

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291567 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.11(22) Дата подачи заявки
2020.12.18

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(54) ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) 62/952,878; 62/952,859; 63/019,857;
63/021,556; 63/031,453; 63/123,581(32) 2019.12.23; 2019.12.23; 2020.05.04;
2020.05.07; 2020.05.28; 2020.12.10

(33) US

(86) PCT/US2020/065873

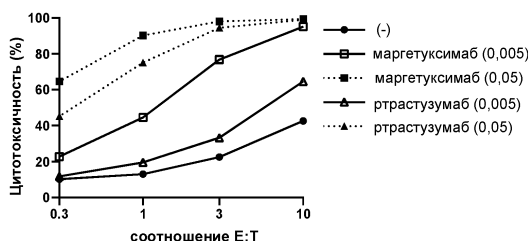
(87) WO 2021/133653 2021.07.01

(71) Заявитель:
МАКРОДЖЕНИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Самроу Брэдли Джеймс, Ла Мотте-
Мос Росс, Уиггинтон Джон Марк,
Бонвини Эцио, Мур Пол А., Кёниг
Скотт, Чжан Сяоюй (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к режимам введения одной или более молекул на основе антитела, которые связывают PD-1 или PD-L1 и LAG-3 (например, биспецифическую молекулу PD-1 × LAG-3) отдельно или в комбинации с молекулой на основе антитела, которая связывает опухолевый антиген (ТА) для лечения рака. Настоящее изобретение, в частности, относится к применению таких режимов в сочетании с биспецифическими молекулами PD-1 × LAG-3. Изобретение относится к применению таких молекул и применению фармацевтических композиций и фармацевтических наборов, которые содержат такие молекулы и которые способствуют применению таких режимов дозирования для лечения рака.



A1

202291567

202291567

A1

НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ:

ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании заявок на патент США под номерами 63/123581 (подана 10 декабря 2020 года; находится на стадии рассмотрения), 63/031453 (подана 28 мая 2020 года; находится на стадии рассмотрения), 63/021556 (подана 7 мая 2020 года; находится на стадии рассмотрения), 63/019857 (подана 4 мая 2020 года; находится на стадии рассмотрения), 62/952878 (подана 23 декабря 2019 года; находится на стадии рассмотрения) и 62/952859 (подана 23 декабря 2019 года; находится на стадии рассмотрения), содержание каждой из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит один или более перечней последовательностей, соответствующих положениям 37 C.F.R. 1.821 и след., представленных на машиночитаемых носителях (название файла: 1301_0166PCT_ST25.txt, файл создан 18 декабря 2020 года и имеет размер 70,042 байта), причем содержание указанного файла полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к режимам введения одной или более молекул на основе антитела, которые связывают PD-1 или PD-L1 и LAG-3 (*например*, биспецифическую молекулу PD-1 x LAG-3) отдельно или в комбинации с молекулой на основе антитела, которая связывает опухолевый антиген (ТА) для лечения рака. Настоящее изобретение, в частности, относится к применению таких режимов в сочетании с биспецифическими молекулами PD-1 x LAG-3. Изобретение относится к применению таких молекул и применению фармацевтических композиций и фармацевтических наборов, которые содержат такие молекулы и которые способствуют применению таких режимов дозирования для лечения рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

I. Иммунные ответы, опосредованные клетками

[0004] Способность Т-клеток оптимально опосредовать иммунный ответ против антигена требует двух отдельных сигнальных взаимодействий (Viglietta, V. *et al.* (2007) “*Modulating Co-Stimulation,*” *Neurotherapeutics* 4:666-675; Korman, A.J. *et al.* (2007) “*Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,*” *Adv. Immunol.* 90:297-339). Во-первых, антиген, который был экспонирован на поверхности антиген-презентирующей клетки (АПК), должен быть презентован антиген-специфичной наивной CD4⁺ Т-клетке. Такая презентация доставляет сигнал через Т-клеточный рецептор (TCR), который направляет Т-клетку для инициации иммунного ответа, который является специфичным к презентованному антигену. Во-вторых, ряд стимулирующих и ингибирующих сигналов, опосредованных через взаимодействия между АПК и отдельными поверхностными молекулами Т-клеток, запускает сначала активацию и пролиферацию Т-клеток и, в конечном итоге, их ингибирование. Таким образом, первый сигнал придает специфичность иммунному ответу, тогда как второй сигнал служит для определения природы, величины и продолжительности ответа. Иммунный ответ жестко контролируется костимулирующими и коингибирующими лигандами и рецепторами, часто называемыми «иммунными контрольными точками» (Chen *et al.*, (2013) “*Molecular Mechanisms of T Cell Co-Stimulation And Co-Inhibition,*” *Nature Rev. Immunol.* 13:227-242; Pardoll, D.M., (2012) “*The Blockade Of Immune Checkpoints In Cancer Immunotherapy,*” *Nat. Rev. Cancer* 12(4):252-264). Такие молекулы обеспечивают второй сигнал для активации Т-клеток и обеспечивают сбалансированную сеть положительных и отрицательных сигналов, которые регулируют иммунные ответы для обеспечения защиты от инфекции и рака. Однако некоторые раковые клетки способны избегать иммунной системы, вызывая состояние истощения Т-клеток, при котором Т-клетки подвергаются воздействию стойких антигенных и/или воспалительных сигналов (Wherry E.J. (2010) “*T Cell Exhaustion,*” *Nat. Immunol.* 12(6):492-499). Две молекулы иммунной контрольной точки, участвующие в истощении Т-клеток, белок программируемой смерти клеток 1 типа («PD-1») и ген активации лимфоцитов 3 («LAG-3») (Wherry, J.E. (2015) “*Molecular And Cellular Insights Into T Cell Exhaustion,*” *Nat. Rev. Immunol.* 15(8): 486-499), более подробно описаны ниже.

II. Белок программируемой смерти клеток 1 типа («PD-1»)

[0005] Белок программируемой смерти клеток 1 типа («PD-1», также известный как «CD279») представляет собой белок иммунной контрольной точки, который экспрессируется на поверхности активированных Т-клеток, В-клеток и моноцитов. Он представляет собой мембранный белок типа I с молекулярной массой приблизительно 31 кДа, принадлежащий к расширенному семейству регуляторов Т-клеток CD28/CTLA-4, который в широком смысле отрицательно регулирует иммунные ответы (Ishida, Y. *et al.* (1992) “*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death,*” EMBO J. 11: 3887-3895; патентные публикации США № 2007/0202100; 2008/0311117; и 2009/00110667; патенты США № 6808710; 7101550; 7488802; 7635757; и 7722868; публикация PCT № WO 01/14557). PD-1 опосредует ингибирование иммунной системы путем связывания с лигандами трансмембранного белка: лигандом белка программируемой смерти клеток типа 1 («PD-L1», также известным как «B7-H1») и лигандом белка программируемой смерти клеток типа 2 («PD-L2», также известным как «B7-DC») (Flies, D.B. *et al.* (2007) “*The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,*” J. Immunother. 30(3):251-260; патенты США № 6803192 и 7794710; патентные публикации США № 2005/0059051; 2009/0055944; и 2009/0274666; 2009/0313687; публикации PCT № WO 01/39722 и WO 02/086083). При нормальных условиях белок иммунной контрольной точки служит действующей мишенью для ингибирования чрезмерной активации Т-клеток и, таким образом, его действие предотвращает аутоиммунное повреждение. Однако, когда его лиганд экспрессируется опухолевыми клетками, связывание предотвращает приближение клеток иммунной системы к опухоли и, таким образом, ослабляет способность иммунной системы распознавать и уничтожать опухолевые клетки (Tan, S. *et al.* (2020) “*Cancer Immunotherapy: Pros, Cons And Beyond,*” Biomed. Pharmacother. 124:109821:1-11). Соответственно, сверхэкспрессия PD-L1 на опухолевых клетках часто связана с неблагоприятным прогнозом.

[0006] Роль взаимодействий лиганда PD-1 в ингибировании активации и пролиферации Т-клеток позволила предположить, что указанные биомолекулы могут служить в качестве терапевтических мишеней для лечения воспаления и рака. Таким образом, было предложено применение антител к PD-1 и его лиганду, в частности, PD-L1, для лечения инфекций и опухолей и положительной модуляции адаптивного

иммунного ответа (см, Chocarro de Erauso, L. (2020) “*Resistance to PD-L1/PD-1 Blockade Immunotherapy. A Tumor-Intrinsic or Tumor-Extrinsic Phenomenon?*,” *Front. Pharmacol.* 11:441:1-13; Jiang, Y. *et al.* (2020) “*Progress and Challenges in Precise Treatment of Tumors With PD-1/PD-L1 Blockade*,” *Front. Immunol.* 11:339:1-7; Han, Y. *et al.* (2020) “*PD-1/PD-L1 Pathway: Current Research In Cancer*,” *Am. J. Cancer Res.* 10(3):727-742, патентные публикации США No. 2010/0040614; 2010/0028330; 2004/0241745; 2008/0311117; и 2009/0217401; патенты США No. 7521051; 7563869; и 7595048; публикации PCT No. WO 2004/056875 и WO 2008/083174). Ранее были описаны антитела, способные специфично связываться с PD-1 и PD-L1 (см., например, Agata, T. *et al.* (1996) “*Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes*,” *Int. Immunol.* 8(5):765-772; и Berger, R. *et al.* (2008) “*Phase I Safety And Pharmacokinetic Study Of CT-011, A Humanized Antibody Interacting With PD-1, In Patients With Advanced Hematologic Malignancies*,” *Clin. Cancer Res.* 14(10):3044-3051; патенты США No. 8008449 и 8552154; патентные публикации США No. 2007/0166281; 2012/0114648; 2012/0114649; 2013/0017199; 2013/0230514 и 2014/0044738; и публикации PCT No. WO 2003/099196; WO 2004/004771; WO 2004/056875; WO 2004/072286; WO 2006/121168; WO 2007/005874; WO 2008/083174; WO 2009/014708; WO 2009/073533; WO 2012/135408, WO 2012/145549; и WO 2013/014668).

III. Ген активации лимфоцитов 3 («LAG-3»)

[0007] Ген активации лимфоцитов 3 («LAG-3», также известный как «CD223») представляет собой рецепторный белок клеточной поверхности, который экспрессируется активированными CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками и НК-клетками, и конститутивно экспрессируется плазмцитоидными дендритными клетками; LAG-3 не экспрессируется В-клетками, моноцитами или любыми другими исследуемыми типами клеток (Workman, C.J. *et al.* (2009) “*LAG-3 Regulates Plasmacytoid Dendritic Cell Homostasis*,” *J. Immunol.* 182(4): 1885-1891).

[0008] Исследования показали, что LAG-3 играет важную роль в отрицательном регулировании пролиферации, функционирования и гомеостаза Т-клеток, а также в истощении Т-клеток (Workman, C.J. *et al.* (2002) “*Cutting Edge: Molecular Analysis Of The Negative Regulatory Function Of Lymphocyte Activation Gene-3*,” *J. Immunol.* 169:5392-5395; Workman, C.J. *et al.* (2003) “*The CD4-Related Molecule, LAG-3 (CD223) Regulates*

The Expansion Of Activated T-Cells,” Eur. J. Immunol. 33:970-979; Workman, C.J. (2005) “*Negative Regulation Of T-Cell Homeostasis By Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223),*” J. Immunol. 174:688-695; Hannier, S. *et al.* (1998) “*CD3/TCR Complex-Associated Lymphocyte Activation Gene-3 Molecules Inhibit CD3/TCR Signaling,*” J. Immunol. 161:4058-4065, Blackburn, S.D., *et al.* (2009) “*Coregulation of CD8⁺ T Cell Exhaustion By Multiple Inhibitory Receptors During Chronic Viral Infection*” Nature Immunol. 10: 29-37).

[0009] Исследования позволяют предположить, что ингибирование функции LAG-3 посредством блокады антител может обратить опосредованное LAG-3 ингибирование иммунной системы и частично восстановить эффекторную функцию (Grosso, J.F. *et al.* (2009) “*Functionally Distinct LAG-3 and PD-1 Subsets on Activated and Chronically Stimulated CD8 T-Cells,*” J. Immunol. 182(11):6659-6669; Grosso, J.F. *et al.* (2007) “*LAG-3 Regulates CD8⁺ T-Cell Accumulation And Effector Function During Self And Tumor Tolerance,*” J. Clin. Invest. 117:3383-3392). Ранее были описаны антитела, способные специфично связываться с LAG-3 (см., *например*, публикации РСТ № WO 2014/140180, WO 2015/138920, WO 2015/116539, WO 2016/028672, WO 2016/126858, WO 2016/200782 и WO 2017/015560).

IV. Биспецифические молекулы

[0010] Возможность получения биспецифических молекул (*например*, биспецифических антител, биспецифических диател и т.д.) обеспечивает значительное преимущество по сравнению с моноспецифическими природными антителами: возможность объединения и совместной локализации клеток, которые экспрессируют различные эпитопы. Таким образом, биспецифические молекулы имеют широкое применение, включая терапевтическое применение. Биспецифичность обеспечивает значительную гибкость в разработке и конструировании для различных применений, обеспечивая повышенную avidность к мультимерным антигенам, перекрестное связывание различных антигенов и прямое нацеливание на конкретные типы клеток на основании присутствия обоих целевых антигенов. PD-1 x LAG-3 биспецифические молекулы для применения в лечении рака и/или заболевания, связанного с патогеном, описаны в публикациях РСТ № WO 2015/200119, WO 2017/025498, WO 2018/083087, WO 2018/185043, WO 2018/134279 и WO 2018/217940. В частности, PD-1 x LAG-3

биспецифические диатела, имеющие новые PD-1- и LAG-3-связывающие домены и типичную активность, описаны в WO 2017/019846.

V. Опухолевые антигены

[0011] Опухолевые антигены («ТА») содержат белки клеточной мембраны, которые присутствуют только на опухолевых клетках, но не на каких-либо других клетках (*т. е.*, опухолеспецифичные антигены) или характерно присутствуют на опухолевых клетках, но также присутствуют на некоторых здоровых клетках (*т. е.*, **опухолеассоциированные антигены**). Опухолевые антигены могут быть нацелены на антитела и могут применяться для стимуляции клеток иммунной системы для преодоления ускользания опухоли, и играть новую роль в наблюдении и устранении опухоли (Tan, S. *et al.* (2020) “*Cancer Immunotherapy: Pros, Cons And Beyond*,” Biomed. Pharmacother. 124:109821:1-11; Finn, O.J. (2017) “*Human Tumor Antigens Yesterday, Today, and Tomorrow*,” Cancer Immunol. Res. 5(5):347-354; Barros, L. *et al.* (2018) “*Immunological-Based Approaches For Cancer Therapy*,” Clinics 73(suppl 1):e429s:1-11; Smith, C.C. *et al.* (2019) “*Alternative Tumour-Specific Antigens*,” Nat. Rev. Cancer 19(8):465-478; Ehx, G. *et al.* (2019) “*Discovery And Characterization Of Actionable Tumor Antigens*,” Genome Med. 11:29:1-3).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0012] В настоящей заявке предложены схемы, способные более активно направлять иммунную систему организма против раковых клеток. Поскольку, хотя адаптивная иммунная система может являться эффективным механизмом защиты против рака и заболевания, его действию часто препятствуют механизмы иммунной супрессии/эвазии в микроокружении опухоли, опосредованные взаимодействиями PD-1/PD-L1 или ингибирующей активностью LAG-3. Как предложено в настоящей заявке, такие механизмы иммунной супрессии/эвазии могут быть преодолены путем введения PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы. Как дополнительно предложено в настоящей заявке, двойное ингибирование контрольных точек путей контрольных точек PD/PD-L1 и LAG-3 может синергизировать с противоопухолевой активностью ТА-связывающей молекулы (в частности, молекулы, обладающей повышенной активностью ADCC).

[0013] Настоящее изобретение относится к схемам введения одной или более молекул на основе антитела, которые связывают PD-1 или PD-L1 и LAG-3 (*например*, PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы) отдельно или в комбинации с молекулой на основе антитела, которая связывает опухолевый антиген (ТА), для лечения рака. Настоящее изобретение, в частности, относится к применению таких режимов в сочетании с биспецифическими молекулами PD-1 x LAG-3. Настоящее изобретение относится к применению таких молекул и к применению фармацевтических композиций и фармацевтических наборов, содержащих такие молекулы, которые облегчают применение таких схем дозирования для лечения рака.

[0014] Настоящее изобретение, в частности, относится к способам лечения рака, включающим введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы субъекту, нуждающемуся в этом, причем указанный способ включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы указанному субъекту в фиксированной дозе от приблизительно 120 мг до приблизительно 800 мг.

[0015] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации такого способа, где рак характеризуется экспрессией опухолевого антигена (ТА), и где указанный способ дополнительно включает введение субъекту молекулы, связывающей опухолевый антиген (ТА) (ТА-связывающей молекулы).

[0016] Настоящее изобретение дополнительно относится к способам лечения рака у субъекта, где указанный рак характеризуется экспрессией ТА, причем указанный способ включает введение указанному субъекту ТА-связывающей молекулы и:

- (a) PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы; или
- (b) молекулы, которая иммуноспецифично связывает PD-1 (PD-1-связывающая молекула) в комбинации с молекулой, которая иммуноспецифично связывает LAG-3 (LAG-3-связывающая молекула); или
- (c) биспецифической молекулы, которая иммуноспецифично связывает как PD-L1, так и LAG-3 (PD-L1 x LAG-3 биспецифической молекулы); или
- (d) молекулы, которая иммуноспецифично связывает PD-L1 (PD-L1-связывающей молекулы) в комбинации с LAG-3-связывающей молекулой.

[0017] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где ТА-связывающая молекула содержит ADCC-усиленный Fc-домен.

[0018] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где:

- (a) каждая молекула представлена в отдельной композиции; или
- (b) каждая молекула представлена в одной и той же композиции; или
- (c) PD-1-связывающая молекула и LAG-3-связывающая молекула представлены в одной и той же композиции, и ТА-связывающая молекула представлена в отдельной композиции; или
- (d) PD-L1-связывающая молекула и LAG-3-связывающая молекула представлены в одной и той же композиции, и ТА-связывающая молекула представлена в отдельной композиции. Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где ТА-связывающая молекула представляет собой антитело.

[0019] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где PD-1-связывающая молекула представляет собой антитело, PD-L1-связывающая молекула представляет собой антитело, и LAG-3-связывающая молекула представляет собой антитело.

[0020] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где указанный способ включает введение ТА-связывающей молекулы и PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы.

[0021] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где ADCC-усиленный Fc-домен содержит:

- (A) сконструированную гликоформу; и/или
- (B) аминокислотную замену относительно Fc-области дикого типа.

[0022] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где ADCC-усиленный Fc-домен содержит:

- (A) сконструированную гликоформу, которая представляет собой сложную N-гликозид-связанную сахарную цепь, которая не содержит фукозы, и/или которая содержит биссекторный O-GlcNAc; и/или
- (B) содержит аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из:
 - (a) одной замены, выбранной из группы, состоящей из:
F243L, R292P, Y300L, V305I, I332E и P396L;
 - (b) двух замен, выбранных из группы, состоящей из:
 - (1) F243L и P396L;
 - (2) F243L и R292P;
 - (3) R292P и V305I; и
 - (4) S239D и I332E;
 - (c) трех замен, выбранных из группы, состоящей из:
 - (1) F243L, R292P и Y300L;
 - (2) F243L, R292P и V305I;
 - (3) F243L, R292P и P396L; и
 - (4) R292P, V305I и P396L;
 - (d) четырех замен, выбранных из группы, состоящей из:
 - (1) F243L, R292P, Y300L и P396L; и
 - (2) F243L, R292P, V305I и P396L; или
 - (e) пяти замен, выбранных из группы, состоящей из:
 - (1) F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L; и
 - (2) L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L,

где нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.

