека, который связывается с сывороточным альбумином человека, содержащий
CDR1, содержащую аминокислотную последовательность
GFTFSSFGMS (SEQ ID NO: 60) или SFGMS (аминокислоты 1-5 из SEQ ID NO: 60);
CDR2, содержащую аминокислотную последовательность
SISGSGSDTL YADSVKG (SEQ ID NO: 61) или SISGSGSDTL (аминокислоты 1-10 из SEQ ID NO: 61); и
CDR3, содержащую аминокислотную последовательность GGSLSR (SEQ ID NO: 62).
9. Биспецифичная связывающая молекула по п.8, где ISVD к сывороточному альбумину человека содержит аминокислотную последовательность
EVQLVESGGGVVQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL
YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGT LTVSSA (SEQ ID NO: 59).
10. Биспецифичная связывающая молекула по п.3, дополнительно содержащая увеличивающий период полувыведения фрагмент, где увеличивающий период полувыведения фрагмент представляет собой ISVD к сывороточному альбумину человека, который связывается с сывороточным альбумином человека, содержащий
CDR1, содержащую аминокислотную последовательность
GFTFSSFGMS (SEQ ID NO: 60) или SFGMS (аминокислоты 1-5 из SEQ ID NO: 60);
CDR2, содержащую аминокислотную последовательность
SISGSGSDTL YADSVKG (SEQ ID NO: 61) или SISGSGSDTL (аминокислоты 1-10 из SEQ ID NO: 61); и
CDR3, содержащую аминокислотную последовательность GGSLSR (SEQ ID NO: 62).
11. Биспецифичная связывающая молекула по п.10, где ISVD к сывороточному альбумину человека содержит аминокислотную последовательность
EVQLVESGGGVVQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTL
YADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGT LTVSSA (SEQ ID NO: 59).
12. Полинуклеотид, кодирующий связывающую молекулу по любому из пп.1-11.
13. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.12 для экспрессии связывающей молекулы в клетке-хозяине.
14. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.12 или вектор по п.13.
15. Способ получения связывающей молекулы по п.1, включающий
(а) введение полинуклеотида, кодирующего связывающую молекулу по п.1, в клетку-хозяина;
(б) культивирование клетки-хозяина в среде в условиях, благоприятных для экспрессии указанной связывающей молекулы с указанного полинуклеотида; и
(с) очистку связывающей молекулы из указанной клетки-хозяина
и/или указанной среды.
16. Связывающая молекула, полученная способом по п.15.
17. Способ предупреждения связывания LAG3 с МНС класса II, включающий контактирование указанного LAG3 со связывающей молекулой по любому из пп.1 или 2 или биспецифичной связывающей молекулой по любому из пп.4, 5 или 8-11.
18. Способ усиления иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества связывающей молекулы по любому из пп.1-9.

Нумерация по системе Кабата (VH)	Нумерация по системе Чотия (VH)	Нумерация по Aho	IMGT
11	11	12	12
14	14	15	15
41	41	48	46
42	42	49	47
87	87	101	99
89	89	103	101
108	108	144	---
110	110	146	---
112	112	148	---

Источник: <http://www.bioc.uzh.ch/plueckthun/antibody/Numbering/NumFrame.html>

Фиг. 1

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
1	WO 2008/071447, SEQ ID NO:348 (102C12)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAP GKEREFVAVITWGGITYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTQVTVSS
2	Эталонная последовательность A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAP GKEREFVAVITWGGITYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTQVTVSS
3	CDR1 (Кабат)	IHAMG
4	CDR2 (Кабат)	VITWGGITYYADSVKG
5	CDR3 (Кабат/Abm)	DKHQSSWYDY
6	CDR1 (Abm)	GSIASIHAMG
7	CDR2 (Abm)	VITWGGITYY
8	CDR3 (Кабат/Abm)	DKHQSSWYDY
9	Эталонная последовательность A (89T)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAP GKEREFVAVITWGGITYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTQVTVSS
10	Эталонная последовательность A (11V + 110K)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAP GKEREFVAVITWGGITYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAIYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTQVTVSS
11	Эталонная последовательность A (11V + 110Q)	EVQLVESGGGVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAEMSGISGWDYWGQGTQVQVSS
12	Эталонная последовательность A (11V + 112K)	EVQLVESGGGVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAEMSGISGWDYWGQGTQVTVKS
13	Эталонная последовательность A (11V + 112Q)	EVQLVESGGGVQAGGSLRLSCAASGGTF SFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAEMSGISGWDYWGQGTQVTVQS

Фиг. 2-1

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
14	Эталонная последовательность A (89L + 110K)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVKVSS
15	Эталонная последовательность A (89L + 110Q)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVQVSS
16	Эталонная последовательность A (89L + 112K)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVKS
17	Эталонная последовательность A (11V + 112Q)	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVQS
18	Эталонная последовательность A (11V + 89L)	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVSS
19	Эталонная последовательность (11V + 89L + 110K)	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVKVSS
20	Эталонная последовательность (11V + 89L + 110Q)	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVQVSS
21	Эталонная последовательность (11V + 89L + 112K)	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVKS
22	Эталонная последовательность (11V + 89L + 112Q)	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVQS
23	Связывающие PD1 молекула/фрагмент	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVSS

Фиг. 2-2

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
24	Связывающие PD1 молекула/фрагмент	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVSS
25	Эталонная последовательность (89T) + A	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEREFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVSSA
26	Эталонная последовательность A (11V + 110K) + A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVKVSSA
27	Эталонная последовательность A (11V + 110Q) + A	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVQVSSA
28	Эталонная последовательность A (11V + 112K) + A	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVKSA
29	Эталонная последовательность A (11V + 112Q) + A	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVQSA
30	Эталонная последовательность A (89L + 110K) + A	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVKVSSA
31	Эталонная последовательность A (89L + 110Q) + A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVQVSSA
32	Эталонная последовательность A (89L + 112K) + A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVKSA
33	Эталонная последовательность A (89L + 112Q) + A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGTFSTFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVQSA

Фиг. 2-3

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
34	Эталонная последовательность A (11V + 89L) + A	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGDTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVSSA
35	Эталонная последовательность A (11V + 89L + 110K) + A	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGDTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVKVSSA
36	Эталонная последовательность A (11V + 89L + 110Q) + A	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGDTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVQVSSA
37	Эталонная последовательность A (11V + 89L + 112K) + A	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGDTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVKSA
38	Эталонная последовательность A (11V + 89L + 112Q) + A	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGDTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVQSA
39	Связывающие PD1 молекула/фрагмент	EVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGDTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVSSA
40	Связывающие PD1 молекула/фрагмент	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGDTFSFYGMGWFRQAP GKEQEFVADIRTSAGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MNSLRPEDTALYYCAAEMSGISGWDYWGQGLTVTVSSA

Фиг. 2-4

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
41	HIS6-FLAG3-тэг	HHHHHHGAADYKDHGDYKDHIDYKDDDDKGAA
42	С-конец	VTVKS
43	С-конец	VTVQS
44	С-конец	VKVSS
45	С-конец	VQVSS
46	С-конец	VTVKSX(n)
47	С-конец	VTVQSX(n)
48	С-конец	VKVSSX(n)
49	С-конец	VQVSSX(n)
50	С-конец	VTVKSA
51	С-конец	VTVQSA
52	С-конец	VKVSSA
53	С-конец	VQVSSA
54	С-конец	VTVSS
55	С-конец	VTVSSX(n)
56	С-конец	VTVSSA

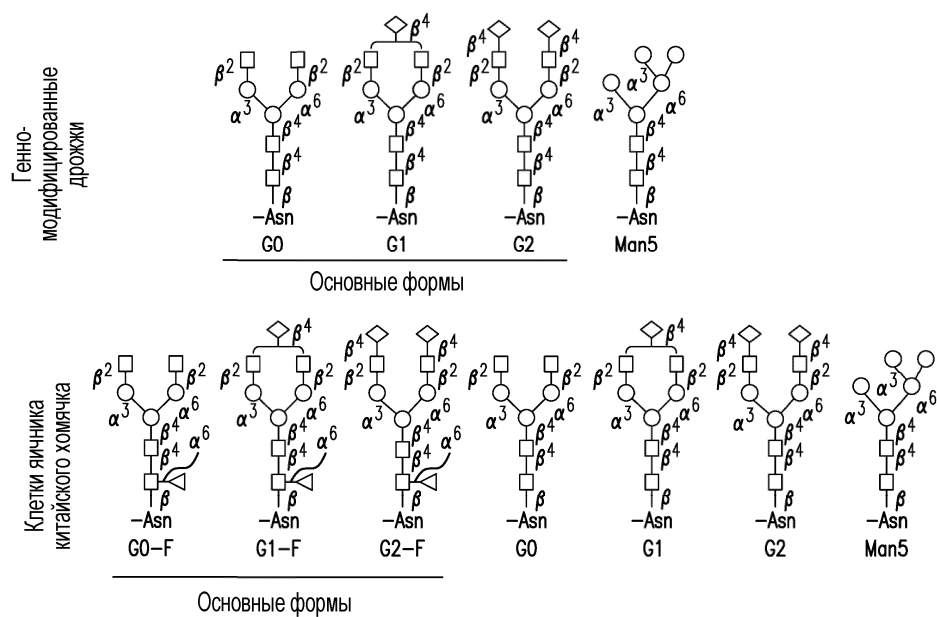
Фиг. 2-5

	20	40	60
SEQIDNO:1	EVQLVESGGG	LVAAGGSLRL	SCAASGSIAS
SEQIDNO:2		IHAMGWFRQA	PGKEREIVAV
SEQIDNO:9			ITWSGGITYY
SEQIDNO:10	V		
SEQIDNO:11	V		
SEQIDNO:12	V		
SEQIDNO:13	V		
SEQIDNO:14			
SEQIDNO:15			
SEQIDNO:16			
SEQIDNO:17			
SEQIDNO:18	V		
SEQIDNO:19	V		
SEQIDNO:20	V		
SEQIDNO:21	V		
SEQIDNO:22	V		
SEQIDNO:23	V..P		
SEQIDNO:24			
SEQIDNO:25	V		
SEQIDNO:26	V		
SEQIDNO:27	V		
SEQIDNO:28	V		
SEQIDNO:29			
SEQIDNO:30			
SEQIDNO:31			
SEQIDNO:32			
SEQIDNO:33	V		
SEQIDNO:34	V		
SEQIDNO:35	V		
SEQIDNO:36	V		
SEQIDNO:37	V		
SEQIDNO:38	V..P		