[0023] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где ADCC-усиленный Fc-домен содержит аминокислотные замены: L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L, где нумерация соответствует индексу EU по системе Kabat.

[0024] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где:

- (A) ТА выбирают из **Таблицы 6А** или **Таблицы 6В**, и/или
- (B) ТА-связывающая молекула содержит домены VL и VH антитела, выбранного из **таблицы 7**.

[0025] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где:

- (A) PD-1-связывающая молекула представляет собой антитело, которое содержит:
 - (a) домен VL PD-1, который содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:35**, и домен VH PD-1, который содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:39**;
 - (b) домен VH и VL анти-PD-1 антитела, выбранного из **Таблицы 1**; или
 - (c) легкую цепь и тяжелую цепь анти-PD-1 антитела, выбранного из **Таблицы 1**;
- (B) PD-L1-связывающая молекула представляет собой антитело, которое содержит:
 - (a) домен VL PD-L1, который содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:43**, и домен VH PD-L1, который содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:47**;
 - (b) домен VH и VL анти-PD-L1 антитела, выбранного из **Таблицы 2**; или
 - (c) легкую цепь и тяжелую цепь анти-PD-L1 антитела, выбранного из **Таблицы 2**; и
- (C) LAG-3-связывающая молекула представляет собой антитело, которое содержит:
 - (a) домен VL LAG-3, который содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:51**, и домен VH LAG-3, который содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:55**;
 - (b) домен VH и VL анти-LAG-3 антитела, выбранного из **Таблицы 3**; или
 - (c) легкую цепь и тяжелую цепь анти-LAG-3 антитела, выбранного из **таблицы 3**.

[0026] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит:

- (a) домен VL PD-1, который содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:35**, и домен VH PD-1, который содержит аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:39**, или домен VH и VL анти-PD-1 антитела, выбранного из **Таблицы 1**; и/или
- (b) домен VL LAG-3, содержащий аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:51**, и домен VH LAG-3, содержащий аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:55**, или домен VH и VL анти-LAG-3 антитела, выбранного из **Таблицы 3**; или
- (c) молекулу на основе биспецифического антитела, выбранную из **Таблиц 4-5**.

[0027] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит:

- (a) два из PD-1-связывающих доменов; и
- (b) два из LAG-3-связывающих доменов.

[0028] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит домен VL PD-1 с последовательностью **SEQ ID NO:35**, домен VH PD-1 с последовательностью **SEQ ID NO:39**, домен VL LAG-3 с последовательностью **SEQ ID NO:51** и домен VH LAG-3 с последовательностью **SEQ ID NO:55**.

[0029] Изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит Fc-область и шарнирный домен, и варианту реализации, где Fc-область и шарнирный домен оба относятся к изотипу IgG4, и где шарнирный домен включает стабилизирующую мутацию.

[0030] Изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где указанная Fc-область представляет собой вариант Fc-области, которая содержит:

- (A) одну или более модификаций аминокислот, снижающих аффинность варианта Fc-области в отношении FcγR, и/или
- (B) одну или более модификаций аминокислот, которые увеличивают время полужизни варианта Fc-области в сыворотке крови.

[0031] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где:

- (a) модификации, которые снижают аффинность варианта Fc-области в отношении FcγR, включают замену L234A; L235A или L234A и L235A; и
- (b) модификации, которые увеличивают время полужизни варианта Fc-области в сыворотке крови, включают замену M252Y; M252Y и S254T; M252Y и T256E; M252Y, S254T и T256E; или K288D и H435K,

где нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.

[0032] Изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит две полипептидные цепи с последовательностью **SEQ ID NO:59** и две полипептидные цепи с последовательностью **SEQ ID NO:60**.

[0033] Изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе приблизительно 300 мг, и варианту реализации, где PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе приблизительно 600 мг.

[0034] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где указанную фиксированную дозу вводят один раз приблизительно каждые 2 недели, и варианту реализации, где указанную фиксированную дозу вводят один раз приблизительно каждые 3 недели.

[0035] Изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг, один раз приблизительно каждые 2 недели.

[0036] Изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг, один раз приблизительно каждые 3 недели.

[0037] Изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят путем внутривенной (в/в) инфузии.

[0038] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где рак выбран из группы, состоящей из: рака надпочечников, СПИД-ассоциированного рака, альвеолярной саркомы мягких тканей, рака анального канала (включая плоскоклеточную карциному анального канала (SCAC)), рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, рака молочной железы (включая HER2⁺ рак молочной железы или тройной негативный рак молочной железы (TNBC)), опухоли каротидного тела, рака шейки матки (включая связанный с ВПЧ рак шейки матки), хондросаркомы, хордомы, хромофобной почечно-клеточной карциномы, светлоклеточной карциномы, рака толстой кишки, колоректального рака, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эпендимомы, рака эндометрия (включая неселективный рак эндометрия, рак эндометрия с высоким уровнем MSI, рак эндометрия с дефицитом репарации ошибок репликации (dMMR) и/или положительный рак эндометрия с мутацией в экзонуклеазном домене POLE), саркомы Юинга, экстраклеточной миксоидной хондросаркомы, рака желчного пузыря или желчного протока (включая холангиокарциному, рак желчных протоков), рака желудка, рака гастроэзофагеального перехода (GEJ), гестационного трофобластического заболевания, эмбрионально-клеточной опухоли, глиобластомы, рака головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN)), гематологического злокачественного новообразования, гепатоцеллюлярной карциномы, инсулиномы, саркомы Капоши, рака почки, лейкоза (включая острый миелоидный лейкоз), липосаркомы/злокачественной липоматозной опухоли рака печени (включая гепатоцеллюлярную карциному (HCC)), лимфомы (включая диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), неходжкинскую лимфому (NHL)), рака легких (включая мелкоклеточный рак легких (SCLC), немелкоклеточный рак легких (NSCLC)), медуллобластомы, меланомы (включая увеальную меланому), менингиомы, карциномы Меркеля, мезотелиомы (включая мезотелиальный фарингеальный рак), множественной эндокринной неоплазии, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринных опухолей, рака яичников, рака поджелудочной железы, папиллярной карциномы

щитовидной железы, паращитовидной опухоли, рака детского возраста, опухоли оболочек периферических нервов, фарингеального рака, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, рака предстательной железы (включая метастатический кастрационно-резистентный рак предстательной железы (mCRPC)), поттериальной увеальной меланомы, метастатического рака почек, рабдоидной опухоли, рабдомиосаркомы, саркомы, рака кожи, мелкокруглоклеточной опухоли с окрашиванием в синий цвет у детей (включая нейробластому и рабдомиосаркому), саркомы мягких тканей, плоскоклеточного рака, рака желудка, синовиальной саркомы, тестикулярного рака, карциномы тимуса, тимомы, рака щитовидной железы и рака матки.

[0039] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации вышеуказанных способов, где рак выбран из группы, состоящей из рака анального канала, рака молочной железы, рака желчного протока, рака шейки матки, колоректального рака, рака эндометрия, рака желудка, рака GEJ, рака головы и шеи, рака печени, рака легкого, лимфомы, меланомы, рака яичников и рака предстательной железы.

[0040] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где рак выбран из группы, состоящей из: HER2⁺ рака молочной железы, TNBC, рака желчных протоков (холангиокарциномы), ВПЧ-связанного рака шейки матки, SCCHN, HCC, SCLC или NSCLC, NHL, рака предстательной железы, рака желудка и рака GEJ.

[0041] Изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где ТА-связывающая молекула представляет собой HER2-связывающую молекулу, содержащую HER2-связывающий домен, содержащий переменный домен легкой цепи (VL_{HER2}) и переменный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}), где:

- (A) переменный домен легкой цепи (VL_{HER2}) содержит переменный домен легкой цепи маргетуксимаба, который содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} с последовательностью **SEQ ID NO:61**, и переменный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}) содержит переменный домен тяжелой цепи маргетуксимаба, который содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} с последовательностью **SEQ ID NO:66**;

- (B) вариабельный домен легкой цепи (VL_{HER2}) содержит CDR_{L1} , CDR_{L2} и CDR_{L3} трастузумаба, а вариабельный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}) содержит CDR_{H1} , CDR_{H2} и CDR_{H3} трастузумаба;
- (C) вариабельный домен легкой цепи (VL_{HER2}) содержит CDR_{L1} , CDR_{L2} и CDR_{L3} пертузумаба, и вариабельный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}) содержит CDR_{H1} , CDR_{H2} и CDR_{H3} пертузумаба; или
- (D) вариабельный домен легкой цепи (VL_{HER2}) содержит CDR_{L1} , CDR_{L2} и CDR_{L3} из hHER2 MAB-1, и вариабельный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}) содержит CDR_{H1} , CDR_{H2} и CDR_{H3} из hHER2 MAB-1.

[0042] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где HER2-связывающая молекула представляет собой анти-HER2 антитело.

[0043] Изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где анти-HER2 антитело представляет собой маргетуксимаб, и указанный способ включает введение маргетуксимаба в дозировке, составляющей от приблизительно 6 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг один раз приблизительно каждые 3 недели.

[0044] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где указанный способ дополнительно включает введение химиотерапевтического агента.

[0045] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где рак представляет собой HER2-экспрессирующий рак, и, в частности, где HER2-экспрессирующий рак выбран из группы, состоящей из: рака молочной железы, метастатического рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака GEJ, рака яичников, рака поджелудочной железы и рака желудка.

[0046] Изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где ТА-связывающая молекула представляет собой B7-H3-связывающую молекулу, содержащую B7-H3-связывающий домен, содержащий вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH), где:

vL содержит CDR_L1, CDR_L2 и CDR_L3 с последовательностью **SEQ ID NO:71**, и
VH содержит CDR_H1, CDR_H2 и CDR_H3 с последовательностью **SEQ ID NO:76**.

[0047] Изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где ТА-связывающая молекула представляет собой эноблитузумаб, и указанный способ включает введение эноблитузумаба в дозировке, составляющей от приблизительно 6 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг один раз приблизительно каждые 3 недели.

[0048] Способ по любому из пп. 2-33 или 40-41, где рак представляет собой B7-H3, экспрессирующий рак, и, в частности, где B7-H3, экспрессирующий рак выбран из группы, состоящей из: рака анального канала, SCAC, рака молочной железы, TNBC, рака головы и шеи, SCCHN, рака легкого, NSCLC, меланомы, увеальной меланомы, рака предстательной железы и mCRPC.

[0049] Изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где ТА-связывающую молекулу вводят путем внутривенной (в/в) инфузии.

[0050] Изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где клетки, экспрессирующие LAG-3, присутствуют в биопсии рака до начала лечения, и варианту реализации, где клетки, экспрессирующие PD-1, присутствуют в биопсии рака до начала лечения.

[0051] Изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где ко-экспрессия LAG-3 и PD-1 в биопсии рака до начала лечения указывает на то, что такой пациент является подходящим для таких способов, и варианту реализации изобретения, где экспрессия представляет собой экспрессию гена.

[0052] Настоящее изобретение дополнительно относится к варианту реализации описанных выше способов, где экспрессия PD-L1 на поверхности клеток рака до начала лечения составляет менее 1%, как определено с использованием комбинированного положительного показателя (CPS) или показателя пропорции опухоли (TPS).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0053] На **Фигуре 1** представлены схематичные изображения, показывающие типичные ковалентно связанные тетравалентные диатела, содержащие четыре сайта связывания эпитопа, состоящие из двух пар полипептидных цепей (*т.е.* всего из четырех полипептидных цепей). Один полипептид из каждой пары содержит домен, способствующий гетеродимеризации Е-спирали, а другой полипептид из каждой пары содержит домен, способствующий гетеродимеризации К-спирали. Как показано, в линкере и/или в способствующем гетеродимеризации домене может содержаться остаток цистеина. Один полипептид из каждой пары содержит линкер, содержащий цистеин (который может содержать всю или часть шарнирной области) и домен СН2 и/или СН3, таким образом, что объединенные цепи образуют всю или часть Fc-области. Домены VL и VH, распознающие один и тот же эпитоп, показаны с использованием одинакового затенения или штриховки. Согласно таким вариантам реализации настоящего изобретения, где две пары полипептидных цепей являются одинаковыми и домены VH и VL распознают различные эпитопы (как показано), полученная в результате молекула содержит четыре сайта связывания эпитопа и является биспецифической и бивалентной по отношению к каждому связанному эпитопу. В качестве альтернативы, в таких вариантах реализации настоящего изобретения, где две пары полипептидов могут быть различными и домены VL и VH каждой пары полипептидов распознают различные эпитопы, полученная в результате молекула имеет четыре сайта связывания эпитопа и является тетраспецифической и моновалентной по отношению к каждому связанному эпитопу.

[0054] На **фигуре 2** показаны наблюдаемые и смоделированные ФК-профили PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы, DART-I, в диапазоне доз от 1 мг до 1200 мг. Символы представляют данные наблюдений у отдельных пациентов, а сплошные линии представляют смоделированные медианные кривые для группы дозирования. Горизонтальная пунктирная линия представляет целевую пороговую концентрацию, основанную на клиническом опыте применения других агентов, нацеленных на PD-1.

[0055] **Фигуры 3A-3D** иллюстрируют средний (SD) процент занятости рецептора (RO) клеток CD4⁺ (**Фигуры 3A и 3C**) и клеток CD8⁺ (**Фигуры 3B и 3D**) с помощью PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы, DART-I, в день 1 цикла 1 (**Фигуры 3A и 3B**) или

цикла 2 (**Фигуры 3С и 3D**) в конце введения DART-I и до введения следующей дозы в этом цикле. EOI = окончание инфузии после приема первой дозы Цикла 1 или Цикла 2. PRE = до введения следующей дозы Цикла 1 или Цикла 2. Отсутствующие планки погрешности указывают на N=1.

[0056] На Фигурах 4А-4С показаны смоделированные медианные ФК профили многократных доз для введения фиксированных доз 400, 600, 800, 1000 и 1200 мг PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы, DART-I, с использованием схем Q2W (**Фигура 4А**), Q3W (**Фигура 4В**) и Q4W (**Фигура 3С**). Верхняя горизонтальная пунктирная линия представляет собой целевую пороговую минимальную концентрацию 23 мкг/мл, основанную на клиническом опыте, полученном с другими агентами, нацеленными на PD-1, средняя горизонтальная пунктирная линия представляет собой $RO\ EC_{50} \times 100$, а нижняя горизонтальная пунктирная линия представляет собой $RO\ EC_{50} \times 10$.

[0057] На Фигуре 5 представлен каскадный график процента снижения целевых поражений (представленный в виде % изменения относительно исходного уровня) среди пациентов, у которых оценивали ответ в когорте расширения, получавших PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу, DART-I, в зависимости от типа опухоли.

[0058] На фигурах 6А-6Е приведены показатели LAG-3 и PD-L1 по результатам ретроспективных иммуногистохимических анализов. Индивидуальные показатели LAG-3 (**Фигура 6А**) и PD-L1 (**Фигура 6В**) пациентов из когорт TNBC, EOC и NSCLC нанесены на график в порядке от высокого к низкому. Совокупные показатели LAG-3 из когорт TNBC, EOC и NSCLC, показаны на графике согласно клиническому ответу (**Фигура 6С**). Индивидуальные показатели LAG-3 пациента (**Фигура 6D**) из когорты DLBCL нанесены на график в порядке от высокого к низкому, показатели PD-L1 представлены ниже. Совокупные показатели LAG-3 из когорты DLBCL, показаны на графике согласно клиническому ответу (**Фигура 6Е**). PR=частичный ответ; SD=заболевание в стадии стабилизации; PD=прогрессирующее заболевание; CR=полный ответ.

[0059] На фигуре 7 показана экспрессия гена LAG-3 по сравнению с PD-1 (PDCD1) из ретроспективных анализов NanoString PanCancer IO 360™. Виды рака показаны следующим образом: круг (●) = NSCLC; ромб (◆) = P-NSCLC; треугольник (▲) = EOC; и квадрат (■) = TNBC. Клинические ответы показаны следующим образом: «R» =

отвечающий на лечение (частичный ответ); «P» = прогрессирующее заболевание; «S» = заболевание в стадии стабилизации; а символ отдельно указывает на неизвестность/неопределенность.

[0060] На **фигуре 8** представлен график показателей IFN- γ генной сигнатуры из ретроспективных анализов NanoString PanCancer IO 360™ по клиническому ответу (PR – частичный ответ; SD – заболевание в стадии стабилизации; PD – прогрессирующее заболевание). Виды рака показаны следующим образом: круг (●) = NSCLC; ромб (◆) = P-NSCLC; треугольник (▲) = EOC; и квадрат (■) = TNBC.

[0061] На **Фигуре 9** представлено сравнение изменения экспрессии молекул контрольных точек на поверхности НК-клеток, обусловленного воздействием ТА-связывающих молекул, имеющих ADCC-усиленный Fc-домен или Fc-домен дикого типа. Проточный цитометрический анализ экспрессии CD137 (верхний ряд), LAG-3 (второй ряд), PD-1 (третий ряд) и PD-L1 (нижний ряд) на НК-клетках из МКПК, инкубированных с N87 HER2+ клетками-мишенями, в присутствии буфера (-), маргетуксимаба (анти-HER2 антитело, имеющее ADCC-усиленный Fc-домен) или трастузумаба (анти-HER2 антитело, имеющее Fc-домен дикого типа), каждый в концентрации 0,005 мкг/мл или 0,05 мкг/мл. Показан процент положительных клеток (в рамке).

[0062] На **фигуре 10** показана цитотоксичность МКПК, предварительно обусловленная воздействием ТА-связывающих молекул, имеющих ADCC-усиленный Fc-домен или Fc-домен дикого типа. На графике представлены кривые цитотоксичности в отношении клеток-мишеней K562, опосредованные в основном НК-клетками, предварительно обработанными 0,005 мкг/мл или 0,05 мкг/мл маргетуксимаба (закрашенные и незакрашенные квадраты), 0,005 мкг/мл или 0,05 мкг/мл трастузумаба (закрашенные и незакрашенные треугольники), буфером (закрашенные круги).

[0063] На **Фигуре 11** представлено сравнение изменения экспрессии молекул контрольных точек на поверхности НК-клеток, моноцитов, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, обусловленной воздействием ТА-связывающей молекулы, имеющей ADCC-усиленный Fc-домен. Проточный цитометрический анализ экспрессии LAG-3 (верхний ряд), PD-1 (второй ряд), PD-L1 (третий ряд) и CD137 (нижний ряд) на различных типах иммунных клеток, присутствующих в МКПК, инкубированных с N87 HER2+ клетками-мишенями

в присутствии маргетуксимаба (анти-HER2 антитела, имеющего ADCC-усиленный Fc-домен), или контрольного антитела, каждое из которых представлено в концентрации мкг/мл или 0,5 мкг/мл. Показан процент положительных клеток (в рамке).

[0064] На **фигуре 12** показана цитотоксичность МКПК, предварительно обработанных ТА-связывающими молекулами, имеющими ADCC-усиленный Fc-домен (маргетуксимаб) или Fc-домен дикого типа (трастузумаб) в присутствии или в отсутствии анти-PD-1 антитела (ретифанлимаб) или PD-1 x LAG3 биспецифической молекулы (DART-I), к клеткам-мишеням K562 (цитотоксичность в значительной степени опосредована NK-клетками).

[0065] На **фигуре 13** показана цитотоксичность МКПК, предварительно обработанных ADCC-усиленной ТА-связывающей молекулой (маргетуксимаб) или контролем в присутствии или в отсутствии PD-1 x LAG3 биспецифической молекулы (DART-I) в отношении клеток-мишеней K562 (HER2-отрицательный) или N87 (HER2⁺⁺) (цитотоксичность в значительной степени опосредована NK-клетками).

[0066] На **Фигуре 14** представлен каскадный график предварительных клинических результатов для 28 оцениваемых пациентов, получавших PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу, DART-I, и ADCC-усиленную ТА-связывающую молекулу, маргетуксимаб. Показаны типы опухолей. Закрашенные столбцы гистограммы показывают ответы у пациентов, получающих 600 мг DART-I + 15 мг/кг; столбцы гистограммы в полосу показывают ответы у пациентов, получающих 300 мг DART-I + 15 мг/кг.

[0067] **Фигуры 15A-15C** иллюстрируют исходную экспрессию генов LAG3 и PD-1 (PDCD1) из 19 исходных образцов биопсии в когортах, получавших маргетуксимаб и DART-I. Двойная экспрессия LAG3/PDCD1 на начальном уровне представлена на графике на **Фигуре 15A**. Приведены графики экспрессии LAG-3 (**Фигура 15B**) и PDCD1 (**Фигура 15C**) на исходном уровне в зависимости от % изменения целевого пораженного участка(ов). CR = полный ответ; PR = частичный ответ; SD = заболевание в стадии стабилизации; PD = прогрессирующее заболевание.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0068] Настоящее изобретение относится к схемам введения одной или более молекул на основе антитела, которые связывают PD-1 или PD-L1 и LAG-3 (*например*, PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы) отдельно или в комбинации с молекулой на основе антитела, которая связывает опухолевый антиген (ТА), для лечения рака. Настоящее изобретение, в частности, относится к применению таких режимов в сочетании с биспецифическими молекулами PD-1 x LAG-3. Настоящее изобретение относится к применению таких молекул и к применению фармацевтических композиций и фармацевтических наборов, содержащих такие молекулы, которые облегчают применение таких схем дозирования для лечения рака.

I. Антитела и молекулы на основе антител

[0069] Антитело представляет собой молекулу иммуноглобулина, которая содержит эпитоп-связывающий домен, способный иммуноспецифично связываться с целевым участком (**«эпитопом»**) молекулы (*например*, эпитоп опухолевого антигена (**«ТА»**), эпитоп PD-1, эпитоп PD-L1 или эпитоп LAG-3), с помощью по меньшей мере одного **«эпитоп-связывающего домена»**, расположенного в вариабельной области такой молекулы иммуноглобулина. Такие молекулы могут относиться к любому классу изотипов (*например*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (*например*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂) или подклассу.

[0070] Предполагается, что используемые в настоящей заявке термины **«антитело»** и **«антитела»** включают моноклональные антитела, полиспецифичные антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, синтетические антитела, химерные антитела, поликлональные антитела и верблюжьи антитела. Используемый в настоящей заявке термин **«молекула на основе антитела»** относится как к полным или интактным молекулам антител, так и к молекулам, которые не являются полными или интактными антителами, но содержат эпитоп-связывающий домен антитела (*например*, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, F(ab') - фрагменты, дисульфид-связанные биспецифические Fv (sdFv), интратела, диатела, молекулы, которые содержат домены VL, VH или VL и VH антитела, и молекулы, которые содержат 1, 2 или 3 домена CDR легкой цепи антитела, 1, 2 или 3 домена CDR тяжелой цепи антитела, любые 1, 2, 3, 4 или 5 доменов CDR легкой цепи и тяжелой цепи

антитела, или все 6 доменов CDR легкой цепи и тяжелой цепи антитела). Такие молекулы на основе антител могут представлять собой слитые белки, содержащие дополнительные компоненты, *например*, пептидные линкеры, домены димеризации *и т. д.*

[0071] Молекулы на основе антител согласно настоящему изобретению способны **«иммуноспецифично связываться»** с эпитопом вследствие наличия такого эпитоп-связывающего домена(доменов). В контексте настоящей заявки указано, что антитело или его эпитоп-связывающий фрагмент **«иммуноспецифично»** связывает область другой молекулы (*то есть* эпитоп), если он взаимодействует или образует комплекс с указанным эпитопом более часто, более быстро, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью или авидностью по сравнению с альтернативными эпитопами (например, вариантными эпитопами, содержащими 1, 2, 3 или более, чем 3 аминокислотные замены, или полипептидами, которые обладают менее чем 50% идентичностью или которые не являются родственными). Из этого определения также понятно, что, например, молекула на основе антитела, которая иммуноспецифично связывается с первой мишенью, может связываться или не связываться иммуноспецифично или преимущественно со второй мишенью. Содержащая эпитоп молекула может обладать иммуногенной активностью, вызывающей ответную продукцию антитела у животного; такие молекулы называются **«антигенами»**.

[0072] Природные антитела способны связываться только с одним видом эпитопа (т.е. они являются **«моноспецифическими»**), несмотря на то что они могут связываться со множеством копий эпитопов данного вида (т.е. проявляют **«бивалентность»** или **«мультивалентность»**). В связи с этим, основной структурной единицей встречающегося в природе полного или интактного антитела IgG является тетрамер, состоящий из четырех собранных полипептидных цепей: двух более коротких **«легких цепей»**, объединенных в комплекс с двумя более длинными **«тяжелыми цепями»**. Каждая полипептидная цепь состоит из аминоконцевой (**«N-концевой»**) части, которая содержит **«вариабельный домен»**, и карбоксиконцевой (**«С-концевой»**) части, которая содержит по меньшей мере один **«константный домен»**. Легкая цепь IgG состоит из одного **«вариабельного домена легкой цепи»** (**«VL»**) и одного **«константного домена легкой цепи»** (**«CL»**). Таким образом, структура легких цепей антитела IgG представляет собой n-VL-CL-с (где n и с означают, соответственно, N-конец и С-конец

полипептидной цепи). Тяжелая цепь IgG состоит из одного «**вариабельного домена тяжелой цепи**» («**VH**»), трех «**константных доменов тяжелой цепи**» («**CH1**», «**CH2**» и «**CH3**») и «**шарнирной**» области («**H**»), расположенной между доменами CH1 и CH2. Если специально не указано обратное, домены белковых молекул, описанных в настоящей заявке, расположены в направлении от N-конца к С-концу. Таким образом, структура тяжелой цепи IgG представляет собой n-VH-CH1-H-CH2-CH3-с (где n и с означают, соответственно, N-конец и С-конец полипептида). Способность интактного немодифицированного антитела (например, антитела IgG) связывать эпитоп антигена зависит от присутствия и последовательностей вариабельных доменов.

А. Константные домены

1. Константный домен легкой цепи

[0073] Один домен CL представляет собой домен CL каппа IgG человека. Аминокислотная последовательность типичного домена CL каппа человека представляет собой (**SEQ ID NO:1**):

```
RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC
```

[0074] Другой домен CL представляет собой домен CL лямбда IgG человека. Аминокислотная последовательность типичного домена CL лямбда человека представляет собой (**SEQ ID NO:2**):

```
QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA
GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS
```

2. Домены CH1 тяжелой цепи

[0075] Типичный домен CH1 представляет собой домен CH1 IgG1 человека. Аминокислотная последовательность типичного домена CH1 IgG1 человека представляет собой (**SEQ ID NO:3**):

```
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV
```

[0076] Другой типичный домен CH1 представляет собой домен CH1 IgG2 человека. Аминокислотная последовательность типичного домена CH1 IgG2 человека представляет собой (**SEQ ID NO:4**):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

[0077] Другой типичный домен CH1 представляет собой домен CH1 IgG3 человека. Аминокислотная последовательность типичного домена CH1 IgG3 человека представляет собой (**SEQ ID NO:5**):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHNKPS NTKVDKRV

[0078] Другой типичный домен CH1 представляет собой домен CH1 IgG4 человека. Аминокислотная последовательность типичного домена CH1 IgG4 человека представляет собой (**SEQ ID NO:6**):

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

3. Шарнирные области тяжелой цепи

[0079] Типичная шарнирная область представляет собой шарнирную область IgG1 человека. Аминокислотная последовательность типичной шарнирной области IgG1 человека представляет собой (**SEQ ID NO:7**):

EPKSCDKTHT CPPCP

[0080] Другая типичная шарнирная область представляет собой шарнирную область IgG2 человека. Аминокислотная последовательность типичной шарнирной области IgG2 человека представляет собой (**SEQ ID NO:8**):

ERKCCVECP CP

[0081] Другая типичная шарнирная область представляет собой шарнирную область IgG3 человека. Аминокислотная последовательность типичной шарнирной области IgG3 человека представляет собой (**SEQ ID NO:9**):

ELKTP LGDTT HTCPRCP EPK SCDTPPPCPR CP EPKSCDTP PPCPRCP EPK
SCDTPPPCPR CP

[0082] Другая типичная шарнирная область представляет собой шарнирную область IgG4 человека. Аминокислотная последовательность типичной шарнирной области IgG4 человека представляет собой (**SEQ ID NO:10**):

ESKYGPFCPS CP

[0083] Как описано в настоящей заявке, шарнирная область IgG4 может содержать стабилизирующую мутацию, такую как замена S228P (нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat). Аминокислотная последовательность конкретной стабилизированной шарнирной области IgG4 представляет собой (SEQ ID NO:11):

ESKYGPPCPP CP

4. Домены CH2 и CH3 тяжелой цепи и Fc-домены

[0084] Домены CH2 и CH3 двух тяжелых цепей взаимодействуют с образованием «Fc-области» антител IgG, которая распознается клеточными Fc-рецепторами, включая Fc-гамма-рецепторы (FcγR), но не ограничиваясь ими. Используемый в настоящей заявке термин «Fc-область» применяется для определения C-концевого участка тяжелой цепи IgG. Часть Fc-области (включая часть, которая охватывает всю Fc-область) упоминается в настоящей заявке как «Fc-домен». Считается, что Fc-домен относится к определенному изотипу, классу или подклассу IgG, если его аминокислотная последовательность наиболее гомологична этому изотипу по сравнению с другими изотипами IgG, однако в настоящем изобретении предложены гибридные Fc-домены, содержащие части из различных изотипов.

[0085] Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 типичного IgG1 человека представляет собой (SEQ ID NO:12):

231	240	250	260	270	280
APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	
	290	300	310	320	330
	GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA
	340	350	360	370	380
	PIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE
	390	400	410	420	430
	WESNGQPENN	YKTPPVLDL	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVME
	440	447			
	ALHNHYTQKS	LSLSPG	<u>X</u>		

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[0086] Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 типичного IgG2 человека представляет собой (SEQ ID NO:13):

231	240	250	260	270	280
APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD					
290	300	310	320	330	
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA					
340	350	360	370	380	
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE					
390	400	410	420	430	
WESNGQPENN YKTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE					
440	447				
ALHNHYTQKS LSLSPG <u>X</u>					

где **X** представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[0087] Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 типичного IgG3 человека представляет собой (SEQ ID NO:14):

231	240	250	260	270	280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD					
290	300	310	320	330	
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA					
340	350	360	370	380	
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE					
390	400	410	420	430	
WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE					
440	447				
ALHNRFTQKS LSLSPG <u>X</u>					

где **X** представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[0088] Аминокислотная последовательность домена CH2-CH3 типичного IgG4 человека представляет собой (**SEQ ID NO:15**):

```

231      240      250      260      270      280
APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

      290      300      310      320      330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

      340      350      360      370      380
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

      390      400      410      420      430
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE

      440      447
ALHNHYTQKS LSLSLGX

```

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[0089] В тексте настоящей заявки нумерация остатков в константных областях тяжелой цепи IgG соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat *et al.*, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, NIH, MD (1991), специально включенную в настоящую заявку посредством ссылки. Термин «индекс EU по системе Kabat» относится к нумерации IgG1 человека по европейской системе нумерации антител.

[0090] В ряде различных положений внутри константных областей антитела наблюдались полиморфизмы (*например*, положения CH1, включая, но не ограничиваясь указанными, положения 192, 193 и 214; положения Fc, включая, но не ограничиваясь указанными, положения 270, 272, 312, 315, 356 и 358 в соответствии с нумерацией согласно индексу EU по системе Kabat), и, следовательно, могут существовать небольшие различия между представленной последовательностью и последовательностями, известными из уровня техники. Полиморфные формы иммуноглобулинов человека подробно описаны. В настоящее время известно 18 Gm-аллотипов: G1m (1, 2, 3, 17) или G1m (a, x, f, z), G2m (23) или G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) или G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, *et al.*, “The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation.” Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. *et al.*, 1979, Hum. Genet.: 50,

199-211). В частности, предложено, что антитела согласно настоящему изобретению могут включать любой аллотип, изоаллотип или гаплотип любого гена иммуноглобулина и не ограничиваются аллотипом, изоаллотипом или гаплотипом последовательностей, представленных в настоящей заявке. Кроме того, в некоторых системах экспрессии С-концевой аминокислотный остаток (выделенный жирным шрифтом выше) домена СН3 может быть удален посттрансляционно. Таким образом, С-концевой остаток домена СН3 является необязательным аминокислотным остатком в молекулах согласно настоящему изобретению. В частности, в настоящем изобретении предложены молекулы, не содержащие С-концевой остаток домена СН3. Также в настоящем изобретении предложены такие молекулы, содержащие С-концевой остаток лизина в домене СН3.

[0091] Fc-домен содержащих Fc-домен молекул на основе антител согласно настоящему изобретению может представлять собой полный Fc-домен (*например*, полную Fc-область IgG) или только часть Fc-области. Необязательно Fc-домен содержащих Fc-домен молекул согласно настоящему изобретению не содержит С-концевой аминокислотный остаток лизина СН3-доменов IgG дикого типа.

[0092] В классических иммунных реакциях взаимодействие комплексов антиген-антитело с иммунными клетками приводит к широкому спектру ответов, варьирующих от эффекторных функций, таких как зависимая от антитела цитотоксичность, дегрануляция тучных клеток и фагоцитоз, до иммуномодулирующих сигналов, таких как сигналы, регулирующие пролиферацию лимфоцитов и секрецию антител. Все эти взаимодействия инициирует связывание Fc-домена антител или иммунных комплексов со специализированными рецепторами клеточной поверхности на гемопоэтических клетках. Разнообразие клеточных ответов, вызываемых антителами и иммунными комплексами, является результатом структурной гетерогенности трех Fc рецепторов: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) и FcγRIII (CD16) являются активирующими (то есть стимулирующими иммунную систему) рецепторами; FcγRIIB (CD32B) является ингибирующим (то есть подавляющим иммунную систему) рецептором. Помимо этого, взаимодействие с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) опосредует рециркуляцию молекулы IgG из эндосомы на поверхность клетки и высвобождение в кровь. Аминокислотные

последовательности доменов CH2-CH3 типичных IgG1 (SEQ ID NO:12), IgG2 (SEQ ID NO:13), IgG3 (SEQ ID NO:14) и IgG4 (SEQ ID NO:15) дикого типа представлены выше.

[0093] Аминокислотная последовательность Fc-домена может быть модифицирована для обеспечения измененного фенотипа, например, измененного времени полужизни в сыворотке, измененной стабильности, измененной восприимчивости к клеточным ферментам, измененной эффекторной функции или комбинации таких фенотипов. В частности, в настоящем изобретении предложены молекулы на основе антитела, которые содержат Fc-домен дикого типа или Fc-домен, модифицированный для усиления его способности опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) относительно ADCC, опосредованной такой молекулой на основе антитела, содержащей Fc-домен без такой модификации. Такие модифицированные Fc-домены обозначены в настоящей заявке как **«ADCC-усиленные Fc-домены»**. В настоящем изобретении также предложены молекулы на основе антител, которые содержат Fc-домен, обладающий незначительной активностью ADCC или не обладающий такой активностью. Соответственно, согласно определенным вариантам реализации молекулы на основе антител согласно настоящему изобретению могут быть сконструированы таким образом, чтоб они содержат **ADCC-усиленный Fc-домен** или Fc-домен, обладающий незначительной активностью ADCC или не обладающий такой активностью. Несмотря на то, что Fc-домен молекул на основе антител согласно настоящему изобретению может обладать способностью связываться с одним или более Fc-рецепторами (*например*, FcγR), согласно некоторым вариантам реализации изобретения такие Fc-домены представляют собой модифицированные Fc-домены, характеризующиеся измененным связыванием с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32a), FcγRIIB (CD32b), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (по сравнению со связыванием, проявляемым Fc-доменом без такой модификации). Например, такие варианты Fc-доменов могут иметь усиленное связывание с активирующим рецептором(рецепторами) и/или характеризуются существенно сниженной способностью или отсутствием способности связываться с ингибирующим рецептором(рецепторами) и проявляют усиленную активность ADCC. В качестве альтернативы, такие варианты Fc-доменов могут характеризоваться существенно сниженной способностью или отсутствием способности связываться с активирующим рецептором(рецепторами) и/или характеризуются усиленным связыванием с

ингибирующим рецептором(рецепторами) и проявляют незначительную активность ADCC или отсутствие активности ADCC.

[0094] Модификации, которые уменьшают или исключают связывание FcγR (и активность ADCC), хорошо известны в данной области техники и включают аминокислотные замены в положениях 234 и 235, замену в положении 265 или замену в положении 297, где нумерация представлена согласно индексу EU по системе Kabat (см., например, патент США № 5624821). Согласно одному варианту реализации молекулы на основе антител согласно настоящему изобретению содержат Fc-домен, обладающий незначительной активностью ADCC или не обладающий такой активностью, которая содержит 1, 2, 3 или 4 из замен: L234A, L235A, D265A, N297Q и N297G. Согласно конкретному варианту реализации молекулы на основе антител согласно настоящему изобретению содержат Fc-домен, имеющий незначительную активность ADCC или не имеющий такой активности, который содержит замену в положении 234 на аланин и замену в положении 235 на аланин (234A, 235A), где нумерация представлена согласно индексу EU по системе Kabat. В качестве альтернативы такие молекулы могут содержать встречающийся в природе Fc-домен, который по своей природе проявляет пониженное связывание (или по существу не проявляет связывания) с FcγRIIIa (CD16a) и/или пониженную эффекторную функцию (относительно связывания и эффекторной функции, проявляемых Fc-доменом IgG1 дикого типа). Согласно конкретному варианту реализации Fc-содержащие молекулы согласно настоящему изобретению содержат Fc-домен IgG2 (**SEQ ID NO:13**) или Fc-домен IgG4 (**SEQ ID:NO:15**). В случае использования Fc-домена IgG4 в настоящем изобретении также предложено введение стабилизирующей мутации, такой как замена S228P в шарнирной области, описанная выше (см., например, **SEQ ID NO:11**).

[0095] **ADCC-усиленные Fc-домены** согласно настоящему изобретению могут содержать частично или полностью домен CH2 и/или частично или полностью домен CH3 полного Fc-домена, или могут содержать последовательность вариантного CH2 и/или вариантного CH3 (которая может содержать, например, одну или более замен и/или вставок и/или одну или более делеций относительно доменов CH2 или CH3 полного Fc-домена). Такие Fc-домены могут содержать части полипептида, отличные от Fc, или могут содержать части неприродных полных Fc-доменов, или могут включать не встречающиеся в природе ориентации доменов CH2 и/или CH3 (такие как, например,

два домена CH2 или два домена CH3, или, в направлении от N-конца к С-концу, домен CH3, связанный с доменом CH2, и так далее).

[0096] ADCC-усиленные Fc-домены, определенные как изменяющие эффекторную функцию (*например*, ADCC), известны в данной области техники, включая модификации, которые усиливают связывание с активирующими Fc-рецепторами (*например*, FcγRIIA (CD16A)) по сравнению с ингибирующими Fc-рецепторами (*например*, FcγRIIB (CD32B)) (см., *например*, Stavenhagen, J.B. et al. (2007) “*Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγ Receptors*,” Cancer Res. 57(18): 8882-8890)). Описаны многочисленные одиночные, двойные, тройные, четырехкратные и пятикратные замены, которые усиливают активность ADCC (см., *например*, патенты США № 6737056; 7317091; 7355008; 7960512; 8217147; 8652466).