Фиг. 3А

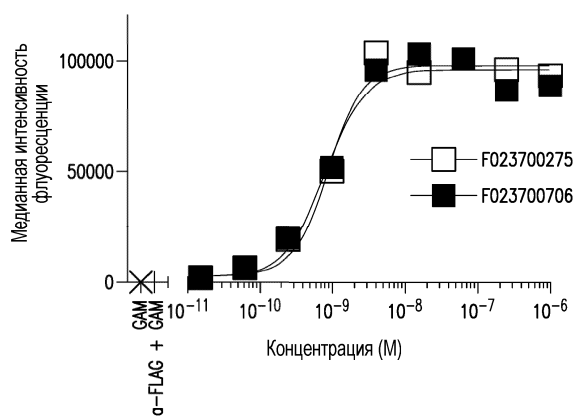
	80	100	120
SEQIDNO:1	ADSVKGRFTI SRDNAKNTVY LQMSLKPED	TAIYYCAGDK HQSWYDYWG	QGTQVTVSS- 119
SEQIDNO:2			..L....- 119
SEQIDNO:9		..T.....	..L....- 119
SEQIDNO:10			..L.K....- 119
SEQIDNO:11			..L.Q....- 119
SEQIDNO:12			..L..K.- 119
SEQIDNO:13			..L..Q.- 119
SEQIDNO:14		..V.....	..L.K....- 119
SEQIDNO:15		..V.....	..L.Q....- 119
SEQIDNO:16		..V.....	..L..K.- 119
SEQIDNO:17		..V.....	..L..Q.- 119
SEQIDNO:18		..V.....	..L....- 119
SEQIDNO:19		..V.....	..L.K....- 119
SEQIDNO:20		..V.....	..L.Q....- 119
SEQIDNO:21		..V.....	..L..K.- 119
SEQIDNO:22		..V.....	..L..Q.- 119
SEQIDNO:23	S.....	R.....	..L....- 119
SEQIDNO:24		..T.....	..L....A 120
SEQIDNO:25			..L.K...A 120
SEQIDNO:26			..L.Q...A 120
SEQIDNO:27			..L..K.A 120
SEQIDNO:28			..L..Q.A 120
SEQIDNO:29		..V.....	..L.K...A 120
SEQIDNO:30		..V.....	..L.Q...A 120
SEQIDNO:31		..V.....	..L..K.A 120
SEQIDNO:32		..V.....	..L..Q.A 120
SEQIDNO:33		..V.....	..L....A 120
SEQIDNO:34		..V.....	..L.K...A 120
SEQIDNO:35		..V.....	..L.Q...A 120
SEQIDNO:36		..V.....	..L..K.A 120
SEQIDNO:37		..V.....	..L..Q.A 120
SEQIDNO:38	S.....	R.....	..L....A 120

Фиг. 3В



Фиг. 4

Связывание моновалентного PD1-нанотела с CHO-K1.hPD-1

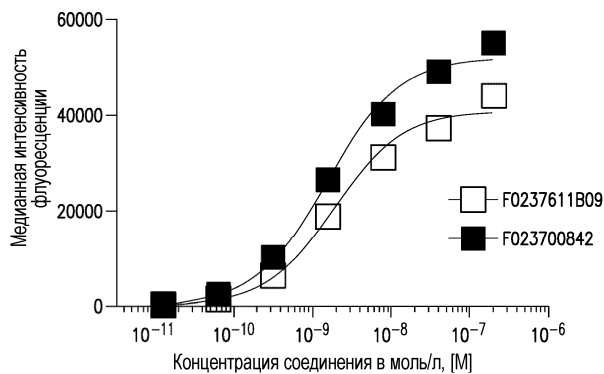


F023700275: 1PD102C12(A14P,A74S,K83R)-FLAG3-HIS6

F023700706: 1PD102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-FLAG3-HIS6

Фиг. 5

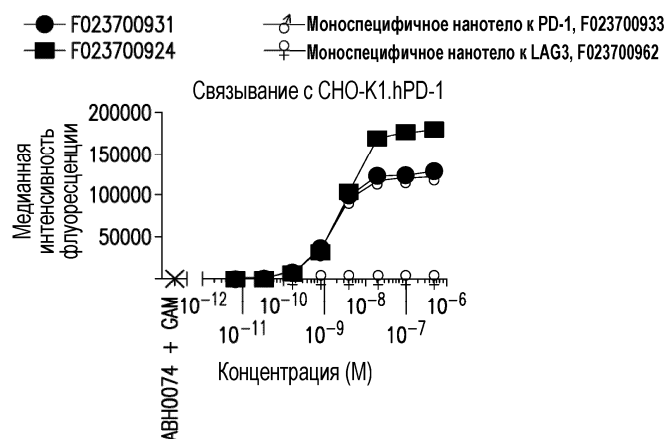
Связывание моновалентного LAG-3-нанотела с 3A9.hLAG-3



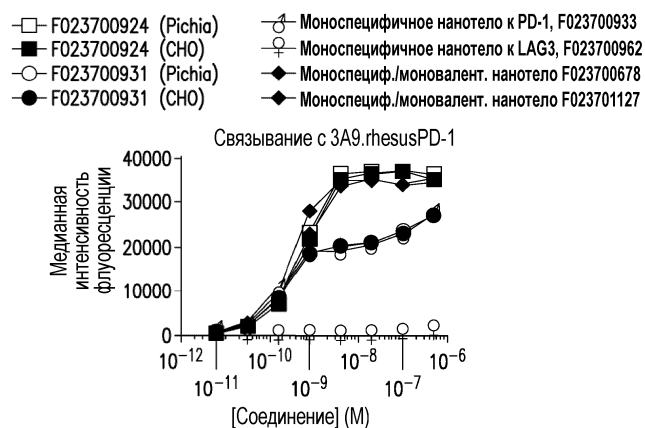
F0237611B09-FLAG3-HIS6

F023700842: F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)-FLAG3-HIS6

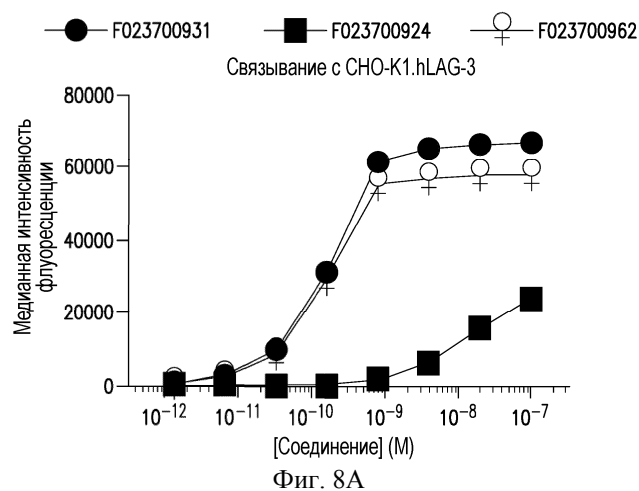
Фиг. 6



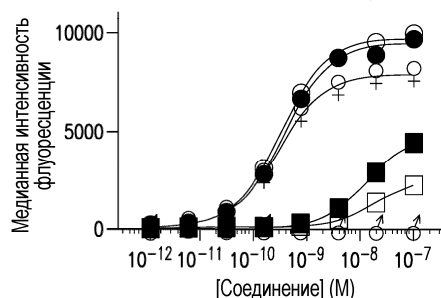
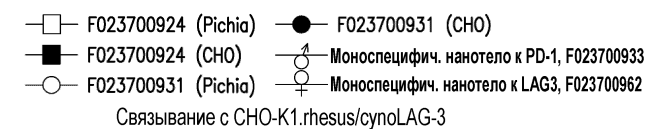
Фиг. 7А



Фиг. 7В

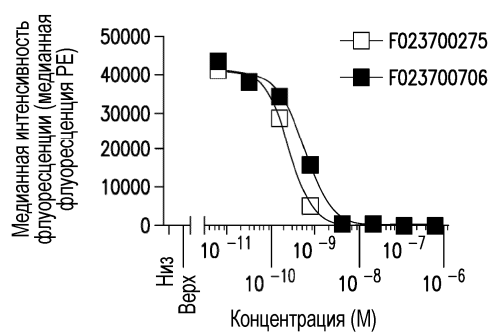


Фиг. 8А



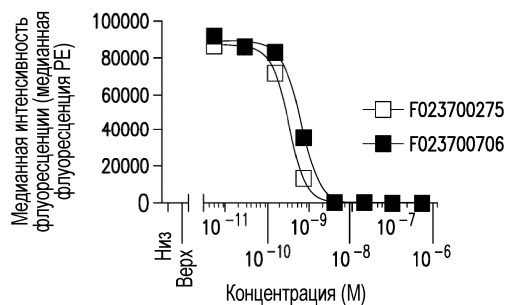
Фиг. 8В

Ингибирование моновалентным PD1-нанотелом связывания hPD-L1-Fc с CHO-K1.hPD-1



Фиг. 9А

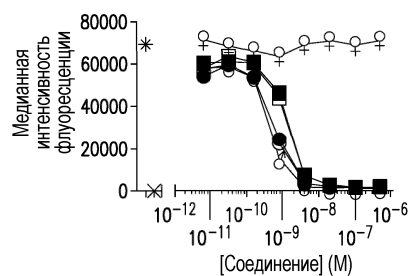
Ингибирование моновалентным PD1-нанотелом связывания hPD-L2-Fc с CHO-K1.hPD-1



Фиг. 9В



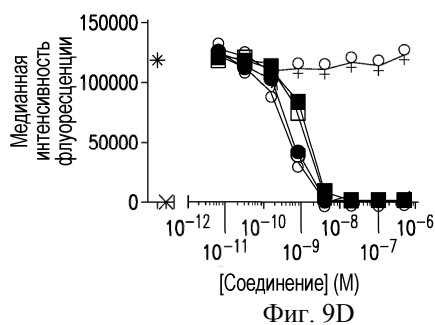
Ингибирование связывания hPD-L1-Fc с CHO-K1.hPD-1



Фиг. 9С

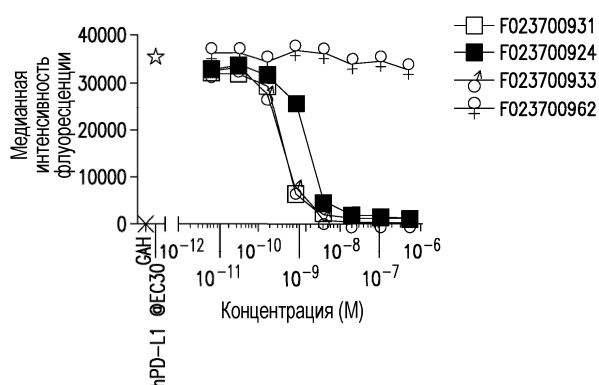
- F023700924 (Pichia) ♂ Моноспецифич. нанотело к PD-1, F023700933
 ■ F023700924 (CHO) ♀ Моноспецифич. нанотело к LAG3, F023700962
 ○ F023700931 (Pichia) ✕ Неокрашенный
 ● F023700931 (CHO) * hPD-L1 @EC30