[0097] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения **ADCC-усиленные Fc-домены** содержат Fc-домен, который содержит одну или более аминокислотных замен (по сравнению с Fc-доменом IgG дикого типа), выбранных из замен S239D, F243L, D270E, R292G, R292P, Y300L, V305I, I332E или P396L, где нумерация представлена согласно индексу EU по системе Kabat . Указанные аминокислотные замены могут присутствовать в Fc-доме IgG человека (*например*, Fc-доме IgG1) в любой комбинации. Согласно одному из вариантов реализации настоящего изобретения вариантный Fc-домен IgG человека содержит замены S239D и I332E. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения вариантный Fc-домен IgG человека содержит замены F243L, R292P и Y300L. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения вариантный Fc-домен IgG человека содержит замены F243L, R292P, Y300L, V305I и P296L. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения такой **ADCC-усиленный Fc-домен** IgG человека содержит:

- (a) одну замену, выбранную из группы, состоящей из:
 - (1) F243L;
 - (2) R292P;
 - (3) Y300L;
 - (4) V305I;

- (5) I332E; и
- (6) P396L
- (b) две замены, выбранные из группы, состоящей из:
 - (1) F243L и P396L;
 - (2) F243L и R292P;
 - (3) R292P и V305I; и
 - (4) S239D и I332E
- (c) три замены, выбранные из группы, состоящей из:
 - (1) F243L, R292P и Y300L;
 - (2) F243L, R292P и V305I;
 - (3) F243L, R292P и P396L; и
 - (4) R292P, V305I и P396L;
- (d) четыре замены, выбранные из группы, состоящей из:
 - (1) F243L, R292P, Y300L и P396L; и
 - (2) F243L, R292P, V305I и P396L; или
- (e) пять замен, выбранных из группы, состоящей из:
 - (1) F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L; и
 - (2) L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L,

где нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.

[0098] Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения **ADCC-усиленный Fc-домен** включает:

- (1) **ADCC-усиленный Fc-домен «FcMT1»**, где такой домен содержит замены F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L. Молекулы на основе антител, которые содержат FcMT1 вариант Fc-домена IgG1, демонстрируют 10-кратное увеличение связывания с CD16A человека (FcγRIIIA) по сравнению со связыванием, наблюдаемым с Fc-доменом IgG1 дикого типа, и связывание с CD16-158Phe усиливается пропорционально большим образом, чем связывание с CD16-158Val. Аминокислотная последовательность **ADCC-усиленного Fc-домена «FcMT1»** представляет собой (**SEQ ID NO:16**):

```

APELLGGPSV FLLPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PPEEQYNSTL RVVSILTVLH
QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT

```

LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTPLVLDS DGSFFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHNTQKS LSLSPGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

- (2) **ADCC-усиленный Fc-домен «FcMT2»**, где такой домен содержит замены L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L. Вариант FcMT2 Fc домена IgG1 представляет собой дополнительное изменение FcMT1 варианта Fc домена IgG1 и обладает сходными свойствами связывания CD16A, но характеризуется более благоприятным снижением связывания с CD32B (FcγRIIB). Аминокислотная последовательность **ADCC-усиленного Fc-домена «FcMT2»** представляет собой (SEQ ID NO:17):

APELVGGPSV FLPLPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PPEEQYNSTL RVVSVLTVLH
QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTPLVLDS DGSFFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHNTQKS LSLSPGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

или

- (3) **ADCC-усиленный Fc-домен «FcMT3»**, где такой домен содержит замены F243L, R292P и Y300L. Вариант FcMT3 Fc домена IgG1 представляет собой дополнительное изменение FcMT1 варианта Fc домена IgG1 и обладает сходными свойствами связывания CD16A, но характеризуется более благоприятным снижением связывания с CD32B (FcγRIIB). Аминокислотная последовательность **ADCC-усиленного Fc-домена «FcMT3»** представляет собой (SEQ ID NO:18):

APELLGGPSV FLPLPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PPEEQYNSTL RVVSVLTVLH
QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN
YKTTPLVLDS DGSFFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHNTQKS LSLSPGX

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[0099] Согласно альтернативным вариантам реализации настоящего изобретения **ADCC-усиленные Fc-домены** содержат сконструированную гликоформу, которая представляет собой сложную N-гликозид-связанную сахарную цепь, которая не

содержит фукозы, и/или содержит биссекционирующую O-GlcNAc. Такие гликоформы могут быть получены путем рекомбинантной экспрессии молекулы на основе антитела в клеточных линиях, в которых отсутствует фукозилаттрансфераза (*например*, клеточные линии POTELLIGENT®, BioWa, Inc.; Matsushita, T. (2011) “*Engineered Therapeutic Antibodies With Enhanced Effector Functions: Clinical Application Of The Potelligent® Technology*,” Korean J. Hematol. 46(3):148-150), и/или в клеточных линиях, которые экспрессируют O-GlcNAc transferase (Roche GlycArt AG; Satoh, M. *et al.* (2006) “*Non-Fucosylated Therapeutic Antibodies As Next-Generation Therapeutic Antibodies*,” Exp. Opin. Biol. Ther. 6(11):1161-1173). Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения **ADCC-усиленные Fc-домены** содержат одну или более аминокислотных замен и сконструированную гликоформу.

[00100] Кроме того, период полужизни в сыворотке крови молекул, содержащих Fc-домен, может быть увеличен за счет увеличения аффинности связывания Fc-домена с FcRn. Используемый в настоящей заявке термин «время полужизни» означает фармакокинетическое свойство молекулы, которое является мерой среднего времени жизни молекул после их введения. Время полужизни может быть выражено как время, необходимое для удаления пятидесяти процентов (50%) известного количества молекулы из организма субъекта (*например*, пациента-человека или другого млекопитающего) или его определенного отдела, *например*, определяемое в сыворотке, то есть время полужизни в кровотоке или в других тканях. В целом, увеличение времени полужизни приводит к увеличению среднего времени удержания (СВУ) в кровотоке для введенной молекулы. Модификации, способные увеличивать время полужизни содержащей Fc-домен молекулы, известны в данной области техники и включают, *например*, аминокислотные замены M252Y, S254T, T256E и их комбинации. *Например*, см. модификации, описанные в патентах США № 6277375, 7083784; 7217797 и 8088376; публикациях заявок на патент США № 2002/0147311 и 2007/0148164 и публикациях заявок PCT № WO 98/23289; WO 2009/058492 и WO 2010/033279).

[00101] Согласно одному варианту реализации молекулы на основе антитела согласно настоящему изобретению содержат вариант Fc-домена, где такой вариант Fc-домена содержит замену в положении 252 на тирозин, 254 на треонин и 256 на глутамат (252Y, 254T и 256E), причем нумерация соответствует индексу EU по системе Kabat.

[00102] Настоящее изобретение также включает молекулы на основе антител согласно настоящему изобретению, содержащие Fc-домен, где такой Fc-домен содержит:

- (a) одну или более мутаций, которые изменяют эффекторную функцию и/или связывание с FcγR; и/или
- (B) одну или более мутаций, которые увеличивают время полужизни в сыворотке.

[00103] Согласно одному варианту реализации молекулы на основе антитела согласно настоящему изобретению содержат Fc-домен, причем такой Fc-домен содержит:

- (a) одну или более мутаций, которые снижают или исключают ADCC; и/или
- (B) одну или более мутаций, которые увеличивают время полужизни в сыворотке.

[00104] Типичная последовательность IgG1 для доменов CH2 и CH3 варианта Fc-домена, имеющего незначительную ADCC-активность или не имеющего такой активности, и увеличенный период полужизни в сыворотке, содержит замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:19**):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME
 ALHNHYTQKS LSLSPGX,

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

[00105] Типичная последовательность IgG4 для доменов CH2 и CH3 варианта Fc-домена, имеющего увеличенное время полужизни, содержит замены M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:20**):

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME
 ALHNHYTQKS LSLSLGX,

где X представляет собой лизин (K) или отсутствует.

5. Вариабельные домены

[00106] Вариабельные домены молекулы IgG содержат три «**определяющих комплементарность участка**» («**CDR**»), содержащие аминокислотные остатки

антитела, которые будут контактировать с эпитопом, а также промежуточные сегменты, не относящиеся к CDR, называемые «каркасными областями» («FR»), которые в целом поддерживают структуру и определяют положение остатков CDR для обеспечения возможности такого контактирования (хотя некоторые каркасные остатки также могут контактировать с эпитопом). Таким образом, домены VL и VH имеют структуру **n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c**. Аминокислотные последовательности CDR определяют, способно ли антитело связываться с конкретным эпитопом. Взаимодействие легкой цепи антитела с тяжелой цепью антитела и, в частности, взаимодействие их VL- и VH-доменов, приводит к образованию эпитоп-связывающего домена антитела.

[00107] Аминокислоты переменных доменов зрелых тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов обозначаются положением аминокислоты в цепи. Kabat (SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991)) описал многочисленные аминокислотные последовательности для антител, идентифицировал консенсусную последовательность аминокислот для каждой подгруппы и присвоил каждой аминокислоте номер остатка, и указанные CDR и FR определены по Kabat (следует понимать, что CDR_{H1}, как определено по Chothia, C. & Lesk, A.M. ((1987) “*Canonical Structures For The Hypervariable Regions of Immunoglobulins*,” J. Mol. Biol. 196:901-917) начинается на пять остатков ранее). Схема нумерации по Kabat может быть применена к антителам, не включенным в составленный им перечень, путем выравнивания последовательности рассматриваемого антитела с одной из консенсусных последовательностей, пронумерованных по системе Kabat, по консервативным аминокислотам. Этот метод присвоения номеров остатков является стандартным в данной области техники и позволяет легко идентифицировать аминокислоты в эквивалентных положениях в различных антителах, включая химерные или гуманизированные варианты. Например, аминокислота в положении 50 легкой цепи антитела человека занимает эквивалентное положение по отношению к аминокислоте в положении 50 легкой цепи антитела мыши. Таким образом, положения в доменах VL и VH, в которых их CDR начинаются и заканчиваются, хорошо известны и могут быть установлены с помощью проверки последовательностей доменов VL и VH (см., например, Martin, C.R. (2010) “*Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable*

Domains,” В: ANTIBODY ENGINEERING VOL. 2 (Kontermann, R. and Dübel, S. (eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Chapter 3 (pages 33-51)).

[00108] Полипептиды, которые представляют собой первый, второй и третий CDR легкой цепи антитела (или могут осуществлять их функции), в настоящей заявке соответственно обозначены как: **домен CDR_L1**, **домен CDR_L2** и **домен CDR_L3**. Схожим образом, полипептиды, которые представляют собой первый, второй и третий CDR тяжелой цепи антитела (или могут осуществлять их функции), в настоящей заявке соответственно обозначены как: **домен CDR_H1**, **домен CDR_H2** и **домен CDR_H3**. Таким образом, термины домен CDR_L1, домен CDR_L2, домен CDR_L3, домен CDR_H1, домен CDR_H2 и домен CDR_H3 относятся к полипептидам, которые при включении в белок обуславливают способность указанного белка связываться с конкретным эпитопом, независимо от того, является ли такой белок антителом, имеющим легкую и тяжелую цепи, или представляет собой диатело, или одноцепочечную связывающую молекулу (*например*, scFv, BiTe и т.д.), или представляет собой другой тип белка. Соответственно, используемый в настоящей заявке термин «**эпитоп-связывающий домен**» обозначает часть молекулы на основе антитела согласно настоящему изобретению, способную иммуноспецифично связываться с эпитопом. Эпитоп-связывающий домен может содержать любые 1, 2, 3, 4 или 5 доменов CDR антитела, или может содержать все 6 доменов CDR антитела и, несмотря на способность к иммуноспецифичному связыванию с таким эпитопом, может проявлять иммуноспецифичность, аффинность или селективность по отношению к такому эпитопу, отличные от указанных свойств такого антитела. Однако, как правило, эпитоп-связывающий домен содержит все 6 доменов CDR такого антитела.

[00109] Эпитоп-связывающий домен может содержать либо полный переменный домен, слитый с константными доменами, либо только определяющие комплементарность участки (CDR) такого переменного домена, привитые на подходящие каркасные области. Эпитоп-связывающие домены могут представлять собой домены дикого типа или быть модифицированы путем одной или более аминокислотных замен.

Гуманизация молекул на основе антител

[00110] Настоящее изобретение, в частности, охватывает молекулы на основе антител, которые содержат домен VL и/или домен VH гуманизированного антитела. Термин «гуманизированное антитело» антитело относится к химерной молекуле, обычно полученной с помощью рекомбинантных методик, имеющей эпитоп-связывающий домен иммуноглобулина, полученного от видов, не являющихся человеком, и остальную структуру иммуноглобулина, основанную на структуре и/или последовательности иммуноглобулина человека. Полинуклеотидная последовательность переменных доменов таких антител может применяться для генетических манипуляций с целью получения таких производных и для улучшения аффинности или других характеристик таких антител. Известно, что переменные домены как тяжелой, так и легкой цепей содержат три определяющих комплементарность участка (CDR), которые изменяются в ответ на соответствующие антигены и определяют способность к связыванию, окруженные четырьмя каркасными областями (FR), которые относительно консервативны для данного вида и предположительно обеспечивают поддержание структуры CDR. Когда антитела, не являющиеся человеческими, получают для конкретного антигена, переменные домены могут быть «реконструированы» или «гуманизированы». Общий принцип при гуманизировании антитела включает сохранение основной последовательности эпитоп-связывающей части антитела при замене оставшейся части нечеловеческого антитела на последовательности антитела человека. Существует четыре основных стадии гуманизации моноклонального антитела. К ним относятся: (1) определение нуклеотидной и предполагаемой аминокислотной последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей исходного антитела; (2) конструирование гуманизированного антитела или канинизированного антитела, то есть принятие решения, какую каркасную область антитела следует использовать в процессе гуманизации или канинизации; (3) существующие в настоящее время подходы/методики гуманизации или канинизации и (4) трансфекция и экспрессия гуманизированного антитела. См., например, патенты США № 4816567; 5807715; 5866692 и 6331415; Lobuglio *et al.* (1989) “*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989). Другие источники описывают CDR антител грызунов, привитые в поддерживающую каркасную область (FR) антитела человека до слияния с подходящим константным доменом антитела

человека (см., например, Riechmann, L. *et al.* (1988) “*Reshaping Human Antibodies for Therapy*,” *Nature* 332:323-327; и Jones *et al.* (1986) “*Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse*,” *Nature* 321:522-525). Другие способы гуманизации антител, которые также можно применять, раскрыты в Daugherty *et al.* (1991) “*Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins*,” *Nucl. Acids Res.* 19:2471-2476 и в патентах США № 6180377; 6054297; 5997867 и 5866692). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения гуманизированные антитела сохраняют все последовательности CDR (например, гуманизированное антитело мыши, которое содержит все шесть CDR антитела мыши). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения гуманизированные антитела имеют один или более CDR (один, два, три, четыре, пять или шесть), которые отличаются по последовательности от исходного антитела.

В. Биспецифические молекулы

[00111] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекула на основе антитела согласно настоящему изобретению является биспецифической, такой как биспецифическое антитело или биспецифическое диантело. Такая биспецифическая молекула на основе антитела может содержать предложенные эпитоп-связывающие домены PD-1 и LAG-3 (*то есть* PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула) или предложенные эпитоп-связывающие домены PD-L1 и LAG-3 (*то есть*, PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула). Получение таких биспецифических молекул на основе антител обеспечивает значительное преимущество по сравнению с моноспецифическими антителами: возможность совместно лигировать PD-1 и LAG-3 на клетке, которая их коэкспрессирует и/или солокализовать клетку, которая экспрессирует PD-1, и клетку, которая экспрессирует LAG-3, или возможность совместно лигировать PD-L1 и LAG-3 на клетке, которая их коэкспрессирует и/или солокализовать клетку, которая экспрессирует PD-L1, и клетку, которая экспрессирует LAG-3. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения такие биспецифические молекулы на основе антител могут связываться с двумя различными ТА.

1. Биспецифические антитела

[00112] Было разработано большое количество различных рекомбинантных биспецифических антител (см., *например*, публикации РСТ № WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544 и WO 2013/070565), в большинстве из которых используются линкерные пептиды для слияния дополнительного эпитопсвязывающего фрагмента (*например*, scFv, VL, VH и т.д.) с антителом или для слияния в пределах его каркасной структуры (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) или для слияния нескольких эпитоп-связывающих фрагментов (*например*, два Fab фрагмента или scFv). В альтернативных форматах используют линкерные пептиды для слияния эпитопсвязывающего фрагмента (*например*, scFv, VL, VH и т.д.) с доменом димеризации, таким как домен CH2-CH3, или альтернативными полипептидами (публикации РСТ № WO 2005/070966, WO 2006/107786A WO 2006/107617A и WO 2007/046893). Публикации РСТ № WO 2013/174873, WO 2011/133886 и WO 2010/136172 описывают триспецифическое антитело, в котором домены CL и CH1 были перемещены из соответствующих природных положений, и домены VL и VH были изменены (публикации РСТ № WO 2008/027236; WO 2010/108127) таким образом, чтобы обеспечить возможность связывания указанного антитела с более чем одним антигеном. В публикациях РСТ № WO 2013/163427 и WO 2013/119903 раскрыта модификация домена CH2 для обеспечения содержания аддукта слитого белка, содержащего связывающий домен. В публикациях РСТ № WO 2010/028797, WO2010028796 и WO 2010/028795 раскрыты рекомбинантные антитела, Fc-области которых были заменены на дополнительные VL- и VH-домены таким образом, чтобы образовывались трехвалентные связывающие молекулы. В публикациях РСТ № WO 2003/025018 и WO2003012069 раскрыты рекомбинантные диатела, отдельные цепи которых содержат домены scFv. В публикации заявки РСТ № WO 2013/006544 раскрыты поливалентные Fab-молекулы, которые синтезируют в виде одной полипептидной цепи и затем подвергают протеолизу с получением гетеродимерных структур. В публикациях РСТ № WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 и WO 1991/003493 раскрыто добавление дополнительных связывающих доменов или функциональных групп к антителу или части антитела (*например*, добавление диатела к легкой цепи антитела, или добавление дополнительных доменов VL и VH к легкой и тяжелой цепям

антитела, или добавление гетерологичного слитого белка, или связывание нескольких доменов Fab друг с другом). Ковалентно связанные диатела и тривалентные молекулы, содержащие диатело-подобные домены, описаны в публикациях РСТ № WO 2015/184207, WO 2015/184203, WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538 и WO 2006/113665 и предложены в настоящей заявке. Соответственно, в частности, предполагается, что PD-1 x LAG-3 бтспецифические молекулы согласно настоящему изобретению могут иметь структуру любого из вышеописанных форматов и могут быть получены любым из вышеописанных способов.

2. Биспецифические диатела

[00113] Диатела согласно настоящему изобретению являются стабильными, ковалентно связанными гетеродимерными немоноспецифическими диателами, см., например, Chichili, G.R. *et al.* (2015) “*A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Non-human Primates,*” *Sci. Transl. Med.* 7(289): 289ra82; Veri, M.C. *et al.* (2010) “*Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIB (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold,*” *Arthritis Rheum.* 62(7): 1933-1943; Moore, P.A. *et al.* (2011) “*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T cell Killing Of B-Cell Lymphoma,*” *Blood* 117(17): 4542-4551; Публикации патентов США No. 2007/0004909; 2009/0060910; 2010/0174053; 20130295121; 2014/0099318; 2015/0175697; 2016/0017038; 2016/0194396; 2016/0200827; и 2017/0247452. Такие диатела содержат две или более полипептидных цепей, образующих ковалентные комплексы, и содержат один или более остатков цистеина, встроенных в каждый из используемых видов полипептидов. Например, было показано, что добавление остатка цистеина к С-концу таких конструкций обеспечивает возможность образования дисульфидных связей между полипептидными цепями, стабилизирующих полученный гетеродимер без влияния на характеристики связывания бивалентной молекулы. Такие диатела также содержат домен, который служит для обеспечения гетеродимеризации («способствующий гетеродимеризации домен») полипептидных цепей.