Ингибирование связывания hPD-L2-Fc с CHO-K1.hPD-1



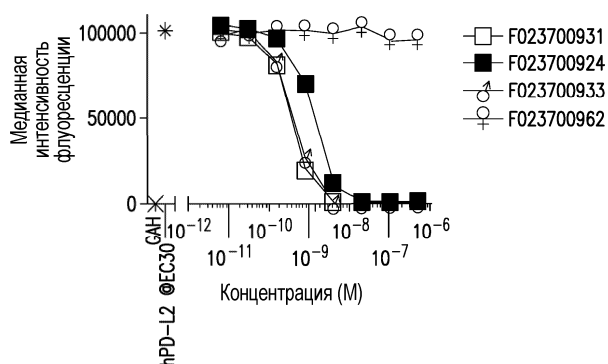
Фиг. 9D

Ингибирование связывания hPD-L1-Fc с CHO-K1.hPD-1



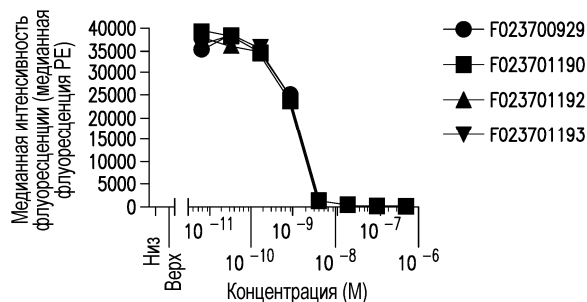
Фиг. 9E

Ингибирование связывания hPD-L2-Fc с CHO-K1.hPD-1



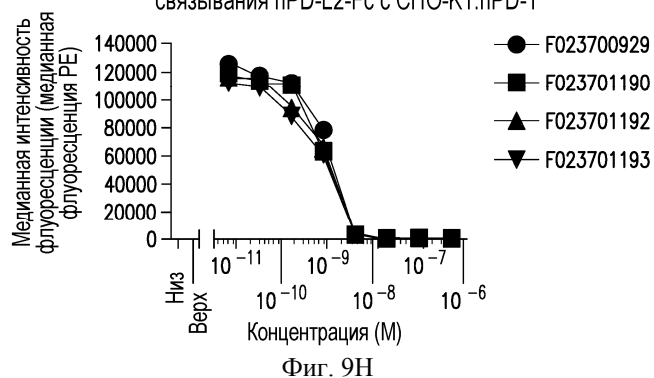
Фиг. 9F

Ингибирование моновалентным PD1-нанотелом связывания hPD-L1-Fc с CHO-K1.hPD-1



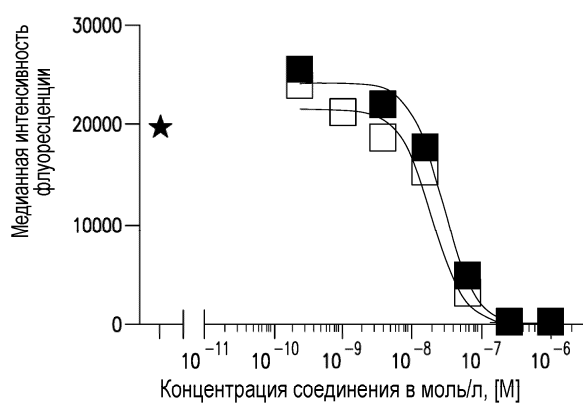
Фиг. 9G

Ингибирование моновалентным PD1-нанотелом
связывания hPD-L2-Fc с CHO-K1.hPD-1



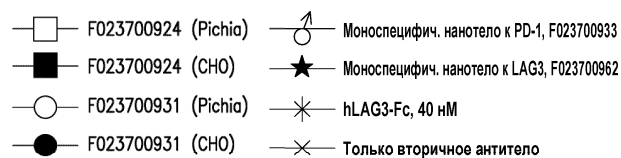
□ F0237611B09
■ F023700842
★ hLAG3-hFc, 40 нМ

Ингибирование связывания hLAG3-hFc с клетками Daudi

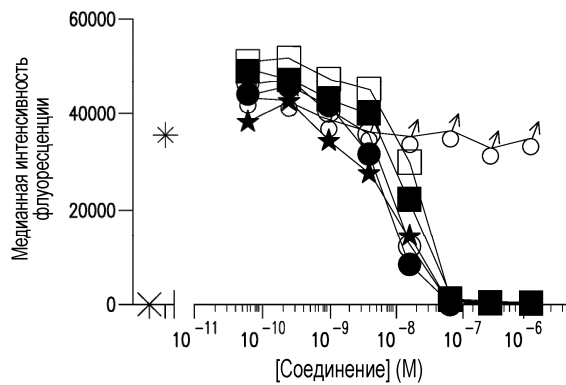


F0237611B09—*FLAG3-HIS6*
F023700842: F0237611B09(L11V,A14P,R41P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L)—*FLAG3-HIS6*

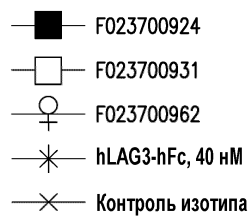
Фиг. 10А



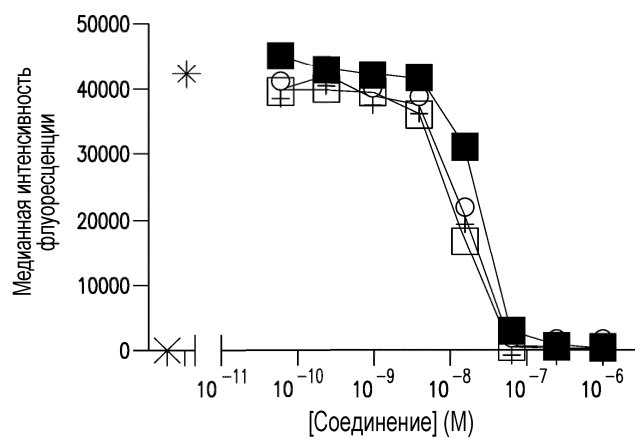
Ингибирование связывания hLAG3-hFc с клетками Daudi



Фиг. 10В

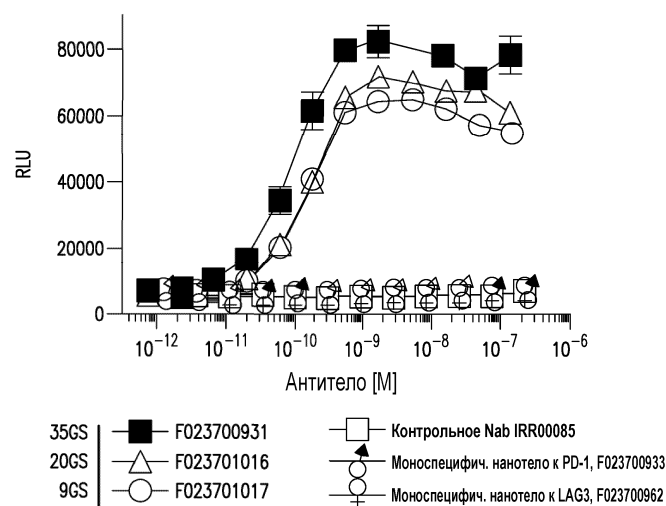


Ингибирование связывания hLAG3-hFc с МНС класса II и клетками Daudi

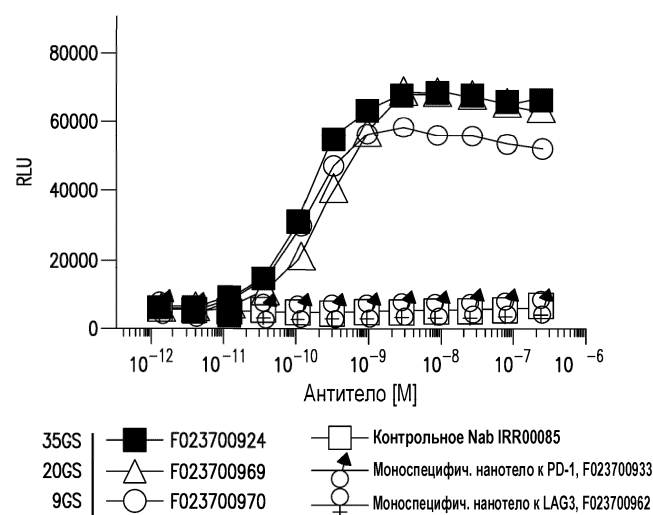


Фиг. 10С

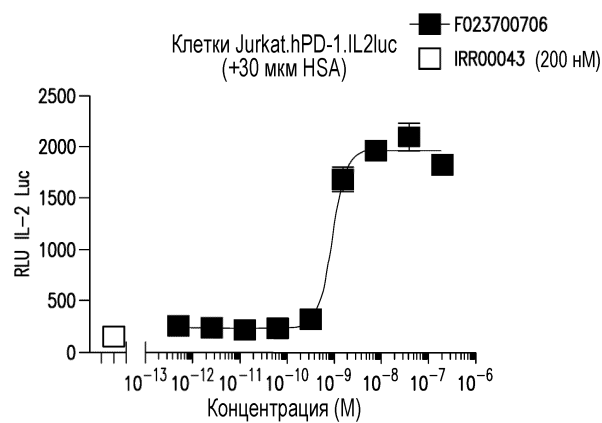
041987



Фиг. 11А

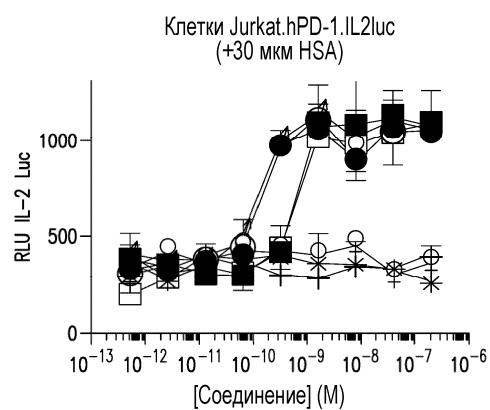


Фиг. 11В

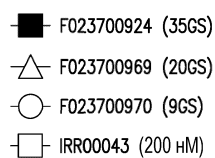


F023700706: 1PD102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-FLAG3-HIS6

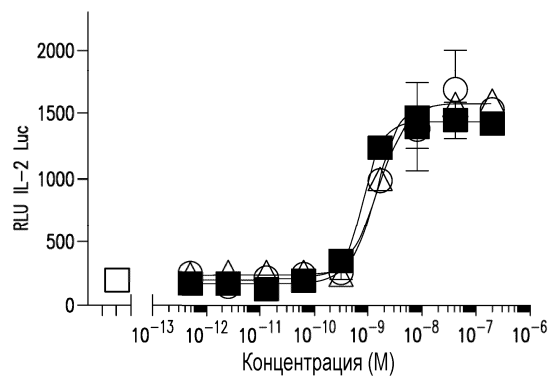
Фиг. 12А



Фиг. 12В



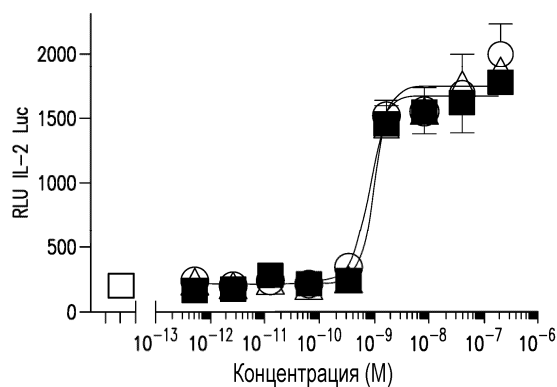
Нанотела к PD1 человека в репортерном анализе
в присутствии 30 мкМ HSA