[00114] Конструкции диатела согласно настоящему изобретению представляют собой ковалентно объединенные диатела, состоящие из полипептидов, и могут состоять из двух, трех, четырех или более чем четырех полипептидных цепей. В контексте

настоящей заявки термин «**состоящий из**» является неограничивающим, таким образом, что диатело согласно настоящему изобретению, состоящее из двух полипептидных цепей, может содержать дополнительные полипептидные цепи. Такие цепи могут иметь такую же последовательность, что и другая полипептидная цепь диатела, или могут отличаться по последовательности от любой другой полипептидной цепи диатела. Диатела согласно настоящему изобретению могут быть сконструированы таким образом, что они содержат Fc-домены.

[00115] Согласно некоторым вариантам реализации диатело согласно настоящему изобретению представляет собой четырехцепочечное содержащее Fc-домен диатело, которое содержит два сайта связывания, специфичных в отношении первого эпитопа, два сайта связывания, специфичных в отношении второго эпитопа, Fc-домен и цистеинсодержащие E/K-спиральные домены, способствующие образованию гетеродимера. Общая структура таких диател представлена на **Фигуре 1**.

[00116] Биспецифические диатела согласно настоящему изобретению сконструированы таким образом, что такие первый и второй полипептиды ковалентно связываются друг с другом через остатки цистеина по всей длине. Такие остатки цистеина могут быть включены в промежуточный линкер (**линкер 1**; *например* , GGGSGGGG (**SEQ ID NO:21**)), который разделяет домены VL и VH полипептидов. В качестве альтернативы и более предпочтительно, второй пептид, содержащий остаток цистеина (**линкер 2**), вводят в каждую полипептидную цепь, например, в положении с N-конца к домену VL или с C-конца к домену VH такой полипептидной цепи. Предпочтительной последовательностью для такого **линкера 2** является **SEQ ID NO:22**: GGCGGG. Дополнительно или необязательно, остатки цистеина могут быть введены в другие домены, примеры которых представлены ниже.

[00117] Согласно некоторым вариантам реализации способствующие гетеродимеризации домены согласно настоящему изобретению содержат tandemно повторяющиеся спиральные домены противоположного заряда. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения одна из полипептидных цепей сконструирована таким образом, что она содержит домен «Е-спираль» (**SEQ ID NO:23**: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK), остатки которого образуют отрицательный заряд при pH 7, в то время как другая из двух полипептидных цепей сконструирована таким образом, что она содержит домен «К-спираль» (**SEQ ID NO:24**: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE), остатки которого образуют положительный заряд при pH 7. Присутствие таких заряженных доменов способствует связи между первым и вторым полипептидами и тем самым способствует гетеродимеризации. Не имеет значения, какая из спиралей находится в первой, а какая во второй полипептидной цепи.

[00118] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения используют способствующий гетеродимеризации домен, в котором один из четырех tandemных «Е-спиральных» спиральных доменов с последовательностью **SEQ ID NO:23** модифицирован таким образом, что он содержит остаток цистеина (*например*, EVAALCEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:25**). Аналогичным образом, согласно другому варианту реализации настоящего изобретения используется домен, способствующий гетеродимеризации, в котором один из четырех tandemных «К-спиральных» спиральных доменов с последовательностью **SEQ ID NO:24** модифицирован таким образом, что он содержит остаток цистеина (*например*, KVAALCKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:26**)). Такие варианты реализации настоящего изобретения преимущественно объединены таким образом, что используются домены, способствующие гетеродимеризации, с последовательностью **SEQ ID NO:25** и домены, способствующие гетеродимеризации, с последовательностью **SEQ ID NO:26**.

[00119] Таким образом, такие диатела сконструированы таким образом, что пары их полипептидных цепей ковалентно связываются друг с другом через один или более остатков цистеина, расположенных по всей длине, с образованием ковалентно связанного молекулярного комплекса. Такие остатки цистеина могут быть включены в промежуточный линкер, который разделяет домены VL и VH полипептидов. В качестве

альтернативы, один или более линкеров (*например*, линкер 2, линкер 3 и т. д.) могут содержать остаток цистеина. В конкретных вариантах реализации настоящего изобретения один или более спиральных доменов спираль-содержащего домена, способствующего гетеродимеризации, содержат аминокислотную замену, которая включает остаток цистеина, как в **SEQ ID NO:25** или **SEQ ID NO:26**. В качестве альтернативы, последовательность **линкера 2**, не содержащая остатков цистеина, представляет собой **SEQ ID NO:27: ASTKG**, и может быть использована с остатком цистеина, содержащим домены, способствующие гетеродимеризации.

[00120] Биспецифические диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно сконструированы таким образом, что они содержат домены IgG CH2-CH3, способные к комплексообразованию вместе с образованием Fc-области. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифические диатела согласно настоящему изобретению содержат домены CH2-CH3 IgG человека. Типичные домены CH2-CH3 человеческого IgG представлены выше и включают домены CH2-CH3, которые сконструированы для модулирования эффекторной функции и/или периода полужизни в сыворотке.

[00121] Согласно некоторым вариантам реализации биспецифические диатела согласно настоящему изобретению сконструированы с промежуточным линкерным пептидом (**линкер 3**), связывающим домены CH2 и CH3 с доменами, способствующими гетеродимеризации. Предпочтительно **линкер 3** находится в положении С-конца с доменом, способствующим гетеродимеризации. Линкеры, которые могут быть использованы в PD-1 и LAG-3 биспецифических диателах согласно настоящему изобретению, включают: GGGG (**SEQ ID NO:28**), LGGGSG (**SEQ ID NO:29**), ASTKG (**SEQ ID NO:27**), LEPKSS (**SEQ ID NO:30**), APSSS (**SEQ ID NO:31**), и APSSSPME (**SEQ ID NO:32**), GGC, и GGG. **Линкер 3** может содержать часть шарнирной области IgG отдельно или в дополнение к другим линкерным последовательностям. Типичные шарнирные области содержат: DKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:33**) или EPKSCDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:7**) из IgG1, ERKCCVECP (SEQ ID NO:8) из IgG2, ESKYGPPCPSCP (**SEQ ID NO:10**) из IgG4 и ESKYGPPCPPCP (**SEQ ID NO:11**) вариант шарнира IgG4, содержащий стабилизирующую замену S228P для уменьшения обмена цепей ((Lu *et al.*, (2008) “*The Effect Of A Point Mutation on The Stability of IgG4 As*

Monrolled by Analytical Ultracentrifugation,” J. Pharmaceutical Sciences 97: 960-969) для снижения частоты обмена цепей). Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения **линкер 3** может дополнительно содержать GGG, например, GGGDKTHTCPCP (SEQ ID NO:34).

II. Молекулы на основе антител, которые связываются с PD-1 (или PD-L1) и/или LAG-3

[00122] В настоящем изобретении, в частности, предложены композиции и способы, которые содержат или в которых используются:

- (1) PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула;
- (2)) моноспецифическая PD-1-связывающая молекула и моноспецифическая LAG-3-связывающая молекула;
- (3) PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула; или
- (4)) моноспецифическая PD-L1-связывающая молекула и моноспецифическая LAG-3-связывающая молекула;

где такая моноспецифическая связывающая молекула представляет собой интактное антитело, и такая биспецифическая молекула представляет собой диатело или биспецифическое антитело.

[00123] Молекулы на основе антител, которые иммуноспецифично связываются с PD-1 человека (*например*, моноспецифические PD-1-связывающие молекулы или PD-1 x LAG-3 биспецифические молекулы), которые могут применяться в соответствии с настоящим изобретением, содержат по меньшей мере один эпитоп-связывающий домен, который иммуноспецифично связывается с эпитопом PD-1 (PD-1-связывающий домен).

[00124] Молекулы на основе антител, которые иммуноспецифично связываются с PD-L1 человека (*т.е.* моноспецифические PD-L1-связывающие молекулы или PD-L1 x LAG-3 биспецифические молекулы), которые могут применяться в соответствии с настоящим изобретением, содержат по меньшей мере один эпитоп-связывающий домен, который иммуноспецифично связывается с эпитопом PD-1 (PD-L1-связывающий домен).

[00125] Молекулы на основе антител, которые иммуноспецифично связываются с LAG-3 человека (*т.е.* моноспецифические LAG-3-связывающие молекулы, PD-1 x LAG-

3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифические молекулы), которые могут применяться в соответствии с настоящим изобретением, содержат по меньшей мере один эпитоп-связывающий домен, который иммуноспецифично связывается с эпитопом LAG-3 (LAG-3-связывающий домен).

[00126] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложены молекулы на основе антитела, которые содержат PD-1-связывающий домен, PD-L1-связывающий домен и/или LAG-3-связывающий домен, которые дополнительно содержат Fc-домен. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения Fc-домен таких молекул представляет собой Fc-домен IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа.

[00127] В настоящем изобретении предложены моноспецифические молекулы на основе антител, которые содержат PD-1-связывающий домен, PD-L1-связывающий домен или LAG-3-связывающий домен, содержащий вариантный Fc-домен, имеющий низкую активность ADCC или не имеющий активности ADCC. В настоящем изобретении также предусмотрены биспецифические молекулы на основе антител (*например*, диатела), которые содержат эпитоп-связывающие домены, которые являются иммуноспецифичными в отношении PD-1 и LAG-3, или являются иммуноспецифичными в отношении PD-L1 и LAG-3, которые содержат Fc-домен, имеющий низкую активность ADCC или не имеющий активности ADCC. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения такие молекулы содержат вариантный Fc-домен IgG1, содержащий замену в положении 234 на аланин и замену в положении 235 на аланин (234A, 235A), нумерация указана согласно индексу EU по системе Kabat. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения такие молекулы содержат Fc-домен IgG4 и необязательно содержат стабилизированную шарнирную область IgG4 (см., *например*, SEQ ID NO:11).

[00128] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекулы на основе антитела, которые содержат PD-1-связывающий домен, PD-L1-связывающий домен и/или LAG-3-связывающий домен, содержат вариант Fc-домена, содержащий одну или более мутаций, которые увеличивают время полужизни в сыворотке. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения такие молекулы содержат вариант Fc-домена, содержащий замену в положении 252 на

тирозин, 254 на треонин и 256 на глутамат (252Y, 254T и 256E), что причем нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.

[00129] В настоящего изобретении также предложены молекулы на основе антител, которые содержат PD-1-связывающий домен, PD-L1-связывающий домен и/или LAG-3-связывающий домен, которые дополнительно содержат Fc-домен, причем такой Fc-домен содержит:

- (а) одну или более мутаций, которые снижают или исключают ADCC; и/или
- (В) одну или более мутаций, которые увеличивают время полужизни в сыворотке.

[00130] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения молекулы на основе антитела, которые содержат PD-1-связывающий домен, PD-L1-связывающий домен и/или LAG-3-связывающий домен, содержат вариант Fc-домена IgG1, содержащий замены: L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:19**), где нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.

[00131] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения молекулы на основе антитела, которые содержат PD-1-связывающий домен, PD-L1-связывающий домен и/или LAG-3-связывающий домен, содержат вариант Fc-домена IgG4, содержащий замены: M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:20**), где нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.

A. PD-1-связывающие домены и молекулы

[00132] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения PD-1-связывающий домен содержит CDR доменов VL и VH с последовательностью **SEQ ID NO:35** и **SEQ ID NO:39**. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения PD-1-связывающий домен содержит гуманизированные домены VL и VH с последовательностями **SEQ ID NO:36** и **SEQ ID NO:39**.

[00133] Аминокислотная последовательность такого гуманизированного домена VL_{PD-1} представляет собой (**SEQ ID NO:35**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFLTITIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI K

[00134] CDR такого PD-1 VL представляют собой:

CDR_{L1} SEQ ID NO:36: RASESVDNYGMSFMN;

CDR_{L2} SEQ ID NO:37: AASNQGS; и

CDR_{L3} SEQ ID NO:38: QQSKEVPYT.

[00135] Аминокислотная последовательность такого гуманизированного домена VH_{PD-1} представляет собой (SEQ ID NO:39):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

[00136] CDR такого домена PD-1 VH представляют собой:

CDR_{H1} SEQ ID NO:40: SYWMN;

CDR_{H2} SEQ ID NO:41: VIHPDSETWL DQKFKD; и

CDR_{H3} SEQ ID NO:42: EHYGTSPFAY.

[00137] Альтернативные PD-1-связывающие домены и молекулы, содержащие их, известны и включают, но не ограничиваются указанными, такие, как представлены в **Таблице 1**, и которые могут в настоящей заявке обозначаться с помощью тривиального названия или обозначения МНН.

Таблица 1	
PD-1-связывающие домены/молекулы	
Обозначение	Ссылка(ссылки)
Балстилимаб (регистрационный номер CAS: 2148321-77-9, также известный как AGEN2034, разрабатываемый компанией Agenus)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемый МНН: Перечень 82, 33(3):611-612
Будигалимаб (регистрационный номер CAS: 2098225-93-3, также известный как ABBV-181, PR-1648817, разрабатываемый компанией Abbvie)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемый МНН: Перечень 81, 33(1): 56-57
Камрелизумаб (регистрационный номер CAS: 1798286-48-2, также известный как SHR-1210 и реализуемый в Китае под названием AiRuiKa™ компанией Shanghai Hengrui Pharmaceuticals)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2017, рекомендуемый МНН: Перечень 77, 31(1): 73-74
Цемиплимаб (регистрационный номер CAS: 1801342-60-8, также известный как REGN-2810, SAR-439684 и реализуемый под названием LIBTAYO® компанией Sanofi & Regeneron Pharmaceuticals,)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемый МНН: Перечень 81, 33(1): 57-58

Таблица 1 PD-1-связывающие домены/молекулы	
Обозначение	Ссылка(ссылки)
Цетрелимаб (регистрационный номер CAS: 2050478-92-5, также известный как JNJ-63723283, разрабатываемый компанией Janssen Biotech)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемый МНН: Перечень 80, 32(3): 436-437
Достарлимаб (регистрационный номер CAS: 2022215-59-2, также известный как ANB-011, TSR-042, разрабатываемый компанией Tesero)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемый МНН: Перечень 81, 33(1): 65-66
Эзабенлимаб (регистрационный номер CAS: 2249882-54-8, также известный как BI754091, разрабатываемый компанией Boehringer Ingelheim)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемый МНН: Перечень 122, 33(4):834-835
Лодаполимаб (регистрационный номер CAS: 2118349-31-6, также известный как LY3300054, разрабатываемый компанией Eli Lilly)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемый МНН: Перечень 121, 33(2): 287-288
Ниволумаб (регистрационный номер CAS:946414-94-4, также известный как 5C4, BMS-936558, ONO-4538, MDX-1106 и реализуемый под названием OPDIVO® компанией Bristol-Myers Squibb)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2013, рекомендуемый МНН: Перечень 69, 27(1):68-69
Пембролизумаб (ранее известный как ламбролизумаб), регистрационный номер CAS:1374853-91-4, также известный как МК-3475, SCH-900475 и реализуемый под названием KEYTRUDA® компанией Merck)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2014, рекомендуемый МНН: Перечень 75, 28(3):407
Пролголимаб (регистрационный номер CAS: 2093956-19-3, также известный как BCD-100, разрабатываемый компанией ЗАО «Биокад»)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемый МНН: Перечень 81, 33(1): 102-103
Ретифанлимаб (регистрационный номер CAS: 2079108-44-2, также известный как MGA012, INCMGA-00012, разрабатываемый компанией Incyte и MacroGenics)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемый МНН: Перечень 82, 33(1):611-612
Сасанлимаб (регистрационный номер CAS: 2206792-50-7, также известный как PF-06801591, mAb7, разрабатываемый компанией Pfizer)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемый МНН: Перечень 121, 33(2):330-331
Серплулимаб (регистрационный номер CAS: 2231029-82-4, также известный как HLX10, разрабатываемый компанией Henlix)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемый МНН: Перечень 121, 33(2):332-333
Синтилимаб (регистрационный номер CAS: 2072873-06-2, также известный как IBI-308, IBI308 и реализуемый в Китае под названием TYVYT® компанией Innovent Biologics и Eli Lilly.	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемый МНН: Перечень 81, 33(1):112-113

Таблица 1 PD-1-связывающие домены/молекулы	
Обозначение	Ссылка(ссылки)
Спартализумаб (регистрационный номер CAS: 1935694-88-4, также известное как NPVPDR001, NVS240118, PDR001, разрабатываемое компанией Novartis)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2018, рекомендуемое МНН: Перечень 79, 32(1): 161-162
Тислелизумаб (регистрационный номер CAS: 1858168-59-8, также известный как BGB-A317, разрабатываемый компанией Beigene)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2018, рекомендуемый МНН: Перечень 79, 32(1): 174-175
Торипалимаб (регистрационный номер CAS: 1924598-82-2, также известный как JS001, разрабатываемый компанией Shanghai Junshi Biosciences)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемый МНН: Перечень 81, 33(1): 124-125
PD1-17; PD1-28; PD1-33; PD1-35; и PD1-F2	US 7,488,802
17D8; 2D3; 4H1; 5C4; 4A11; 7D3; и 5F4	US 8,008,449
hPD-1.08A; hPD-1.09A; 109A; K09A; 409A; h409A11; h409A16; h409A17; кодон-оптимизированное 109A и кодон-оптимизированное 409A	US 8,354,509
1B8; 20B3.1; 7G3; 3H4; 2.3A9; 1G7; 1.8A10; 28.11; 6D10	US 8,168,757
1E3; 1E8 и 1H3	US 2014/0044738
9A2; 10B11; 6E9; APE1922; APE1923; APE1924; APE1950; APE1963; и APE2058	US 9,815,897
EH12.2H7	US 9,102,727
GA1; GA2; GB1; GB6; GH1; A2; C7; H7; SH-A4; SH-A9; RG1H10; RG1H11; RG2H7; RG2H10; RG3E12; RG4A6; RG5D9; RG1H10-H2A-22-1S; RG1H10-H2A-27-2S; RG1H10-3C; RG1H10-16C; RG1H10-17C; RG1H10-19C; RG1H10-21C; и RG1H10-23C2	US 2014/0356363
H1M7789N; H1M7799N; H1M7800N; H2M7780N; H2M7788N; H2M7790N; H2M7791N; H2M7794N; H2M7795N; H2M7796N; H2M7798N; H4H9019P; H4H7798N; H4xH9034P2; H4xH9035P2; H4xH9037P2; H4xH9045P2; H4xH9048P2; H4H9057P2; H4H9068P2; H4xH9119P2; H4xH9120P2; H4Xh9128p2; H4Xh9135p2; H4Xh9145p2; H4Xh8992p; H4Xh8999p; и H4Xh9008p;	US 2015/0203579
mAb1; mAb2; mAb3; mAb4; mAb7; mAb8; mAb9; mAb10; mAb11; mAb12; mAb13; mAb14; mAb15; и mAb16	US 2016/0159905
246A10; 244C8; 413D2; 393C5; 388D4; 413E1; 244C8-1; 244C8-2; 244C8-3; 388D4-1; 388D4-2; и 388D4-3	US 2016/0319019