Фиг. 12С

- F023700931 (35GS)
- △ F023701016 (20GS)
- F023701017 (9GS)
- IRR00043 (200 нМ)

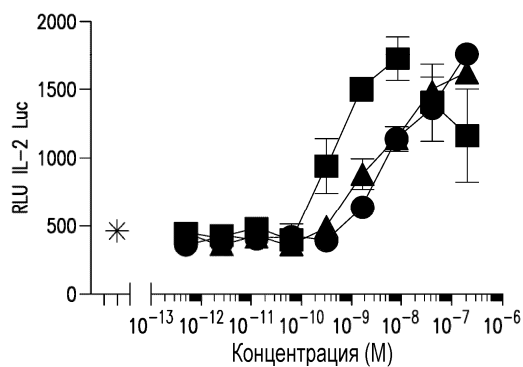
Нанотела к PD1 человека в репортерном анализе
в присутствии 30 мкм HSA



Фиг. 12D

- F023700706
- ▲ F023701192
- F023701193
- * Контрольное нанотело IRR00088 (200 нМ)

Клетки Jurkat.hPD-1.IL2luc (+30 мкм HSA)



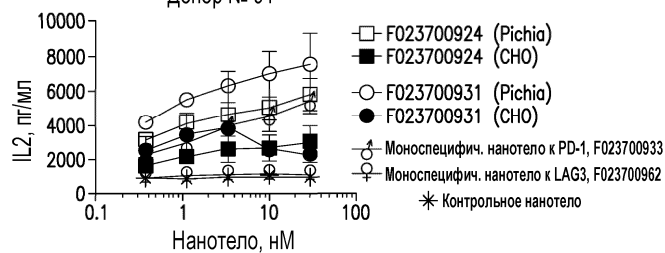
F023700706: 1PD102C12(L11V,A14P,A74S,K83R,I89L)-FLAG3-HIS6

F023701192: 1PD102C12(E1D,L11V,A14P,W52aV,N73Q,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6

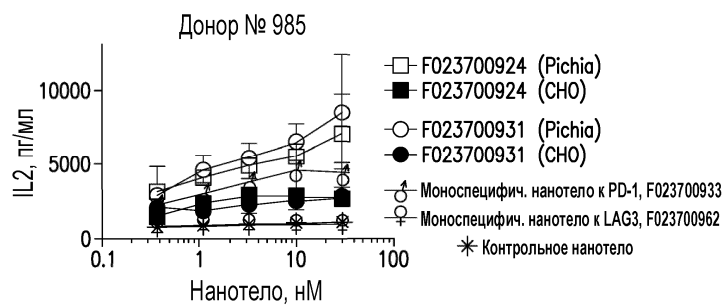
F023701193: 1PD102C12(E1D,L11V,A14P,W52aV,N73P,A74S,K83R,I89L,W100aF)-HIS6

Фиг. 12Е

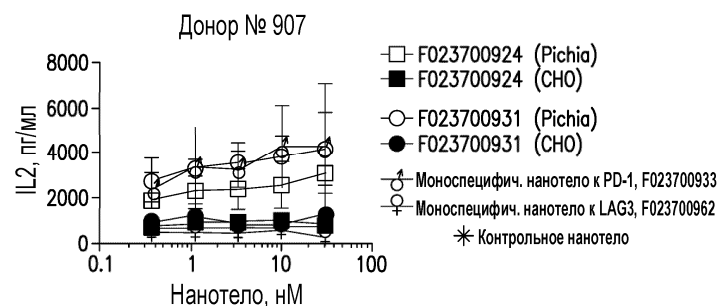
Донор № 91



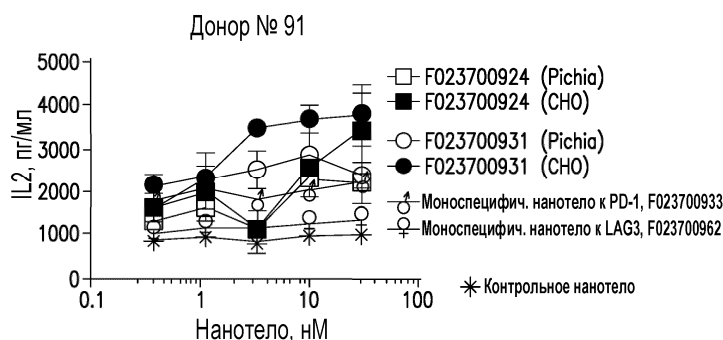
Фиг. 13А



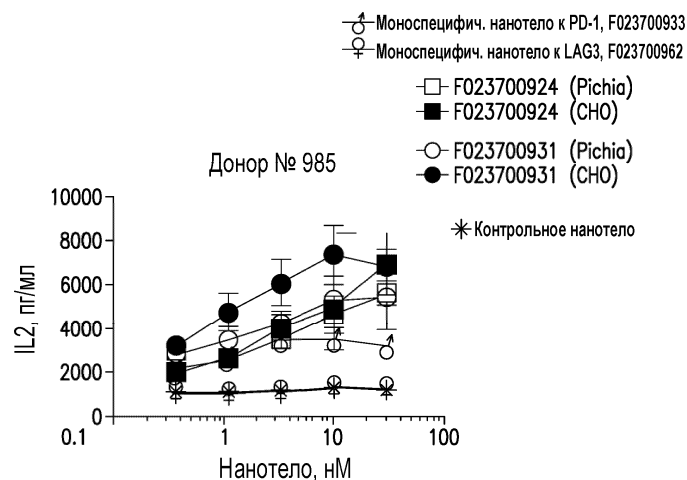
Фиг. 13В



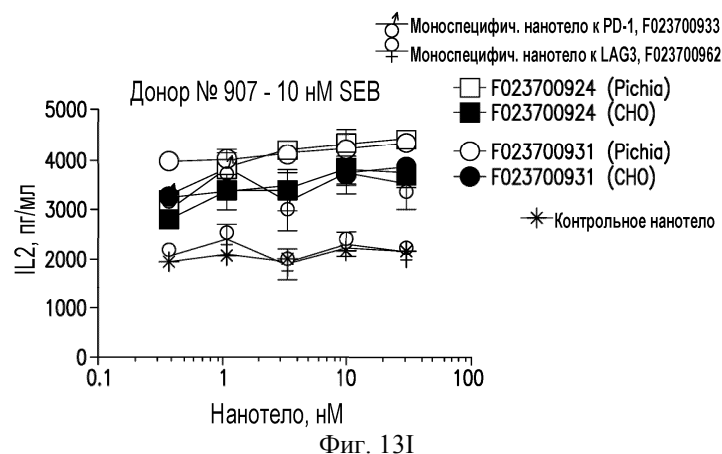
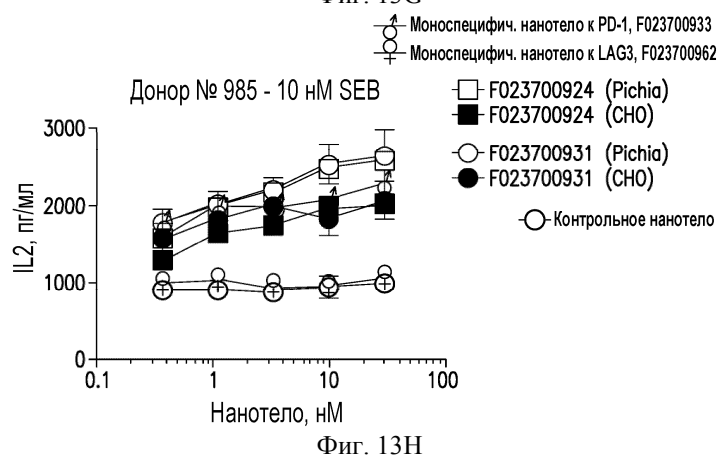
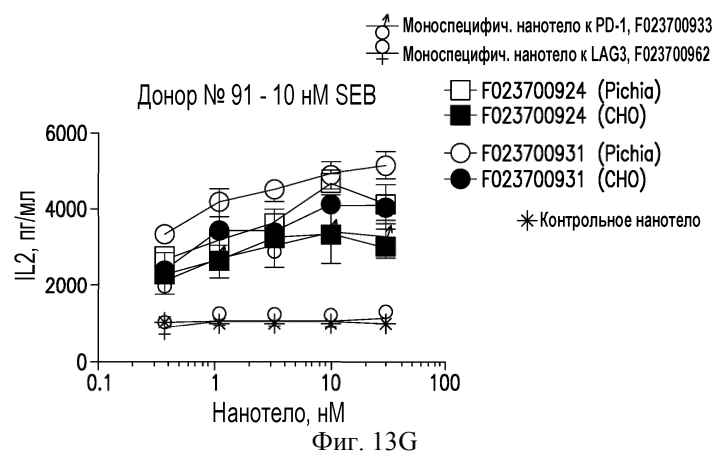
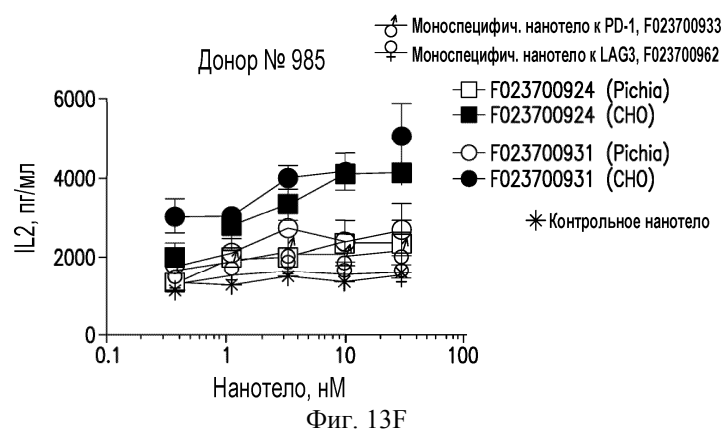
Фиг. 13С