Таблица 1 PD-1-связывающие домены/молекулы	
Обозначение	Ссылка(ссылки)
Mu317; mu326; 317-4B6; 326-4A3; 317-4B2; 317-4B5; 317-1; 326-3B1; 326-3G1; 326-1; 317-3A1; 317-3C1; 317-3E1; 317-3G1; 317-3H1; 317-3I1; 317-4B1; 317-4B3; 317-4B4; 317-4A2; 326-3A1; 326-3C1; 326-3D1; 326-3E1; 326-3F1; 326-3B N55D; 326-4A1; 326-4A2BGB-A317	US 8,735,553
22A5; 6E1; 10D1; 4C1; 7D3; 13F1; 14A6; 15H5; 5A8; 7A4 и их гуманизированные варианты	US 2017/267762
1E9; h1E9-1; h1E9-2; h1E9-4; h1E9-5; 4B10; h4B10-1; h4B10-2; h4B10-3; 1B10; 10B4; A09; C07; F09; G08; G10; H08; H09; и 1353-G10	US 2018/142022
M136-M13-MHC723; m136-M14-MHC724; m136-M19-MHC725; m245-M3-MHC728; m245-M5-MHC729; A1.0; A1.6; Ba2; Bb2/C1.1; и D4	US 2017/0044259
PD-1 mAb 1; PD-1 mAb 2; PD-1 mAb 3; PD-1 mAb 4; PD-1 mAb 5; PD-1 mAb 6; PD-1 mAb 7; PD-1 mAb 8; PD-1 mAb 9; PD-1 mAb 10; PD-1 mAb 11; PD-1 mAb 12; PD-1 mAb 13; PD-1 mAb 14; PD-1 mAb 15; и их гуманизированные варианты: hPD-1 mAb 2; hPD-1 mAb 7; hPD-1 mAb 9; hPD-1 mAb 15;	US 2017/019846
PD1B11; PD1B70; PD1B71; PD1B114 и их варианты с созревшей аффинностью: PD1B149; PD1B160; PD1B162; PD1B164; PD1B183; PD1B184; PD1B185; PD1B187; PD1B192; PD1B175; PD1B177; PD1B194; PD1B195; PD1B196; PD1B197; PD1B198; PD1B199; PD1B200; PD1B201	US 2017/079112
BAP049-hum01; BAP049-hum02; BAP049-hum03; BAP049-hum04; BAP049-hum05; BAP049-hum06; BAP049-hum07; BAP049-hum08; BAP049-hum09; BAP049-hum10; BAP049-hum11; BAP049-hum12; BAP049-hum13; BAP049-hum14; BAP049-hum15; BAP049-hum16; BAP049-Clone-A; BAP049-Clone-B; BAP049-Clone-C; BAP049-Clone-D; или BAP049-Clone-E; PDR-001	US 2018/0371093
AGEN-2034; AGEN-2034w; AGEN2033w; AGEN2046w; AGEN2047w; AGEN2001w; AGEN2002w; EPI1_pll_B03; EPI1_pll_B05; EPI1_pll_C02; EPI1_pll_C03	US 2017/081409

Таблица 1 PD-1-связывающие домены/молекулы	
Обозначение	Ссылка(ссылки)
m136-M13– MHC723; m136-M19– MHC725; m245-M3– MHC728; m245-M5– MHC729; m136-M14– MHC724 и гуманизированные варианты PD-1 A; PD-1 Ab; PD-1 Ae; PD-1 Af; PD-1 Ba; PD-1 Bb; PD-1 C; PD-1 Ca; PD-1 D; PD-1 1.0; PD-1 1.1; PD-1 1.2; PD-1 1.4; PD-1 1.5; PD-1 1.6; PD-1 1.7; PD-1 1.9; PD-1 1.10; PD-1 2; PD-1 4; CX188	US 2017/044259
244C8; 388D4; 413E1; 246A10; 413D2 и гуманизированные варианты D4-HC3+LC1; D4-HC1+LC3; D4-HC3+LC3; C8-HC1+LC1; C8-HC1+LC3; C8-HC2+LC1	US 10,239,942
PRS-332; VH, выбранная из идентификационных номеров последовательностей:59-84 и 112-117; и VL, выбранная из идентификационных номеров последовательностей:85-111 и 118-123	US 2019/010231
H005-1	US 2016/376367
BA08-1	US 2017/210806
R3A1; R3A2; R4B3; R3B7; R3D6; A2_#1; A2_#2	US 2018/244779
BY18.1	WO 2016/180034
Антитело А, Антитело В, Антитело С, Антитело D, Антитело Е, Антитело F, Антитело G, Антитело H, Антитело I; 11430	US 2017/0044260
SHB-128; SHB-152; SHB-168; SHB-617 и гуманизированный вариант SSI-361	US 2018/346569
E8-3; C2-3; E1-3; F3-3; H8-3; C10-2; G2-1; G3- 2; H2-1; H4-2; C8-1; G10-2; 135C12; 136B4; 139D6; 136E10; 122F10; 139D6; 137F2	US 9,982,052
AB12M3; AB12M4; AB12M5; AB12M6; AB12M7; AB12M8; AB12M9	US 2018/113258
1.7.3 hAb; 1.49.9 hAb; 1.103.11 hAb; 1.139.15 hAb; 1.153.7 hAb	US 2017/024515; US 2017/025051
949 и гуманизированные варианты, включая 949 VK1 gL9 gH8b	US 9,102,728
948 и гуманизированные варианты	US 8,993,731
STM-432	US 2019/077866

[00138] В частности, предполагается, что PD-1-связывающие молекулы, представленные в настоящей заявке, могут применяться непосредственно в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, или последовательности или полипептидные цепи могут использоваться при конструировании альтернативных PD-1-связывающих молекул или PD-1 x LAG-3 биспецифических молекул.

В. PD-L1-связывающие домены и молекулы

[00139] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения PD-L1-связывающий домен содержит CDR доменов VL и VH с последовательностями **SEQ ID NO:43** и **SEQ ID NO:47**. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения PD-L1-связывающий домен содержит гуманизированные домены VL и VH с последовательностями **SEQ ID NO:43** и **SEQ ID NO:47**.

[00140] Аминокислотная последовательность такого гуманизированного домена VL_{PD-L1} представляет собой (**SEQ ID NO:43**):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVITITCKASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYW
ASTRHTGVPS RFSGSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQ HYNTPLTFGQ
 GTKVEIK

[00141] CDR такого VL_{PD-L1} представляют собой:

CDR_{L1} **SEQ ID NO:44**: KASQDVNTAVA;

CDR_{L2} **SEQ ID NO:45**: WASTRHT; и

CDR_{L3} **SEQ ID NO:46**: QQHYNTPLT.

[00142] Аминокислотная последовательность такого гуманизированного домена VH_{PD-L1} представляет собой (**SEQ ID NO:47**):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYTMSWVRQA PGKGLEWVAY
ISIGGGTTYPDTVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLKTED TAVYYCARQG
LPYYFDYWGQ GTLVTVSS

[00143] CDR такого VH_{PD-L1} представляют собой:

CDR_{H1} **SEQ ID NO:48**: SYTM;

CDR_{H2} **SEQ ID NO:49**: YISIGGGTTYYPDTVK; и

CDR_{H3} **SEQ ID NO:50**: QGLPYYFDY.

[00144] Известны альтернативные PD-L1-связывающие домены и молекулы, их содержащие, которые включают, но не ограничиваются указанными, домены, которые представлены в **Таблице 2**, и которые могут упоминаться в настоящей заявке под тривиальным названием или обозначением МНН.

Таблица 2 PD-L1-связывающие молекулы	
Обозначение	Ссылка(ссылки)
Адебрелимаб (регистрационный номер CAS: 2247114-85-6, также известное как HTI-1088, SHR-1316, разрабатываемое компанией Hengrui Therapeutics)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемое МНН: Перечень 122, 33(4):804-805
Атезолизумаб (регистрационный номер CAS: 2118349-31-6, также известное как MPDL3280A, RG7446 и реализуемое под названием TECENTRIQ® компанией Genentech, Inc.)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2015, рекомендуемое МНН: Перечень 74, 29(3):387
Авелумаб (регистрационный номер CAS: 2118349-31-6, также известное как MSB-0010718C, MSB0010682, MSB0010718C и реализуемое под названием BAVENCIO® компанией EMD Serono)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2016, рекомендуемое МНН: Перечень 74, 30(1):100-101
Бинтрафуст альфа (регистрационный номер CAS: 1918149-01-5, бифункциональный слитый белок, имеющий 2 внеклеточных домена TGF-βRII («ловушка» TGF-β), слитый с моноклональным антителом IgG1 человека против PD-L1, также известное как M7824, разрабатываемое компанией Merck и GSK)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемое МНН: Перечень 81, 33(1):52-54
Козибелимаб (регистрационный номер CAS: 2216751-26-5, также известное как CK-301, разрабатываемое компанией Checkpoint Therapeutics)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемое МНН: Перечень 121, 33(2):258-259
Дурвалумаб (регистрационный номер CAS: 2118349-31-6, также известное как MEDI4736 и реализуемое под названием IMFINZI® компанией Astrazeneca)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2015, рекомендуемое МНН: Перечень 74, 29(3):393-394
Энвафолимаб (регистрационный номер CAS: 2102192-68-5, однодоменное антитело, также известное как KN-035, разрабатываемое компанией Alphamab Co.)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемое МНН: Перечень 82, 33(3):634-635
Манелимаб (регистрационный номер CAS: 2168561-26-8, также известное как BCD-135, разрабатываемое ЗАО «Биокад»)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемое МНН: Перечень 121, 33(2):289-290
Опуколимаб (регистрационный номер CAS: 2251771-79-4, также известное как HLX20, разрабатываемое компанией Henlix Biotech)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемое МНН: Перечень 122, 33(4):866-867
Пакмилимаб (регистрационный номер CAS: 2145091-51-4, PROBODY™, также известное как CX-072, разрабатываемое компанией CytomX Therapeutics)	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемое МНН: Перечень 121, 33(2):312-313
Сугемалимаб (регистрационный номер CAS: 2256084-03-2, также известное как CS-1001,	Информация ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемое МНН: Перечень 122, 33(4):892-893

Таблица 2 PD-L1-связывающие молекулы	
Обозначение	Ссылка(ссылки)
WBP-315, WBP 3155, разрабатываемое компанией CStone Pharmaceuticals)	
A09-188-1, а также варианты с созревшей аффинностью и оптимизированные варианты: A09-204-1, A09-211-1, A09-212-1, A09-213-1, A09-214-1, A09-215-1, A09-216-1, A09-219-1, A09-220-1, A09-221-1, A09-222-1, A09-223-1, A09-202-1, A09-248-2, A09-239-2, A09-240-2, A09-241-2, A09-242-2, A09-243-2, A09-244-2, A09-245-2, A09-246-2, A09-247-2	US 9,624,298
YW243.55.S70; 243.55.H1; 243.55.H12; 243.55.H37; 243.55.H70; 243.55.H89; 243.55.S1; 243.55.5; 243.55.8; 243.55.30; 243.55.34; 243.55.S37; 243.55.49; 243.55.51; 243.55.62; 243.55.84	US 8,217,149
2.9D10, 2.7A4, 2.14H9, 3.15G8, 2.20A8, 3.18G1, 2.7A4OPT или 2.14H9OPT	US 8,779,108B2
1B9.2E11.2, 4H1.G10.15, 1A8, 1E4, 8G2, 1D11, 3A2, 3B11, 3F4, 3H6, 4C1, 4E1, 5A6, 9C12, 1B4, 1B11, 1F6, 1H8, 1H12, 2D5, 2H11, 3D12, 4C8, 4C9, 5E10, 5H4, 5H5, 8A1, 9G9, 10A7 и 10H6	US 2015/0197571
1D05, 84G09, 411B08, 411C04, 411D07, 386H03, 386A03, 385F01, 413D08, 413G05, 413F09, 414B06	US 9,617,338
3G10,12A4,10A5, 5F8,10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4	US 9,273,135
A1, C2, C4, H12 и H12-GL	US 2017/0319690
Ab- 14, Ab-16, Ab-22, Ab-30, Ab-31, Ab-32, Ab-38, Ab-42, Ab-46, Ab-50, Ab-52, Ab-55, Ab-56 и Ab-65	US 9,828,434
R2κA3, R2κA4, R2κA6, R2κF4, R2κH5, R2κH6, R2κH3, sR3κA8, sR3κA9, sR3κB2, sR3κB5, tccR3KA8, tccR3KA11, tccR3KB7, tccR3KD9, tccKF10, tctR3KA4, tctR3KF8, R2λA7, R2λB12, R2λ12, sR3λD7, <i>sR3λE1</i> , tccAF8, tccAD7, tctR3λH4, KD-033 и другие	US 2016/340429
H2M8306N, H2M8307N, H2M8309N, H2M8310N, H2M8312N, H2M8314N, H2M8316N, H2M8317N, H2M8321N, H2M8323N, H2M8718N, H2M8718N2, and H2M8719N, H1H9323P, H1 H9327P, H1 H9329P, H1H9336P, H1H9344P2, 1H9345P2, H1H9351P2, H1H9354P2, H1 H9364P2, H1H9373P2, H1H9382P2, H1H9387P2 и H1H9396P2	US 9,938,345

Таблица 2 PD-L1-связывающие молекулы	
Обозначение	Ссылка(ссылки)
клон 8, клон 12, клон 16, клон 18, клон 60 и их оптимизированные варианты, включая: cl; dl; g7; h9; b10; E10; A05; C05; C10; D08; G09; G10; G12; E11; D01; H06; C5H9; C5B10; C5E10; G12H9; G12B10; G12E10;	US 2016/0311903
ВAP058 и его гуманизированные варианты, включая: ВAP058-hum01, ВAP058-hum02, ВAP058-hum03, ВAP058-hum04, ВAP058-hum05, ВAP058-hum06, ВAP058-hum07, ВAP058-hum08, ВAP058-hum09, ВAP058-hum10, ВAP058-hum11, ВAP058-hum12, ВAP058-hum13, ВAP058-hum14, ВAP058-hum15, ВAP058-hum16 и ВAP058-hum17; FAZ-053	US 9,988,452
Mu333, Mu277 и их гуманизированные варианты, включая: hu333-2B, hu333-3A2, hu333-3C2 и hu333-3H2	US 2018/215825
332M1 и его гуманизированные варианты, включая: 332M7, 332M72 и 332M8	US 2018/346571
PDL1.1; PDL1.2	US 8,741,295
13C5, 5G9, 5G11, 8C6, 7B4, 4D1, 4A8, 8H4, 8H3, 15F1 и их гуманизированные варианты, включая hu5G11; hu13C5;	US 2017/0204184
PDL1-56 dAb; Hu56V1; Hu56V2; Hu56V3; Hu56V4; Hu56V5 и KN035	US 2018/0291103
1.4.1, 1.14.4, 1.20.15 и 1.46.11	WO 2017/020858
CTI-07, CTI-09, CTI-48, CTI-49, CTI-50, CTI-76, CTI-77, CTI-78, CTI-57 или CTI-58	US 2018/0002424
92; 24D5; 29H1; 9 ₂₋₁ ; 9 ₂₋₂ ; 9 ₂₋₃ ; 9 ₂₋₄ ; 9 ₂₋₅ ; 9 ₂₋₆ ; 9 ₂₋₇ ; 9 ₂₋₈ ; 9 ₂₋₉ ; 9 ₂₋₁₀ ; 24D5-H; HRP00049; HRP-00052	US 2018/0334504
5F10; 9F6; 5C10 и их гуманизированные варианты, включая 5C10H1L1; 5C10H1L2; 5C10H2L1 и 5C10H2L2	US 2018/0305464
4B6, 26F5, 21F11, 23A11, 23F11 и 22C9; BM-GT, BM-ME, 4B6-H3L4, 4B6-H4L3, 23F11-H4L4, 23F11-H4L6, 23F11-H6L4, 23F11-H6L6, 23A11-H3L3, 23A11-H3L5, 23A11-H5L3 и 23A11-H5L5;	WO 2017/161976
3C5-2G12 и их гуманизированные варианты, включая h3C5H1-h3C5L1; h3C5H2- h3C5L2; h3C5H3- h3C5L2; h3C5H4-h3C5L2;	WO 2017/196867
29E.2A3 и 24F.10C12	US 8,552,154

Таблица 2 PD-L1-связывающие молекулы	
Обозначение	Ссылка(ссылки)
PD-L1 MAB-1, PD-L1 MAB-2, PD-L1 MAB-3 и их гуманизированные варианты, включая hPD-L1 MAB2, hPD-L1-MAB-3	WO 2020/041404

[00145] В частности, предполагается, что PD-L1-связывающие молекулы, представленные в настоящей заявке, могут применяться непосредственно в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, или последовательности или полипептидные цепи могут применяться при конструировании альтернативных PD-L1-связывающих молекул или PD-L1 x LAG-3 биспецифических молекул.

С. LAG-3-связывающие домены и молекулы

[00146] Согласно одному варианту реализации изобретения LAG-3-связывающий домен содержит CDR доменов VL и VH с последовательностями **SEQ ID NO:51** и **SEQ ID NO:55**. Согласно другому варианту реализации изобретения LAG-3-связывающий домен содержит гуманизированные домены VL и VH с последовательностями **SEQ ID NO:51** и **SEQ ID NO:55**.

[00147] Аминокислотная последовательность такого гуманизированного домена VL_{LAG-3} представляет собой (**SEQ ID NO:51**):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG
 GTKLEIK

[00148] CDR такого домена VL_{LAG-3} содержат:

CDR_{L1} **SEQ ID NO:52**: RASQDVSSVVA;

CDR_{L2} **SEQ ID NO:53**: SASRYT; и

CDR_{L3} **SEQ ID NO:54**: QQHYSTPWT.

[00149] Аминокислотная последовательность такого гуманизированного домена VH_{LAG-3} представляет собой (**SEQ ID NO:55**):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYNMDWVRQA PGQGLEWMGD
INPDNGVTIY NQKFEGRVTM TTDSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCAREA
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

[00150] CDR такого домена VH_{LAG-3} содержат:

CDR_{H1} SEQ ID NO:56: DYNMD;

CDR_{H2} SEQ ID NO:57: DINPDNGVTIYNQKFEG; и

CDR_{H3} SEQ ID NO:58: EADYFYFDY.

[00151] Известны альтернативные LAG-3-связывающие домены и молекулы, содержащие их, которые включают, но не ограничиваются указанными, такие, которые представлены в **Таблице 3**, и которые могут упоминаться в настоящей заявке под тривиальным названием или обозначением МНН.

Таблица 3 LAG-3-связывающие молекулы	
Обозначение	Ссылка(ссылки)
релатлимаб (регистрационный номер CAS: 1673516-98-7, также известный как BMS-986016, ONO-4482, разрабатываемый компанией Bristol-Myers Squibb)	Информация о препаратах ВОЗ (WHO Drug Information), 2019 г., рекомендуемый МНН: Список 81, 33(1):104-105
иерамилимаб (регистрационный номер CAS: 2137049-37-5, также известный как LAG-525, IMP-701, разрабатываемый компанией Novartis)	Информация о препаратах ВОЗ, 2018 г., предлагаемый МНН: Список 120, 32(4):601-602
энцелимаб (регистрационный номер CAS: 2173096-82-5, также известный как TSR-033, разрабатываемый компанией Anaptysbio/Tessero)	Информация о препаратах ВОЗ 2019, предлагаемый МНН: Список 121, 33(2):265-266
фианлимаб (регистрационный номер CAS: 2126132-98-5, также известный как REGN 3767, разрабатываемый компанией Regneron)	Информация о препаратах ВОЗ 2019, предлагаемый МНН: Список 121, 33(2):271-272
мавезелимаб (регистрационный номер CAS: 2231068-83-8, также известный как МК-4280, разрабатываемый компанией Merck)	Информация ВОЗ о лекарственных препаратах, 2019, рекомендуемое МНН: Перечень 121, 33(2):290-291

[00152] В частности, предполагается, что LAG-3-связывающие молекулы, представленные в настоящей заявке, могут применяться непосредственно в способах согласно настоящему изобретению, или последовательности или полипептидные цепи могут применяться при конструировании альтернативных LAG-3-связывающих молекул или биспецифических молекул PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3).