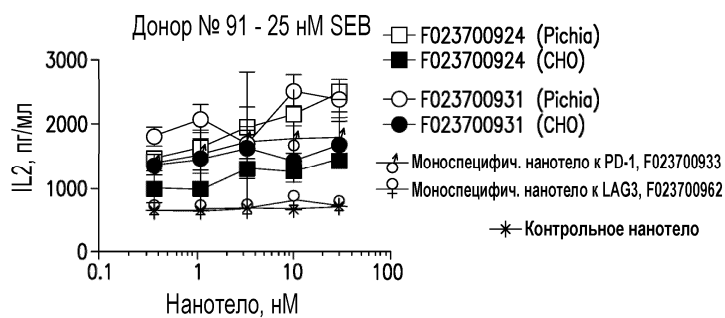


Фиг. 13D

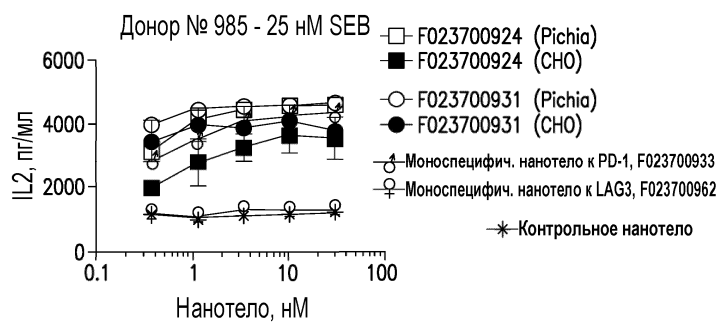


Фиг. 13Е

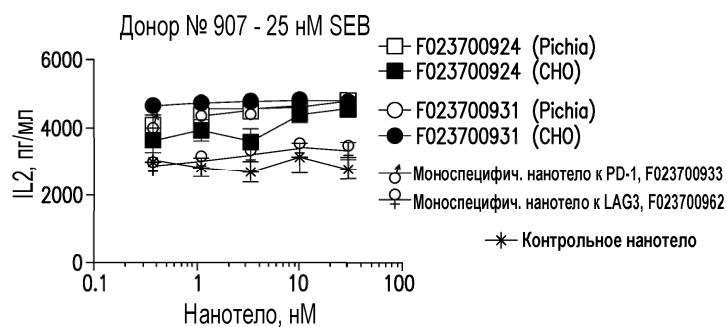




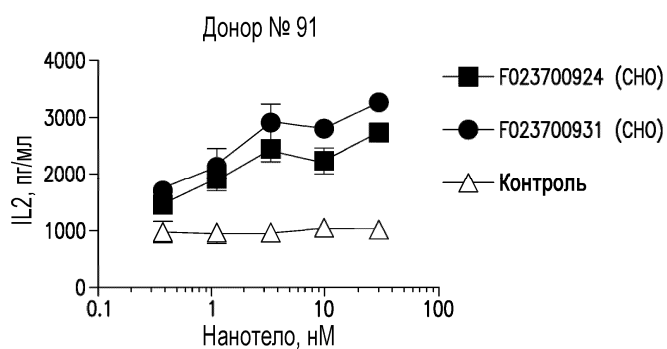
Фиг. 13J



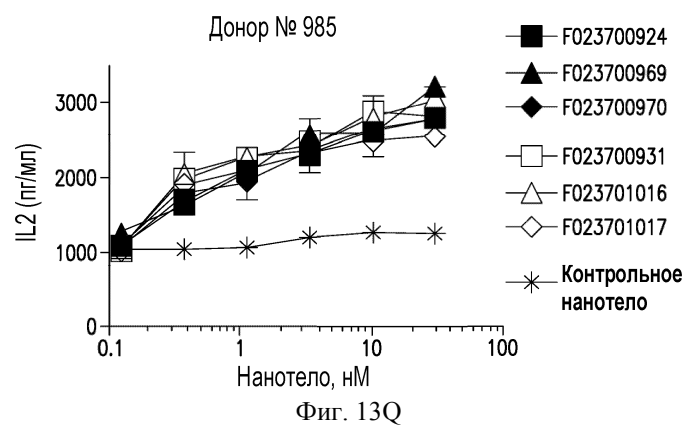
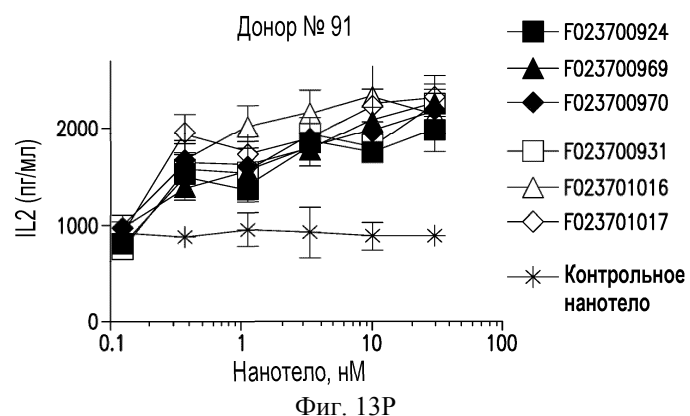
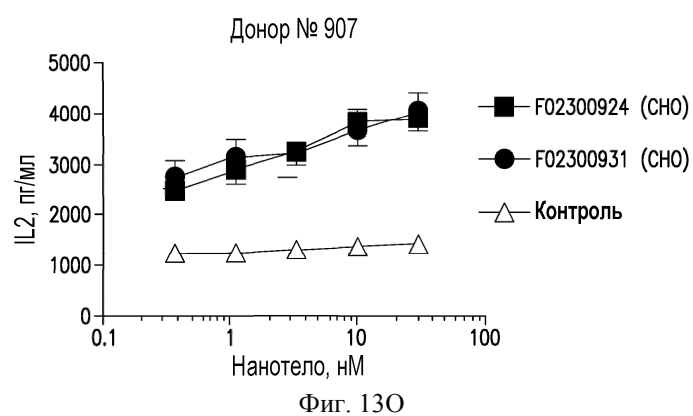
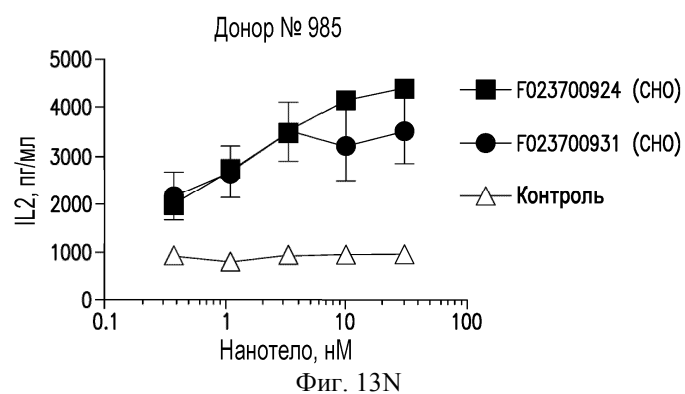
Фиг. 13K

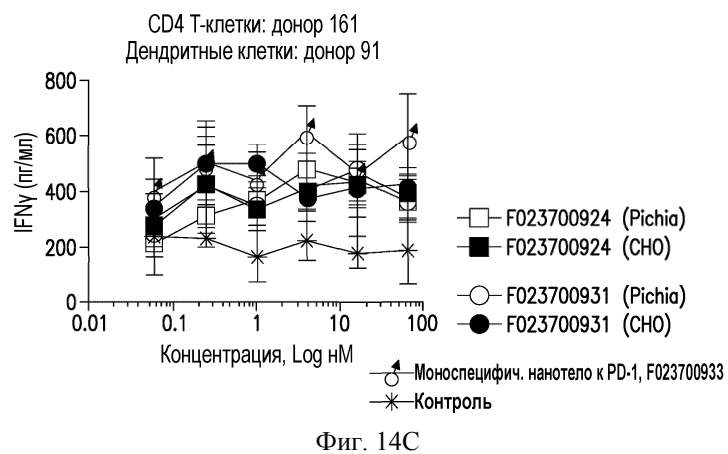
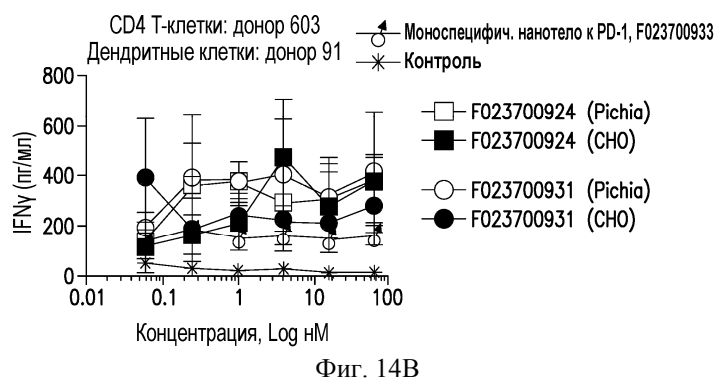
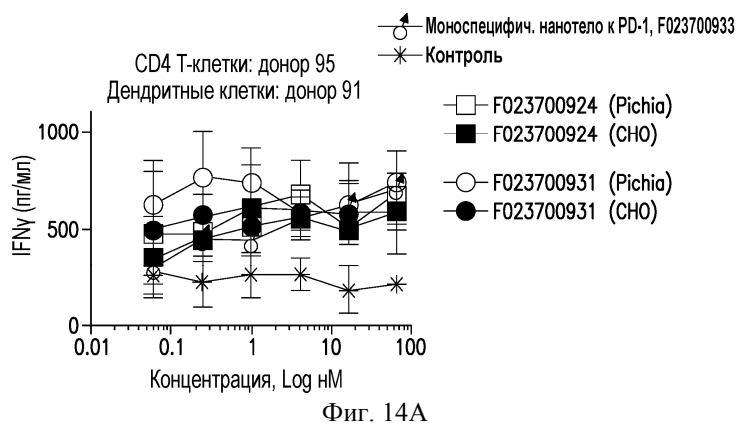
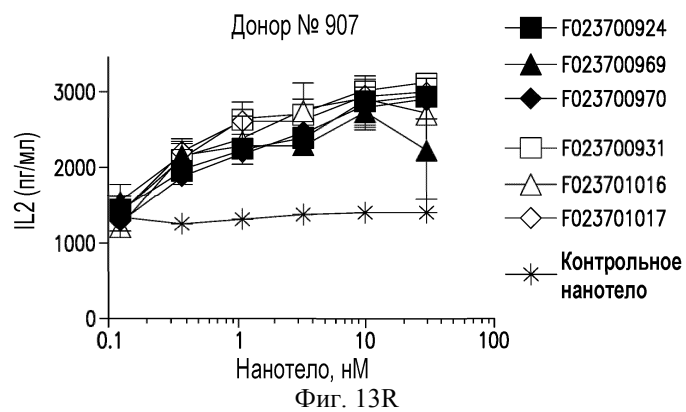