D. Биспецифические молекулы PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3)

[00153] Молекулы на основе антител, которые иммуноспецифически связываются как с PD-1 (или PD-L1) человека, так и с LAG-3 человека (*т.е.*, биспецифические молекулы PD-1 x LAG-3 или биспецифические молекулы PD-L1 x LAG-3), которые могут применяться в соответствии с настоящим изобретением, содержат по меньшей мере один эпитоп-связывающий домен, который иммуноспецифически связывает эпитоп PD-1 (или PD-L1), и по меньшей мере один эпитоп-связывающий домен, который иммуноспецифически связывает эпитоп LAG-3.

[00154] Согласно некоторым вариантам реализации изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифические молекулы согласно настоящему изобретению содержат:

- (I) PD-1-связывающий домен, содержащий домен VL (VL_{PD-1}), содержащий PD-1-специфичные домены CDR_L1 , CDR_L2 и CDR_L3 , и домен VH (VH_{PD-1}), содержащий PD-1-специфичные домены CDR_H1 , CDR_H2 и CDR_H3 ; и
- (II) LAG-3-связывающий домен, содержащий домен VL (VL_{LAG-3}), содержащий LAG-3-специфичные CDR_L1 , CDR_L2 и CDR_L3 , домены, и домен VH (VH_{LAG-3}), содержащий LAG-3-специфичные CDR_H1 , CDR_H2 и CDR_H3 , домены,

где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающие домены выбраны из доменов, приведенных в **Таблицах 1 и 3**.

[00155] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения PD-L1 x LAG-3 биспецифические молекулы согласно настоящему изобретению содержат:

- (I) PD-L1-связывающий домен, содержащий домен VL (VL_{PD-L1}), содержащий PD-L1-специфичные CDR_L1 , CDR_L2 и CDR_L3 , домены, и домен VH (VH_{PD-L1}), содержащий PD-L1-специфичные CDR_H1 , CDR_H2 и CDR_H3 домены; и
- (II) LAG-3-связывающий домен, содержащий домен VL (VL_{LAG-3}), содержащий LAG-3-специфичные CDR_L1 , CDR_L2 и CDR_L3 , домены, и домен VH (VH_{LAG-3}), содержащий LAG-3-специфичные CDR_H1 , CDR_H2 и CDR_H3 , домены,

где PD-L1-связывающий домен и LAG-3-связывающие домены выбраны из доменов, приведенных в **Таблицах 2 и 3**.

[00156] Один вариант реализации настоящего изобретения относится к PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифическим молекулам, которые содержат Fc-домен. Согласно одному из вариантов реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифические молекулы содержат Fc-домен, обладающий незначительной активностью ADCC или не обладающий активностью ADCC. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифические молекулы содержат Fc-домен, обладающий незначительной активностью ADCC или не обладающий активностью ADCC, и содержащий одну или более мутаций, которые увеличивают время полужизни в сыворотке.

[00157] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифические молекулы согласно настоящему изобретению представляют собой PD-1 x LAG-3 биспецифические диатела, предпочтительно четырехцепочечное, содержащее Fc-домен диатело, которое содержит два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, два сайта связывания, специфичных в отношении LAG-3, Fc-домен и цистеинсодержащие E/K-спиральные домены, стимулирующие образование гетеродимера. Общая структура типичных PD-1 x LAG-3 биспецифических диател представлена на **Фигуре 1**. Такие молекулы содержат домены VL и VH антитела, которое связывается с PD-1 (**VL_{PD-1}** и **VH_{PD-1}**, соответственно), а также домены VL и VH антитела, которое связывается с LAG-3 (**VL_{LAG-3}** и **VH_{LAG-3}**, соответственно). Таким образом, такие PD-1 x LAG-3 биспецифические диатела способны специфично связываться с эпитопом PD-1 и эпитопом LAG-3.

1. DART-I

[00158] «DART-I» (также известное как «MGD013» и теботелимаб) представляет собой типичную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу согласно изобретению. DART-I представляет собой биспецифическое четырехцепочечное содержащее Fc-домен диатело, которое содержит два сайта связывания, специфичных в отношении PD-1, два сайта связывания, специфичных в отношении LAG-3, вариант Fcдомена IgG4, сконструированного для увеличения времени полужизни, и цистеинсодержащие E/K-спиральные домены, способствующие образованию гетеродимера. DART-I содержит

четыре полипептидные цепи, имеющие аминокислотные последовательности, обобщенные в **таблице 4**. Аминокислотные последовательности описаны более подробно ниже.

Таблица 4 – последовательности (SEQ ID NOS) DART-I	
DART-I (теботелимаб)	Замещающие полипептиды (в направлении от N-конца к С-концу)
Первая и Третья полипептидные цепи SEQ ID NO:59	SEQ ID NO:51 SEQ ID NO:21 SEQ ID NO:39 SEQ ID NO:22 SEQ ID NO:25 SEQ ID NO:11 SEQ ID NO:20
Вторая и Четвертая Полипептидные Цепи SEQ ID NO:60	SEQ ID NO:35 SEQ ID NO:21 SEQ ID NO:55 SEQ ID NO:22 SEQ ID NO:26

[00159] Первая и третья полипептидные цепи DART-I содержат (в направлении от N-конца к С-концу): N-конец, домен VL моноклонального антитела, способный связываться с LAG-3 (VL_{LAG-3} **SEQ ID NO:51**); промежуточный линкерный пептид (**линкер 1**: GGGSGGGGGG (**SEQ ID NO: 21**)); домен VH моноклонального антитела, способный связываться с PD-1 (VH_{PD-1}) (**SEQ ID NO:39**); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (**линкер 2**: GGCGGG (**SEQ ID NO: 22**)); цистеинсодержащий стимулирующий образование гетеродимера (Е-спиральный) домен (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO: 25**)); промежуточный линкерный пептид (**линкер 3**), содержащий стабилизированную шарнирную область IgG4 (**SEQ ID NO:11**); вариант домена CH2-CH3 IgG4, содержащий замены M252Y/S254T/T254T/T256E и не содержащий С-концевой остаток (**SEQ ID NO:20**); и С-конец.

[00160] Аминокислотная последовательность первой и третьей полипептидных цепей DART-I представляет собой (**SEQ ID NO:59**):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWFTEGG

```

GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCAS GYSFTSYWMN
WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVTITVDKS TSTAYMELSS
LRSEDTAVYY CAREHYGTSP FAYWGQGLV TVSSGGCGGG EVAACEKEVA
ALEKEVAALE KEVAALEKES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT
LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG

```

[00161] Вторая и четвертая полипептидные цепи DART-I содержат, в направлении от N-конца к С-концу: N-конец, домен VL моноклонального антитела, способный связываться с PD-1 (VL_{PD-1}) (**SEQ ID NO:35**); промежуточный линкерный пептид (**линкер 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:21)**); домен VH моноклонального антитела, способный связываться с LAG-3 (VH_{LAG-3}) (**SEQ ID NO:55**); цистеинсодержащий промежуточный линкерный пептид (**линкер 2: GGC GGG (SEQ ID NO:22)**); цистеинсодержащий способствующий образованию гетеродимера (К-спиральный) домен (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:26**); и С-конец.

[00162] Аминокислотная последовательность второй и четвертой полипептидных цепей DART-I представляет собой (**SEQ ID NO:60**):

```

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTD
YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRVMT TDTSTSTAYM
ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGGQ TTLTVSSGGC GGGKVAACKE
KVAALKEKVA ALKEKVAALK E

```

[00163] Варианты DART-I могут быть легко получены путем включения альтернативных доменов VH/VL, промежуточных линкеров, Fc-доменов и/или путем введения одной или более аминокислотных замен, добавлений или делеций. Например, вариант Fc-домена IgG1, сконструированный для уменьшения/прекращения связывания FcγR и/или активности ADCC и для увеличения периода полужизни, легко генерируется путем включения доменов CH2 и CH3, содержащих замены L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO:19**) вместо **SEQ ID NO:20**. Линкер 3 такого варианта может содержать шарнир IgG1 (**SEQ ID NO:33**, **SEQ ID NO:35** или **SEQ ID NO:34**). Дополнительные линкеры и PD-1 x LAG-3 биспецифические диатела, которые могут применяться в способах согласно настоящему изобретению, раскрыты в

WO 2015/200119; и в WO 2017/019846 (см., в частности, «DART-A», «DART-B», «DART-C», «DART-D», «DART-E», «DART-F» и «DART-G», последовательности которых описаны в Таблице 14).

2. Дополнительные PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифические молекулы

[00164] Известны другие PD-1 x LAG3 биспецифические молекулы, которые могут применяться в способе согласно настоящему изобретению, и включают, но не ограничиваются указанными, молекулы, представленные в **Таблице 5** и дополнительно описанные ниже.

Таблица 5 PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифические молекулы	
Обозначение	Ссылка(ссылки)
PD-1 x LAG3 биспецифические молекулы, содержащие комбинацию заявленных последовательностей с идентификационными номерами: 5 и 4; 6 и 4; 3 и 4; 3 и 7; 3 и 8; 9 и 4; 10 и 4; 3 и 11; 3 и 12	WO 2017/025498
PD-L1 x LAG3 биспецифические молекулы, обозначенные: FS18-7-9/84G09; FS18-7-32/84G09; FS18-7-33/84G09; FS18-7-36/84G09; FS18-7-58/84G09; FS18-7-62/84G09; FS18-7-65/84G09; FS18-7-78/84G09; FS18-7-88/84G09; FS18-7-95/84G09	WO 2017/220569
PD-1 x LAG3 биспецифическая молекула, обозначенная 57E02x51A09-188001 mAbdAb; и множество PD-1 и LAG-3 эпитоп-связывающих доменов	WO 2018/083087
PD-1 x LAG3 биспецифические молекулы, содержащие комбинацию заявленных последовательностей с идентификационными номерами: 74 и 66; 61 и 75; 85 и 66; 61 и 86; 78 и 62; 65 и 79; 65 и 81; 78 и 79; 65 и 62; 61 и 66; 76 и 66; 61 и 77; 80 и 62; 65 и 81	WO 2018/134279
PD-1 x LAG3 биспецифические молекулы, обозначенные: 0799, 0927, 0222, 0224, 8970, 8984, 9010, 8310, 8311, 1252, 8312, 8313, 1088, 0918, 0725	WO 2018/185043
PD-1 x LAG3 биспецифические молекулы, обозначенные: A, B, C, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U,	WO 2018/217940
PD-1 x LAG3 биспецифические молекулы, обозначенные: 18ASS, 90ASU, 33ARK	WO 2019/148412

[00165] Слитые белки PD-1 x LAG3 биспецифическое антитело-мутеин липокалина раскрыты в WO 2017/025498 и WO 2018/134279. Примеры таких слитых белков антитело-мутеин липокалина включают анти-PD-1 антитела, имеющие мутеин липокалина, сконструированный таким образом, что он связывает LAG-3, генетически слитый с С-концом тяжелой цепи.

[00166] Слитые белки PD-1 x LAG-3 биспецифическое антитело-домен антитела (антитело-dAb) описаны в WO 2018/083087. Примеры таких слитых белков антитело-dAb включают анти-LAG-3 антитело, имеющее анти-PD-1 dAb, генетически слитый с С-концом тяжелой цепи. PD-1 x LAG-3 биспецифические антитела, содержащие обмен доменами CH1/Ck (отдельно или в комбинации с обменом VH/VL) и/или заряженные аминокислотные замены в интерфейсах CH1/CL, описаны в WO 2018/185043. Примеры таких биспецифических антител включают антитела с четырьмя полипептидными цепями, имеющие один PD-1-связывающий домен и один LAG-3-связывающий домен (антитело 1+1), содержащий crossFab (с обменом доменами VH/VL), и антитела с тремя полипептидными цепями, имеющие три различные полипептидные цепи, два PD-1-связывающих домена и два LAG-3-связывающих домена (антитело 2+2), содержащие два домена Fab, имеющие мутации в CH1/CK, и два домена crossFab, слитые на С-конце каждой тяжелой цепи.

[00167] PD-1 x LAG-3 биспецифические антитела, имеющие структуру Fab x scFvFc с тремя полипептидными цепями или структуру scFvFc x scFvFc с двумя полипептидными цепями, описаны в WO 2018/217944 и WO 2018/217940. Примеры таких биспецифических антител включают анти-PD1 scFvFc, спаренный с анти-LAG3 углублением scFvFc и анти-PD1 scFvFc, спаренный с половинным анти-LAG3 IgG (тяжелая цепь + легкая цепь).

[00168] В частности, предполагается, что PD-1 x LAG-3 биспецифические молекулы и PD-L1 x LAG-3 биспецифические молекулы, представленные в настоящей заявке, могут непосредственно применяться в способах согласно настоящему изобретению. Могут быть получены альтернативные PD-1 x LAG-3 биспецифические молекулы и PD-L1 x LAG-3 биспецифические молекулы, которые содержат 6 CDR (или домены VL и VH) любой из PD-1, PD-L1 и LAG-3-связывающих молекул, предложенных в настоящей заявке (см., например, SEQ ID NO:35-58 и Таблицы 1-5).

III. Молекулы на основе антител, которые связываются с ТА

[00169] Молекулы на основе антител, которые иммуноспецифично связываются с опухолевым антигеном (ТА) (*т.е.*, ТА-связывающие молекулы), которые могут применяться в соответствии с настоящим изобретением, содержат по меньшей мере один эпитоп-связывающий домен, который иммуноспецифично связывается с эпитопом такого ТА (ТА-связывающий домен).

[00170] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложены молекулы на основе антител, которые содержат ТА-связывающий домен, который дополнительно содержит Fc-домен. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения Fc-домен ТА-связывающих молекул представляет собой Fc-домен IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения Fc-домен молекул ТА представляет собой **ADCC-усиленный Fc-домен**.

[00171] Настоящее изобретение также охватывает ТА-связывающие молекулы, которые содержат Fc-домен, причем такой Fc-домен содержит:

- (а) одну или более мутаций и/или модификаций, которые усиливают ADCC; и/или
- (В) одну или более мутаций, которые увеличивают время полужизни в сыворотке.

[00172] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения ТА-связывающие молекулы содержат ADCC-усиленный Fc-домен FcMT1 (**SEQ ID NO:16**), ADCC-усиленный Fc-домен FcMT2 (**SEQ ID NO:17**), или ADCC-усиленный Fc-домен FcMT3 (**SEQ ID NO:18**).

A. Опухолевые антигены

[00173] Настоящее изобретение, в частности, предусматривает композиции и способы, которые включают или используют ТА-связывающую молекулу и:

- (1) PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу;
- (2) моноспецифическую PD-1-связывающую молекулу и моноспецифическую LAG-3-связывающую молекулу;
- (3) PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу; или

- (4) моноспецифическую PD-L1-связывающую молекулу и моноспецифическую LAG-3-связывающую молекулу,

где такая моноспецифическая связывающая молекула представляет собой интактное антитело, и такая биспецифическая молекула представляет собой диатело или биспецифическое антитело. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ТА-связывающая молекула содержит ADCC-усиленный Fc-домен.

[00174] Опухолевые антигены, которые могут быть связаны такими ТА-связывающими молекулами, включают, но не ограничиваются указанными, антигены, представленные в **Таблицах 6А-6В**, которые могут в настоящей заявке быть обозначены с помощью тривиального названия, краткого названия и/или названия гена.

Таблица 6А Опухолевые антигены		
Белковый опухолевый антиген	Название гена (генов)	Идентификационный номер UniProtKB
Альфа-N-ацетилгалактозаминид альфа-2,6-сиалилтрансфераза 6	ST6GALNAC6; CA19-9	Q969X2
5,6-Дигидроксииндол-2-карбоновая кислота оксидаза	TYRP1; gp75	P17643
Молекула адгезии активированных лейкоцитов	ALCAM; CD166	Q13740
Альфа-1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза	A4GNT	Q9UNA3
антиген меланомы B 1	BAGE; CT2.1	Q13072
Басигин	BSG; CD147	P35613
Альфа-цепь белка, ассоциированного с комплексом В-клеточных антигенных рецепторов	CD79A	P11912
Бета-цепь белка, ассоциированного с комплексом В-клеточных антигенных рецепторов	CD79B	P40259
В-клеточный рецептор CD22	BL-CAM; CD22	P20273
антиген В-лимфоцитов CD19	CD19	P15391
антиген В-лимфоцитов CD20	MS4A1; CD20	P11836
Стромальный антиген костного мозга 2	BST2; CD317	Q10589
Антиген Campath-1	CD52	P31358
Карбоангидраза 14	CA14	Q9ULX7
Карбоксипептидаза М	CPM	P14384
Молекула клеточной адгезии, связанная с карциноэмбриональным антигеном 5	CEACAM5; CD66e	P06731

Таблица 6А
Опухолевые антигены

Белковый опухолевый антиген	Название гена (генов)	Идентификационный номер UniProtKB
Молекула клеточной адгезии, связанная с карциноэмбриональным антигеном 6	CEACAM6; CD66c	P40199
Катенин бета-1	CTNNB1; бета-катенин	P35222
Антиген CD27	CD27	P26842
Антиген CD276	CD276; B7-H3	Q5ZPR3
Лиганд CD40	CD40LG; CD154	P29965
Антиген А33 клеточной поверхности	GPA33	Q99795
Хондроитин-сульфат протеогликан 4	CSPG4	Q6UVK1
4С член семейства лектиновых доменов С-типа	CLEC4C; BDCA2; CD303	Q8WTT0
Циклин-зависимая киназа 4	CDK4	P11802
Цитотоксический белок Т-лимфоцитов 4	CTLA4	P16410
Белок 9, содержащий домен дезинтегрин и металлопротеиназы	ADAM-9	Q13443
Рецептор 2 эфрина типа А	EPHA2	P29317
Рецептор эпидермального фактора роста	EGFR; ERBB1; HER1	P00533
Молекула клеточной адгезии эпителия	EPCAM; CD326	P16422
G-антиген 1	GAGE1; CT4.1	Q13065
G-антиген 2А	GAGE2A	Q6NT46
G-антиген 2В/С	GAGE2B	Q13066
G-антиген 2D	GAGE2D	Q9UEU5
G-антиген 2Е	GAGE2E	Q4V326
G2/митотически-специфичный циклин В1	CCNB1	P14635
GDP-L-фукоза синтаза	TSTA3	Q13630
Глутамат-карбоксипептидаза 2	FOLH1; PSMA	Q04609
Гиалуронидаза-2	HYLA2; LUCA2	Q12891
Неактивный трансмембранный рецептор тирозин-протеинкиназы ROR1	ROR1, NTRKR1	Q01973
Интегрин альфа-Е	ITGAE; CD103	P38570
Интегрин бета-6	ITGB6	P18564
Субъединица альфа-2 рецептора интерлейкина-13 (субъединица CD123, рецептор интерлейкина-3)	IL13RA2; CD213a2	Q14627
Субъединица альфа рецептора интерлейкина-2	IL2RA CD25	P01589