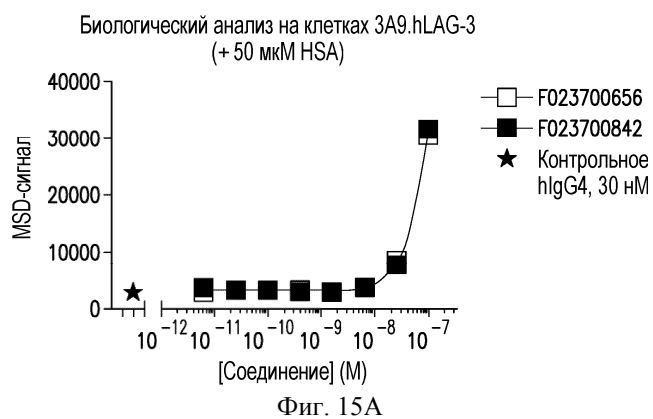
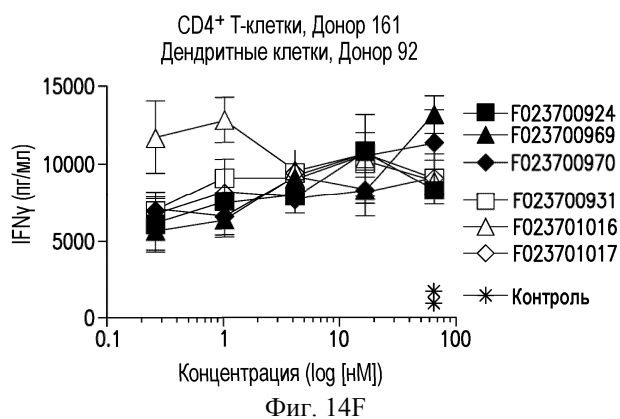
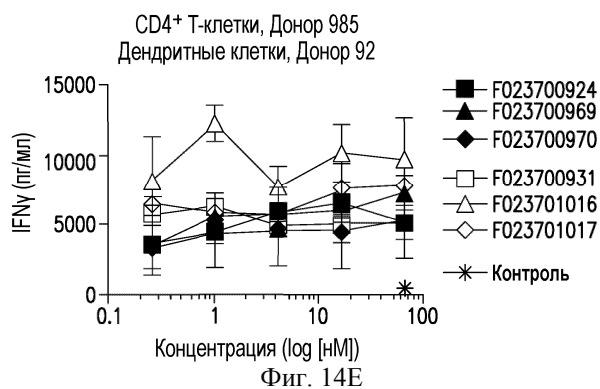
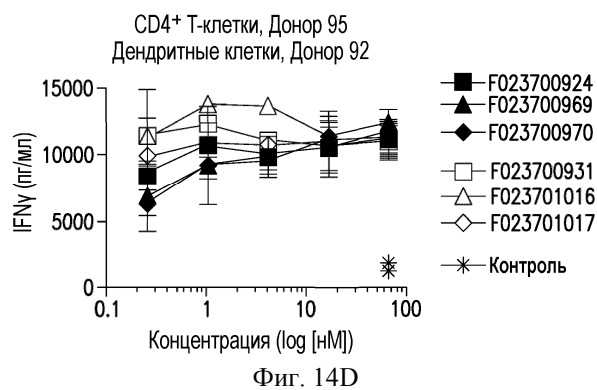
Фиг. 13L



Фиг. 13M

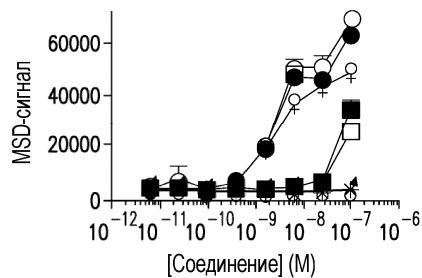






- F023700924 (Pichia) ♂ Моноспецифич. нанотело к PD-1, F023700933
 ■ F023700924 (CHO) ♀ Моноспецифич. нанотело к LAG3, F023700962
 ○ F023700931 (Pichia) * Контрольное нанотело IRR00085
 ● F023700931 (CHO) + Контрольное нанотело IRR00087

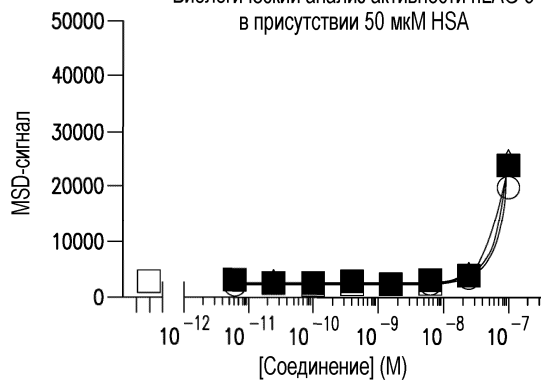
Биологический анализ на клетках 3A9.hLAG-3
(+ 50 мкМ HSA)



Фиг. 15B

- F023700924 (35GS) ○ F023700970 (9GS)
 △ F023700969 (20GS) □ hlgG4, 30 нМ

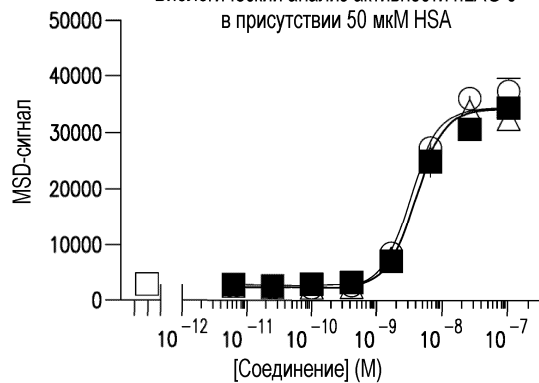
Биологический анализ активности hLAG-3
в присутствии 50 мкМ HSA



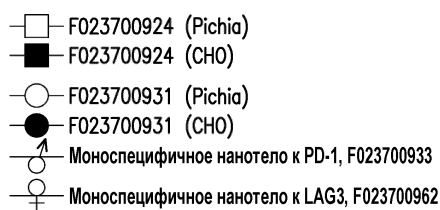
Фиг. 15C

- F023700931 (35GS) ○ F023701017 (9GS)
 △ F023701016 (20GS) □ hlgG4, 30 нМ

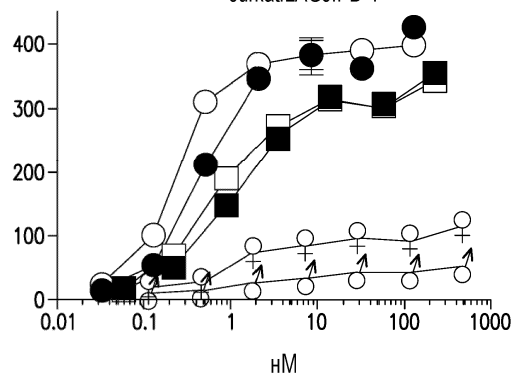
Биологический анализ активности hLAG-3
в присутствии 50 мкМ HSA



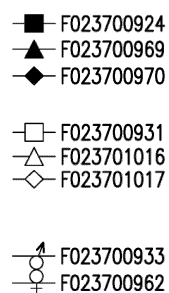
Фиг. 15D



Анализ активности биспецифичных нанотел на клетках Jurkat.LAG3.PD-1

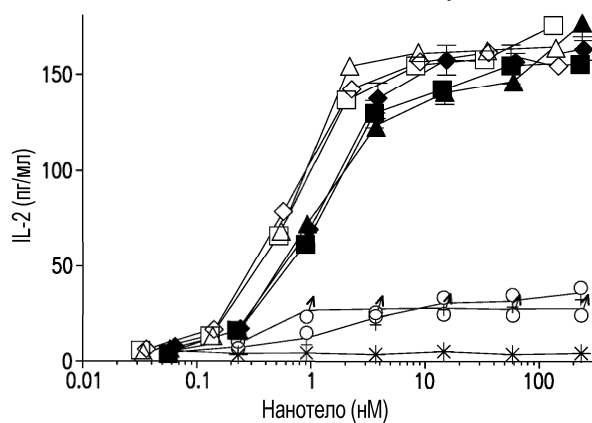


Фиг. 16А

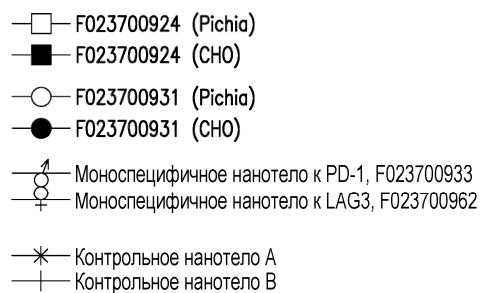


* Контроль

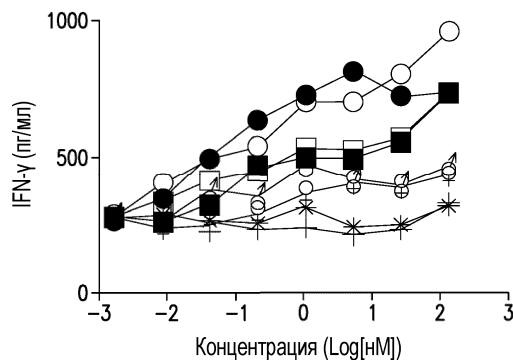
Jurkat.hLAG3.hPD-1 + Raji



Фиг. 16В

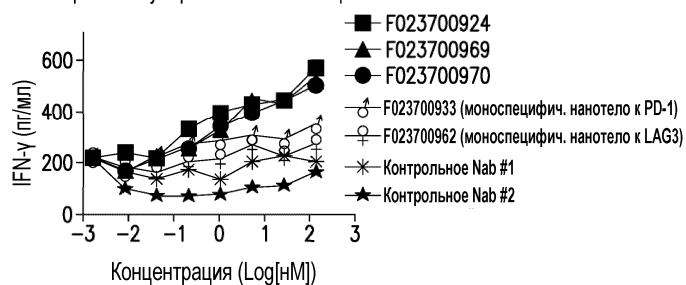


Клон 4-49 CD4+ Т-клеток
Повторно стимулированные с помощью JY.PD-L1



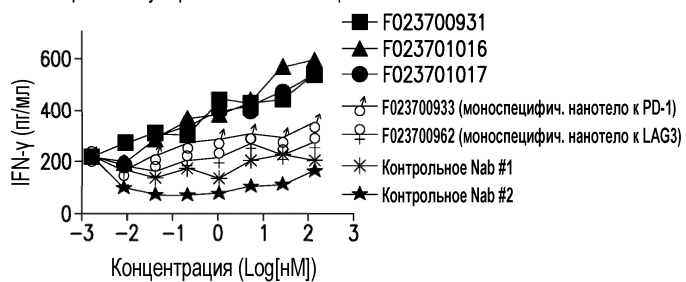
Фиг. 17А

Клон 4-49 CD4+ Т-клеток
Повторно стимулированные с помощью JY.PD-L1



Фиг. 17В

Клон 4-49 CD4+ Т-клеток
Повторно стимулированные с помощью JY.PD-L1



Фиг. 17С

	Реагент	Описание	Мишень	Последовательность
Родительское 611B09	F0237611B09	F0237611B09-FLAG3-HIS6 (SEQ ID NO: 128)	hLAG-3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQARGNERFVAAISESGGR THYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCATLLWWTSEYAPIKAND YDYWGQGTLLVTSSAAADYKDHGDYKDHDIDYKDDDDKGAHHHHHHH
611B09 с E1D	F023700656	F0237611B09(E1D)-HIS6 (SEQ ID NO: 129)	hLAG-3	DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQARGNERFVAAISESGGR THYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCATLLWWTSEYAPIKAND YDYWGQGTLLVTSSAAHHHHHHH
SO 611B09, мономер	F023700842	F0237611B09(L11V,A14P,R4 1P,N43K,A62S,A74S,K83R, V89L)-FLAG3-HIS6 (SEQ ID NO: 130)	hLAG-3	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREVAAISESGGR THYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATLLWWTSEYAPIKAND YDYWGQGTLLVTSSAAADYKDHGDYKDHDIDYKDDDDKGAHHHHHHH
Моно- валентное SO 611B09 + ALB201	F023701128	F0237611B09(E1D,L11V,A14 P,R41P,N43K,A62S,A74S,K8 3R,V89L)-35GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 96)	hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREVAAISESGGR THYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATLLWWTSEYAPIKAND YDYWGQGTLLVTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESG GGVQPGNSLRSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLLVTSSA

Фиг. 18А

Бивалентное SO 611B09 + ALB201	F023700962	F0237611B09(E1D,L11V,A14 P,R41P,N43K,A62S,A74S,K8 3R,V89L)-35GS- F0237611B09(L11V,A14P,R4 1P,N43K,A62S,A74S,K83R, V89L)-35GS-ALB11002-A (SEQ ID NO: 97)	hLAG-3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREVAAISESGGR THYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATLLWWTSEYAPIKAND YDYWGQGTLLVTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESG GGVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREVAAISESGGRTHYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATLLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGT LLVTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVQPGN SLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLLVTSSA
Частичное SO 1PD102C	F023700275	1PD102C12(A14P,A74S,K83 R)-FLAG3-HIS6 (SEQ ID NO: 131)	hPD-1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLL VTSSAAADYKDHGDYKDHDIDYKDDDDKGAHHHHHHH
SO 1PD102C 12, мономер	F023700706	1PD102C12(L11V,A14P,A74 S,K83R,I89L)-FLAG3-HIS6 (SEQ ID NO: 132)	hPD-1	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLL VTSSAAADYKDHGDYKDHDIDYKDDDDKGAHHHHHHH

Фиг. 18В

SO 1PD102C 12, мономер	F023700929	1PD102C12(L11V,A14P,A74 S,K83R,I89L)-HIS6 (SEQ ID NO: 133)	hPD-1	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLL VTSSHHHHHHH
Моно- валентное SO 1PD102C 12 + ALB201	F023701127	1PD102C12(E1D,L11V,A14P, A74S,K83R,I89L)-35GS- ALB11002-A (SEQ ID NO: 101)	hPD-1	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLL VTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVQPGNS LRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDN AKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLLVTSSA
Бивалентное SO 1PD102C 12 + ALB201	F023700933	1PD102C12(E1D,L11V,A14P, A74S,K83R,I89L)-35GS- 1PD102C12(L11V,A14P,A74 S,K83R,I89L)-35GS- ALB11002-A (SEQ ID NO: 102)	hPD-1	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLL VTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVQPGGS LRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLLVTSSGGGGSGGGSGGG GGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVQPGNSLRLSCAASGFTFSFGM SWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDT ALYYCTIGGSLSRSSQGTLLVTSSA

Фиг. 18С

Улучшенный SO 1PD102C 12, мономер	F023701190	1PD102C12(E1D,L11V,A14P, W52aV,A74S,K83R,I89L,W10 QaF)–HIS6 (SEQ ID NO: 134)	hPD–1	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGT LVTSSAAAHHHHHH
Улучшенный SO 1PD102C 12, мономер	F023701192	1PD102C12(E1D,L11V,A14P, W52aV,N73Q,A74S,K83R,I89 L,W10QaF)–HIS6 (SEQ ID NO: 135)	hPD–1	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGT LVTSSAAAHHHHHH
Улучшенный SO 1PD102C 12, мономер	F023701193	1PD102C12(E1D,L11V,A14P, W52aV,N73P,A74S,K83R,I89 L,W10QaF)–HIS6 (SEQ ID NO: 136)	hPD–1	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGT LVTSSAAAHHHHHH

Фиг. 18D

Пентамер №1	F023700899	1PD102C12(A14P,A74S,K83 R)–35GS– 1PD102C12(A14P,A74S,K83 R)–35GS–F023611B09– 35GS–F0237611B09–35GS– ALB11 (SEQ ID NO: 106)	hPD– 1/hLAG3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGT LVTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTSSGGGGSGGGSGG GGGGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSDYVM GWFRQARGNEREFVAAISESGRTHYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDT AVYYCATTLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSDYVMGWFRQARG NEREFVAAISESGRTHYADAVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCATT LLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG SGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQ GTLVTVSS
-------------	------------	--	-----------------	--

Фиг. 18E

Пентамер	F023700931	1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R, I89L)–35GS–1PD102C12 (L11V,A14P,A74S,K83R,I89L) –35GS–F0237600B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62 S,A74S,K83R,V89L)–35GS– F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62 S,A74S,K83R,V89L)–35GS– ALB11002–A (SEQ ID NO: 107)	hPD– 1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGT LVTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYWGQGTLVTSSGGGGSGGGSGG GGGGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRFTSDYVM GWFRQAPGKEREFVAAISESGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDT ALYYCATTLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRFTSDYVMGWFRQAPG KEREFVAAISESGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATT LLWWTSEYAPIKANDYDYWGQGTLVTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG SGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQ GTLVTVSSA
----------	------------	--	------------------	---

Фиг. 18F

Пентамер с 20GS	F023701016	102C12(E1D,L11V,A14P,A74 S,K83R,I89L)–20GS– 102C12(L11V,A14P,A74S,K8 3R,I89L)–20GS– F0237611B09(L11V,A14P,R4 1P,N43K,A62S,A74S,K83R, 89L)–20GS– F0237611B09(L11V,A14P,R4 1P,N43K,A62S,A74S,K83R,V89L –20GS–ALB11002–A (SEQ ID NO: 108)	hPD– 1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPKGEREFVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYGQGT LVTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIH AMGWFRAQPKGEREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPE DTALYYCAGDKHQSSWYDYGQGT LVTSSGGGGSGGGSGGGSEVQLVES GGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRAQPKGEREFVAAISESGRTHYADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATLLWWTSEYAPIKANDYDYGQGT TLVTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFS DYVMGWFRAQPKGEREFVAAISESGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR PEDTALYYCATLLWWTSEYAPIKANDYDYGQGT LVTSSGGGGSGGGSGGGSG GGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPKGLEWVSSI SGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTSSA
--------------------	------------	--	------------------	---

Фиг. 18G

Пентамер с 9GS	F023701017	102C12(E1D,L11V,A14P,A74 S,K83R,I89L)–9GS– 102C12(L11V,A14P,A74S,K8 3R,I89L)–9GS– F0237611B09(L11V,A14P,R4 1P,N43K,A62S,A74S,K83R, V89L)–9GS– F0237611B09(L11V,A14P,R4 1P,N43K,A62S,A74S,K83R, 89L)–9GS–ALB11002–A (SEQ ID NO: 109)	hPD– 1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPKGEREFVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYGQGT LVTSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPK EREFVAVITWSGGITYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDK HQSSWYDYGQGT LVTSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTF SDYVMGWFRAQPKGEREFVAAISESGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RPEDTALYYCATLLWWTSEYAPIKANDYDYGQGT LVTSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRAQPKGEREFVAAISESGRTHYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATLLWWTSEYAPIKANDYDYGQ GT LVTSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQA PKGLEWVSSI SGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCT IGGSLSRSSQGT LVTSSA
Тример	F023700924	1PD102C12 (E1D,L11V,A14P,A74S,K83R, I89L)–35GS–F0237611B09 (L11V,A14P,R41P,N43K,A62 S,A74S,K83R,V89L)–35GS– ALB11002–A (SEQ ID NO: 110)	hPD– 1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPKGEREFVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYGQGT LVTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDY VMGWFRAQPKGEREFVAAISESGRTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATLLWWTSEYAPIKANDYDYGQGT LVTSSGGG GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAAS GFTFSFGMSWVRQAPKGLEWVSSI SGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTSSA

Фиг. 18H

Тример с 20GS	F023700969	102C12(E1D,L11V,A14P,A74 S,K83R,I89L)–20GS– F0237611B09(L11V,A14P,R4 1P,N43K,A62S,A74S,K83R,V 89L)–20GS–ALB11002–A (SEQ ID NO: 111)	hPD– 1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPKGEREFVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYGQGT LVTSSGGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDY VMGWFRAQPKGEREFVAAISESGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPE DTALYYCATLLWWTSEYAPIKANDYDYGQGT LVTSSGGGGSGGGSGGGSGGG GSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPKGLEWVSSI SGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVT VSSA
Тример с 9GS	F023700970	102C12(E1D,L11V,A14P,A74 S,K83R,I89L)–9GS– F0237611B09(L11V,A14P,R4 1P,N43K,A62S,A74S,K83R,V 89L)–9GS–ALB11002–A (SEQ ID NO: 112)	hPD– 1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPKGEREFVAVITWSGGI TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSWYDYGQGT LVTSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRAQPK EREFVAAISESGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATLL LWWTSEYAPIKANDYDYGQGT LVTSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRL SCAASGFTFSFGMSWVRQAPKGLEWVSSI SGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LVTSSA

Фиг. 18I

Пентамер/ 35GS	F023701163	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)–35GS– 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)–35GS– F023700842–35GS– F023700842–35GS– ALB11002–A (SEQ ID NO: 113)	hPD– 1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPKKEREFAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDPKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPKKEREFAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDP SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYGQGT LTVSSGGGGSGGGSGG GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVM GMFRAQPKKEREFAVITVSGGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDT ALYYCATTLWWTSEYAPIKANDYDYGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGMFRAQPK KEREFAVITVSGGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT LLWWTSEYAPIKANDYDYGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG SGGGSEVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQ GTLTVSSA
-------------------	------------	---	------------------	--

Фиг. 18J

Пентамер /9GS	F023701168	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)–9GS– 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)–9GS– F023700842–9GS– F023700842–9GS–ALB11002–A (SEQ ID NO: 114)	hPD– 1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPKKEREFAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDPKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPK EREFAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDPKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDK HQSSFYDYGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTF SDYVMGMFRAQPKKEREFAVITVSGGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RPEDTALYYCATTLWWTSEYAPIKANDYDYGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGMFRAQPKKEREFAVITVSGGRTHYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLWWTSEYAPIKANDYDYGQ GTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQA PGKLEWVSSIISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCT IGGSLRSSQGT LTVSSA
Тример/ 35GS	F023701173	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)–35GS– F023700842–35GS– ALB11002–A (SEQ ID NO: 115)	hPD– 1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPKKEREFAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDPKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGRTFSDYVMGMFRAQPKKEREFAVITVSGGRTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTLWWTSEYAPIKANDYDYGQGT LTVSSGGG GSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAAS GFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSIISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGT LTVSSA

Фиг. 18K

Тример /9GS	F023701178	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73P, A74S, K83R, I89L, W100aF)–9GS– F023700842–9GS–ALB11002–A (SEQ ID NO: 116)	hPD– 1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPKKEREFAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDPKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGMFRAQPK EREFAVITVSGGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATTL LWWTSEYAPIKANDYDYGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGSLRL SCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSIISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGT LTVSSA
Пентамер /35GS	F023701161	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)–35GS– 1PD102C12 (L11V, A14P, W52aV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)–35GS– F023700842–35GS– F023700842–35GS– ALB11002–A (SEQ ID NO: 117)	hPD– 1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPKKEREFAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDPKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS LRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPKKEREFAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDP SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYGQGT LTVSSGGGGSGGGSGG GGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVM GMFRAQPKKEREFAVITVSGGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDT ALYYCATTLWWTSEYAPIKANDYDYGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGRTFSDYVMGMFRAQPK KEREFAVITVSGGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT LLWWTSEYAPIKANDYDYGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG SGGGSEVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQ GTLTVSSA

Фиг. 18L

Пентамер /9GS	F023701166	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52dV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)–9GS– 1PD102C12 (L11V, A14P, W52dV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)–9GS– F023700842–9GS– F023700842–9GS–ALB11002–A (SEQ ID NO: 118)	hPD– 1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRQSKNTVYVQLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGL VTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGK EREFAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRQSKNTVYVQLQMNSLRPEDTALYYCAGDK HQSSFYDYWGQGLVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTF SDYVMGWFRQAPGKEREFAVAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RPEDTALYYCATLLWMTSEYAPIKANDYDYGQGLVTVSSGGGGGGGGSEVQLVE SGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFAVAISESGGRTHYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATLLWMTSEYAPIKANDYDYGQ GTLVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSFGMSWVRQA PGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCT IGGSLSRSSQGLTVTVSSA
Триммер /35GS	F023701171	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52dV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)–35GS– F023700842–35GS– ALB11002–A (SEQ ID NO: 119)	hPD– 1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRQSKNTVYVQLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGL VTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGK LRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGKEREFAVAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATLLWMTSEYAPIKANDYDYGQGLVTVSSGGG GSGGG GFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSA

Фиг. 18М

Триммер /9GS	F023701176	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52dV, N73Q, A74S, K83R, I89L, W100aF)–9GS– F023700842–9GS–ALB11002–A (SEQ ID NO: 120)	hPD– 1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRQSKNTVYVQLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGL VTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRQAPGK EREFAVAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCATL LWMTSEYAPIKANDYDYGQGLVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRL SCAASGFTFSFGMSWVRQAPGKLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGLTVTVSSA
Пентамер /35GS	F023701162	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52dV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)–35GS– 1PD102C12 (L11V, A14P, W52dV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100aF)–35GS– F023700842–35GS– F023700842–35GS– ALB11002–A (SEQ ID NO: 121)	hPD– 1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRQSKNTVYVQLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGL VTVSSGG LRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDS SKNTVYVQLQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGLVTVSSGGGGGGGGGGGG GG GWFRQAPGKEREFAVAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDT ALYYCATLLWMTSEYAPIKANDYDYGQGLVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GG KEREFAVAISESGGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAT LLWMTSEYAPIKANDYDYGQGLVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GSGGG ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQ GLTVTVSSA

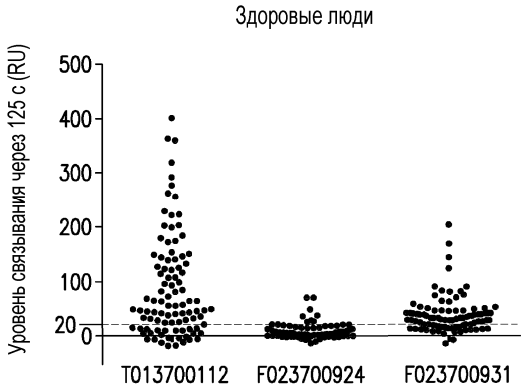
Фиг. 18N

Пентамер /9GS	F023701167	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52dV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100dF)–9GS–1PD102C12 (L11V, A14P, W52dV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100dF)–9GS–F023700842–9GS–F023700842–9GS–ALB11002–A (SEQ ID NO: 122)	hPD–1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPKKEREFAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDSKNTVYLVQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPK KEREFAVITVSGGITYYADSVKGRFTISRDSKNTVYLVQMNSLRPEDTALYYCAGDK HQSSFYDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTF SDYVMGWFRAQPKKEREFAVASESGGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLVQMNSL RPEDTALYYCATLLWMTSEYAPIKANDYDYWGQGTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRAQPKKEREFAVASESGGRTHYADS VKGRFTISRDNKNTLYLVQMNSLRPEDTALYYCATLLWMTSEYAPIKANDYDYWGQ GTLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTSSFGMSWVRQA PGKLEWVSSI SGGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLVQMNSLRPEDTALYYCT IGGSLSRSSQGT LTVSSA
Тример /35GS	F023701172	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52dV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100dF)–35GS–F023700842–35GS–ALB11002–A (SEQ ID NO: 123)	hPD–1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPKKEREFAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDSKNTVYLVQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRAQPK KEREFAVASESGGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLVQMNSLRPEDTALYYCATLL WMTSEYAPIKANDYDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAAS GFTSSFGMSWVRQA PGKLEWVSSI SGGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLVQ MNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LTVSSA

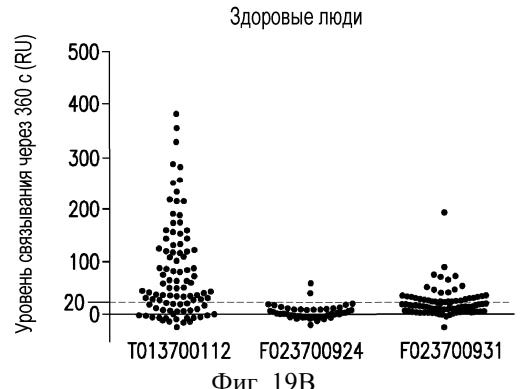
Фиг. 18O

Пентамер /9GS	F023701177	1PD102C12 (E1D, L11V, A14P, W52dV, N73S, A74S, K83R, I89L, W100dF)–9GS–F023700842–9GS–ALB1102–A (SEQ ID NO: 123)	hPD–1/hLAG–3	DVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRAQPKKEREFAVITVSGGI TYYADSVKGRFTISRDSKNTVYLVQMNSLRPEDTALYYCAGDKHQSSFYDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYVMGWFRAQPK KEREFAVASESGGRTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLVQMNSLRPEDTALYYCATLL WMTSEYAPIKANDYDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAAS GFTSSFGMSWVRQA PGKLEWVSSI SGGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLVQ MNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGT LTVSSA
---------------	------------	--	--------------	--

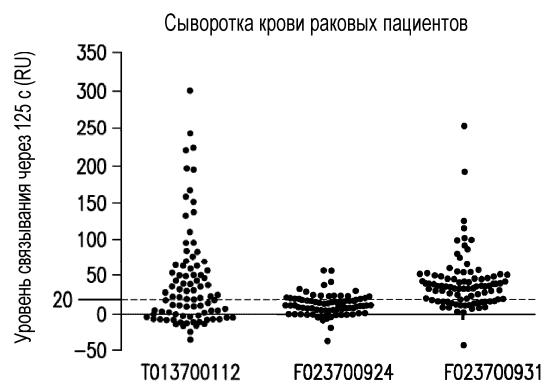
Фиг. 18P



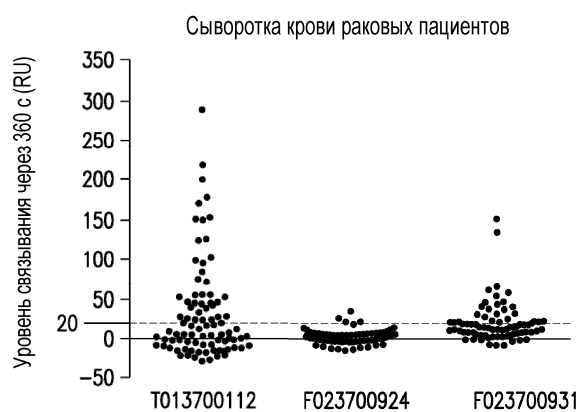
Фиг. 19A



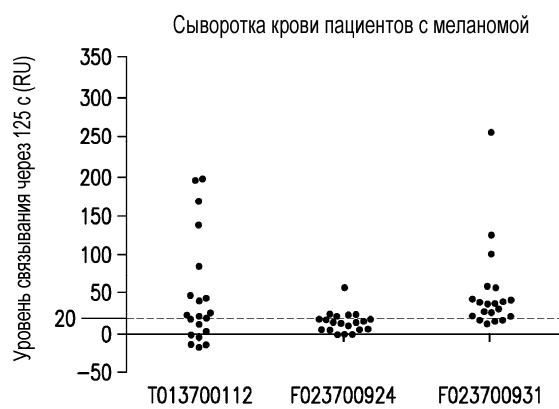
Фиг. 19B



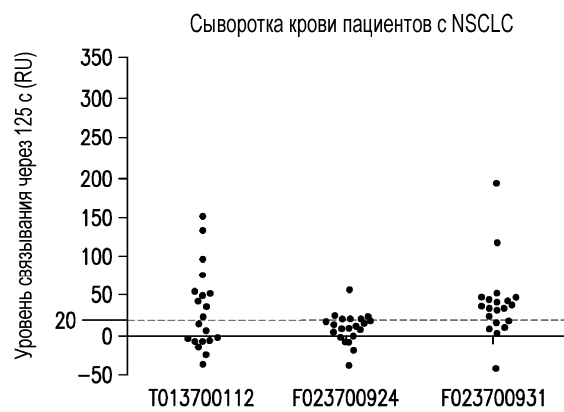
Фиг. 19С



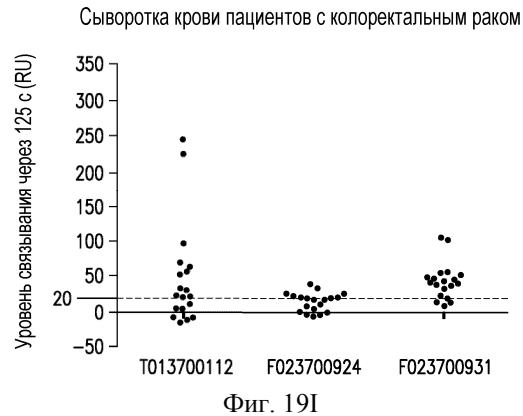
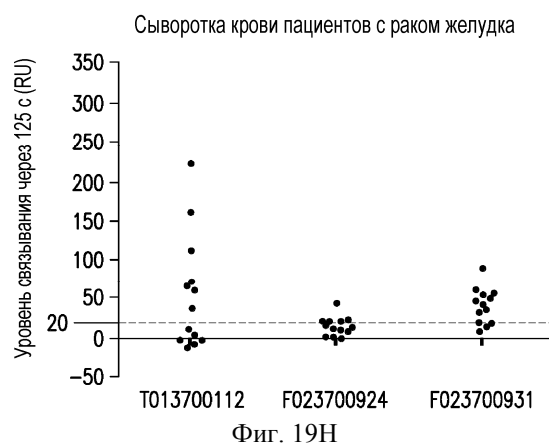
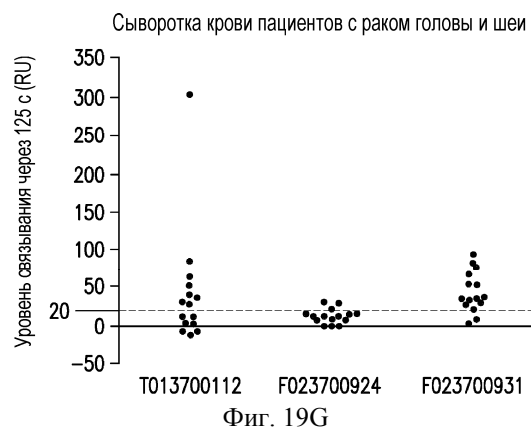
Фиг. 19D



Фиг. 19Е



Фиг. 19F



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2