Таблица 6А Опухолевые антигены		
Белковый опухолевый антиген	Название гена (генов)	Идентификационный номер UniProtKB
Соединительная адгезионная молекула С	JAM3	Q9BX67
Цитоскелетный кератин II типа 8	CK-8; KRT8	P05787
Лактадгерин	MFGE8	Q08431
Низкоаффинный рецептор иммуноглобулинаFc эпсилон	FCER2; CD23	P06734
Белок меланоцитов PMEL	PMEL; gp100	P40967
Антиген меланомы, распознаваемый Т-клетками 1	MLANA; MART1	Q16655
Меланома-ассоциированный антиген 1	MAGEA1; MAGE1	P43355
Меланома-ассоциированный антиген 3	MAGEA3; MAGE3	P43357
Меланотрансферрин	MELTF; MAAp97; CD228	P08582
Белок мембранного кофактора	CD46	P15529
Мезотелин	MSLN	Q13421
Муцин-1	MUC1; PEM	P15941
Муцин-16	MUC16; CA-125	Q8WXI7
Поверхностный антиген миелоидных клеток CD33	CD33	P20138
Адгезивная молекула нервных клеток 1	NCAM1; CD56	P13591
Онкостатин-М	OSM	P13725
Субъединица бета рецептора, специфичного к онкостатину-М	OSMR; IL31RB	Q99650
Гликопротеин тромбоцитов 4	CD36	P16671
Лиганд 1 белка программируемой клеточной смерти 1	CD274	Q9NZQ7
Рецептор прозапозина GPR37	GPR37	O15354
Простат-специфичный антиген	KLK3; PSA	P07288
Простатическая кислая фосфатаза	ACPP	P15309
Белок PML	PML; TRIM19; Myl	P29590
Фактор репарации ДНК 3А, содержащий домен PWWP	PWWP3A; MUM1	Q2TAK8
Рецепторная тирозин-протеинкиназа erbB-2	ERBB2; HER2; CD340	P04626
Рецепторная тирозин-протеинкиназа erbB-3	ERBB3; HER3	P21860
Рецепторная тирозин-протеинкиназа erbB-4	ERBB4; HER4	Q15303
Тирозиновая протеинфосфатаза С рецепторного типа	PTPRC; CD45	P08575

Таблица 6А Опухолевые антигены		
Белковый опухолевый антиген	Название гена (генов)	Идентификационный номер UniProtKB
Поверхностный гликопротеин CD5 Т-клеток	CD5	P06127
Специфический поверхностный гликопротеин CD28 Т-клеток	CD28	P10747
Белок 1 рецептора трансферрина	TFRC; CD71	P02786
Трансмембранный белок 1 семейства 4 L6	TM4SF1; TAAL6	P30408
Трофобластный гликопротеин	TPBG; 5T4	Q13641
Представитель суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 10В	TNFRSF10B; DR5; CD262	O14763
Представитель суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 1А	TNFRSF1A; TNFR1; CD120a	P19438
Представитель суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 1В	TNFRSF1B; TNFR2; CD120b	P20333
Представитель суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 3	LTBR; TNFR3	P36941
Представитель суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 5	CD40	P25942
Представитель суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли 6	TNFR6; Apo-1; Fas; CD95	P25445
Убиквитин-конъюгирующий фермент E2 К	UBE2K	P61086
Убиквитин-белковая лигаза E3А	UBE3A	Q05086
Фактор роста эндотелия сосудов А	VEGFA	P15692
Фактор роста эндотелия сосудов В	VEGFB	P49765
Рецептор 1 фактора роста эндотелия сосудов	FLT1; VEGFR1	P17948
Рецептор 2 фактора роста эндотелия сосудов	KDR; VEGFR2; CD309	P35968
Рецептор 3 фактора роста эндотелия сосудов	FLT4; VEGFR3	P35916
Белок «цинковый палец» 354С	ZNF354C; KID3	Q86Y25

Таблица 6В Опухолевые антигены	
Опухолевый антиген	Упоминание(я)
3-фукозил-N-ацетиллактозамин	Gooi, H.C. (1983), « <i>Marker Of Peripheral Blood Granulocytes And Monocytes Of Man Recognized By Two Monoclonal Antibodies VEP8 And VEP9 Involves The Trisaccharide 3-Fucosyl-N-Acetylactosamine,</i> » Eur. J. Immuno. 13(4):306-12.
Антиген группы крови А	Gooi, H.C., et al. (1983) « <i>Monoclonal Antibody Reactive With The Human Epidermal Growth Factor Receptor Recognifies The Blood Group A Antigen,</i> » Biosci. Rep. 3(11):1045-52.
Дифукозильная цепь 1 типа (ALeb) Дифукозильная цепь типа 2 (ALey)	Dohi, T. et al. (1989) « <i>Immunohistochemical Study Of Carbohydrate Antigen Expression In Gastric Carcinoma,</i> » Gastroenterol Jpn. 24(3): 239-45; Yazawa, S. et al. (1993), « <i>Aberrant alpha1→2 Fucosyltransferases Found in Human Colorectal Carcinoma Involved in the Accumulation of Leb and Y Antigens in Colorectal Tumors,</i> » Jpn. J. Cancer Res. 84:989-995
Ганглиозидный антиген 4.2	Nudelman, E. et al. (1982) « <i>Characterization Of A Human Melanoma-Associated Ganglioside Antigen Defined By Monoclonal Antibody, 4.2,</i> » J. Biol. Chem. 257(21): 12752-6.
Ганглиозидный антиген D1.1	Levine, J.M., et al. (1984) « <i>The D1.1 Antigen: A Cell-Surface Marker For Germinal Cells Of the Central Nervous System,</i> » J. Neurosci. 4(3):820-31.
Ганглиозиды GD2/GD3/GM2/GM3	Krengel, U. and Bousquet P.A. (2014), « <i>Molecular Recognition of Gangliosides and their Potential for Cancer Immunotherapies,</i> » Front. Immuno. 5(325):1-11.
Лактозилцерамид	Symington, F.W. (1984) « <i>Monoclonal Antibody Specific for Lactosylceramide,</i> » J. Biol. Chem. 259(9):6008-6012.
Rh-антигены (D, C, c, E или e)	Avent, N.D. and Reid, M.E. (2000) « <i>The Rh Blood Group System: A Review,</i> » Blood 95:375-387.
Сиалил-Tn	Holmberg, L.A. (2001) « <i>Theratope Vaccine (STn-KLH),</i> » Expert Opin. Biol. Ther. 1(5):881-91.

В. ТА-связывающие домены и молекулы

[00175] В данной области техники известны множество ТА-связывающих молекул или он могут быть получены с использованием хорошо известных способов, включая способы, описанные в настоящей заявке. ТА-связывающие молекулы могут быть моноспецифическими или биспецифическими. Типичные ТА-связывающие молекулы, которые содержат ТА-связывающие домены, и последовательности или полипептидные

цепи которых, таким образом, могут применяться при конструировании или применяться в качестве ТА-связывающих молекул согласно настоящему изобретению (например, ADCC-Усиленные ТА-связывающие молекулы), перечислены в **таблице 7**. CDR, домены VH и VL для нескольких ТА-связывающих молекул представлены ниже.

Таблица 7 ТА-связывающие молекулы		
Название антитела	Опухолевый(ые) антиген(ы)	Применение в качестве терапевтической мишени
Абаговомаб	CA-125	Рак яичников
Адекатумумаб	EpCam	Рак предстательной и молочной железы
Афугузумаб	CD20	Лимфома
Алацизумаб	VEGFR2	Рак
Альтумомаб	CEA	Колоректальный рак
Аматуксимаб	Мезотелин	Рак
Анатумомаб мафенатокс	TAG-72	Немелкоклеточная карцинома легких
Анифролумаб	Рецептор интерферона A/B	Системная красная волчанка
Анрукинзумаб	IL-13	Рак
Аполизумаб	HLA-DR	Раковые заболевания системы крови
Арцитумомаб	CEA	Рак желудочно-кишечного тракта
Атинумаб	RTN4	Рак
Бектумомаб	CD22	Неходжкинская лимфома (обнаружение)
Белимумаб	BAFF	Неходжкинская лимфома
Бевацизумаб	VEGF-A	Метастатический рак, ретинопатия недоношенных
Биватузумаб	CD44 V6	Плоскоклеточная карцинома
Блинатумомаб	CD19	Рак
Брентуксимаб	CD30 (TNFRSF8)	Раковые заболевания системы крови
Кантузумаб	MUC1	Раковые заболевания
Кантузумаб мертансин	Mucin Canag	Колоректальный рак
Каплацизумаб	VWF	Раковые заболевания
Капромаб	Клетки карциномы предстательной железы	Рак предстательной железы (обнаружение)
Карлумаб	MCP-1	Показания к применению в онкологии/иммунопатологии
Катумаксомаб	EpCam, CD3	Рак яичников, злокачественные асциты, рак желудка
Цетуксимаб	EGFR	Метастатический колоректальный рак и рак головы и шеи

Таблица 7 ТА-связывающие молекулы		
Название антитела	Опухолевый(ые) антиген(ы)	Применение в качестве терапевтической мишени
Цитатузумаб	ЕpCam	Рак яичников и другие солидные опухоли
Циксутумумаб	Рецептор IGF-1	Солидные опухоли
Кливатузумаб	MUC1	Рак поджелудочной железы
Конатумумаб	TRAIL-R2	Рак
Дацетузумаб	CD40	Раковые заболевания системы крови
Далотузумаб	Рецептор инсулиноподобного фактора роста I	Рак
Даратумумаб	CD38	Рак
Демсизумаб	DLL4	Рак
Денинтузумаб	CD19	Острый лимфобластный лейкоз и В-клеточная неходжкинская лимфома
Детумомаб	Клетка В-лимфомы	Лимфома
Дрозитумаб	DR5	Рак
Дулиготумаб	HER3	Рак
Дузигитумаб	ILGF2	Рак
Экроексимаб	Ганглиозид GD3	Злокачественная меланома
Эдреколомаб	ЕpCam	Колоректальная карцинома
Элотузумаб	SLAMF7	Множественная миелома
Элсилимомаб	ИЛ-6	Рак
Энаватузумаб	Рецептор TWEAK	Рак
Энлимомаб	ICAM-1 (CD54)	Рак
Энотикумаб	DLL4	Рак
Энситуksимаб	5AC	Рак
Эпитумомаб цитуксетан	Эписиалин	Рак
Эпратузумаб	CD22	Раковые заболевания, СКВ (системная красная волчанка)
Эртумаксомаб	HER2, CD3	Рак молочной железы
Этарацизумаб	Интегрин $\alpha_v\beta_3$	Меланома, рак предстательной железы, рак яичников
Фаралимомаб	Рецептор интерферона	Рак
Фарлетузумаб	Рецептор фолиевой кислоты 1	Рак яичников
Фасинумаб	HNGF	Рак
Fbta05 (Bi20)	CD20	Хронический лимфоцитарный лейкоз
Фиклатузумаб	HGF	Рак
Фигитумумаб	Рецептор IGF-1	Адренокортикальная карцинома, немелкоклеточная карцинома легких

Таблица 7 ТА-связывающие молекулы		
Название антитела	Опухолевый(ые) антиген(ы)	Применение в качестве терапевтической мишени
Фланвотумаб	TYRP1 (гликопротеин 75)	Меланома
Флотетузумаб	CD123	Острый миелоидный лейкоз
Фрезолимумаб	TGF-B	Рак
Футуксимаб	EGFR	Рак
Галиксимаб	CD80	В-клеточная лимфома
Ганитумаб	IGF-I	Рак
Гемтузумаб озогамицин	CD33	Острый миелогенный лейкоз
Гирентуксимаб	Карбоангидраза 9 (CA-IX)	Светлоклеточная почечно-клеточная карцинома
Глембатумумаб ведотин	GPNMB	Меланома, рак молочной железы
Ибритумомаб тиуксетан	CD20	Неходжкинская лимфома
Икрукумаб	VEGFR-1	Рак
Имгатузумаб	EGFR	Рак
Инклакумаб	Селектин Р	Рак
Индатуксимаб равтансин	SDC1	Рак
Инотузумаб озогамицин	CD22	Рак
Интетумумаб	CD51	Солидные опухоли (рак предстательной железы, меланома)
Ипилимумаб	CD152	Меланома
Иратумумаб	CD30 (TNFRSF8)	Лимфома Ходжкина
Итолизумаб	CD6	Рак
Лабетузумаб	CEA	Колоректальный рак
Лампализумаб	CFD	Рак
Лебрикизумаб	ИЛ-13	Лимфома Ходжкина
Лексатумумаб	TRAIL-R2	Рак
Лигелизумаб	IGHE	Рак
Линтузумаб	CD33	Рак
Лирилумаб	KIR2D	Рак
Лорвотузумаб	CD56	Рак
Лукатумумаб	CD40	Множественная миелома, неходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина
Лумиликсимаб	CD23	Хронический лимфоцитарный лейкоз
Мапатумумаб	TRAIL-R1	Рак
Матузумаб	EGFR	Колоректальный рак, рак легких и рак желудка

Таблица 7 ТА-связывающие молекулы		
Название антитела	Опухолевый(ые) антиген(ы)	Применение в качестве терапевтической мишени
Милатузумаб	CD74	Множественная миелома и другие злокачественные заболевания системы крови
Минретумомаб	TAG-72	Рак
Мирзотамаб клезутоклакс	B7-H3	Рак
Митумомаб	Ганглиозид GD3	Мелкоклеточная карцинома легких
Могамулизумаб	CCR4	Рак
Моролимумаб	Резус-фактор	Рак
Моксетумумаб пасудотокс	CD22	Рак
Наколомаб тафенатокс	Антиген C242	Колоректальный рак
Намилумаб	CSF2	Рак
Наптумомаб эстафенатокс	5T4	Немелкоклеточная карцинома легких, почечно-клеточная карцинома
Нарнатумаб	RON	Рак
Накситамаб	GD2	Нейробластома, остеосаркома
Нецитумумаб	EGFR	Немелкоклеточная карцинома легких
Нерелимомаб	TNF-A	Рак
Несвакумаб	Ангиопозтин 2	Рак
Нимотузумаб	EGFR	Плоскоклеточная карцинома, рак головы и шеи, рак носоглотки, глиома
Нофетумомаб мерпентан	Не установлено	Рак
Окаратузумаб	CD20	Рак
Офатумумаб	CD20	Хронический лимфоцитарный лейкоз
Оларатумаб	PDGF-R A	Рак
Олокизумаб	ИЛ-6	Рак
Омбуртамаб	B7-H3	Нейробластома, саркома, метастатический рак головного мозга
Онартузумаб	Киназа рецептора рассеивающего фактора человека	Рак
Онтуксизумаб	TEM1	Рак
Опортузумаб монатокс	EpCam	Рак
Ореговомаб	CA-125	Рак яичников

Таблица 7 ТА-связывающие молекулы		
Название антитела	Опухолевый(ые) антиген(ы)	Применение в качестве терапевтической мишени
Ортикумаб	Oxldl	Рак
Отлртузумаб	CD37	Рак
Панитумумаб	EGFR	Колоректальный рак
ПанкоМаб	Опухоль-специфичное гликозилирование MUC1	Рак яичников
Парсатузумаб	EGFL7	Рак
Патритумаб	HER3	Рак
Пемтумомаб	MUC1	Рак
Перакизумаб	IL-17A	Артрит
Пертузумаб	HER2	Рак
Пинатузумаб ведотин	CD22	Рак
Пинтумомаб	Антиген аденокарциномы	Аденокарцинома
Плакулумаб	ФНО человека	Рак
Полатузумаб ведотин	CD79B	Рак
Притоксаксимаб	Шига-токсин <i>E.Coli</i> типа 1	Рак
Притумумаб	Виментин	Рак головного мозга
Квилизумаб	IGHE	Рак
Ракотумомаб	N-гликолил-нейраминовая кислота	Рак
Радретумаб	экстра-домен-В фибронектина	Рак
Рамуцирумаб	VEGFR2	Солидные опухоли
Рилотумумаб	HGF	Солидные опухоли
Ритуксимаб	CD20	Лимфомы, лейкозы, некоторые аутоиммунные расстройства
Робатумумаб	Рецептор IGF-1	Рак
Роледумаб	RHD	Рак
Самализумаб	CD200	Рак
Сатумомаб пендетид	TAG-72	Рак
Серибантумаб	ERBB3	Рак
Сибротузумаб	FAP	Рак
Силтуксимаб	IL-6	Рак
Солитомаб	EpCam	Рак
Сонтузумаб	Эписиалин	Рак

Таблица 7 ТА-связывающие молекулы		
Название антитела	Опухолевый(ые) антиген(ы)	Применение в качестве терапевтической мишени
Табалумаб	BAFF	В-клеточные раковые заболевания
Такатузумаб тетраксетан	Альфа-фетопроtein	Рак
Таплитумомаб паптокс	CD19	Рак
Телимомаб	Не установлено	Рак
Тенатумомаб	Тенасцин С	Рак
Тенеликсимаб	CD40	Рак
Тепротумумаб	CD221	Опухоли системы крови
Тицилимумаб	CTLA-4	Рак
Тигатузумаб	TRAIL-R2	Рак
Тозитумомаб	CD20	Фолликулярная лимфома
Товетумаб	CD140a	Рак
Трастузумаб	HER2	Рак молочной железы
Trbs07 (Эктомаб)	Gd2	Меланома
Тремелимумаб	CTLA-4	Рак
Тукотузумаб целмолейкин	EpCam	Рак
Ублитуксимаб	MS4A1	Рак
Урелумаб	4-1BB	Рак
Вадастуксимаб	CD33	Острый миелоидный лейкоз
Вантиктумаб	Рецептор «frizzled»	Рак
Вапаликсимаб	AOC3 (VAP-1)	Рак
Вателизумаб	ITGA2	Рак
Велтузумаб	CD20	Неходжкинская лимфома
Весенкумаб	NRP1	Рак
Волоциксимаб	Интегрин A5β1	Солидные опухоли
Ворсетузумаб	CD70	Рак
Вотумумаб	Опухолевый антиген CTAA16.88	Колоректальные опухоли
Залутумумаб	EGFR	Плоскоклеточная карцинома головы и шеи
Затуксимаб	HER1	Рак
Зиралимумаб	CD147	Рак
Золбетуксимаб	Cldn18.2	Аденокарциномы желудочно-кишечного тракта и опухоль поджелудочной железы

[00176] Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к ТА-связывающим молекулам, которые содержат домены CDR (или домены VL и VH) любой из ТА-связывающих молекул, перечисленных в **Таблице 7**. Согласно

дополнительному варианту реализации в настоящем изобретении применяется любая из ТА-связывающих молекул, перечисленных в **Таблице 7**, или представленных ниже. Согласно альтернативному варианту реализации настоящее изобретение относится к ADCC-усиленным ТА-связывающим молекулам, которые содержат домены CDR (или домены VL и VH) любого из антител, перечисленных в **Таблице 7**. Конкретные примеры ADCC-усиленных ТА-связывающих молекул представлены ниже.

[00177] Согласно определенным вариантам реализации ТА-связывающая молекула связывает HER2 ТА («HER2-связывающая молекула»). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения HER2-связывающая молекула согласно настоящему изобретению представляет собой анти-HER2 антитело. Антитела, которые связывают HER2 человека, включают «**маргетуксимаб**», «**трастузумаб**» и «**пертузумаб**». Маргетуксимаб (также известный как MGAH22; регистрационный номер CAS 1350624-75-7, KEGG D10446, см., например, патент США № 8802093) представляет собой Fc-оптимизированное моноклональное антитело, которое связывается с HER2 и опосредует повышенную активность ADCC. Последовательность маргетуксимаба представлена ниже. Трастузумаб (также известный как *huMAB4D5* и реализуемый под товарным знаком ГЕРЦЕПТИН (HERCEPTIN®); регистрационный номер CAS 180288-69-1; см. патент США № 5821337) представляет собой гуманизированное антитело, имеющее константные области IgG1/каппа. Аминокислотную последовательность трастузумаба можно найти в источнике «Информационный сборник ВОЗ о лекарственных средствах, 2011», рекомендуемое МНН: Перечень 65, 25(1):89-90 для трастузумаба эмтанзина) Пертузумаб (также известный как *huMAB2C4* и реализуемый под названием ПЕРЬЕТА (Perjeta™); регистрационный номер CAS 380610-27-5; см., например, публикацию РСТ № WO 2001/000245) представляет собой другое гуманизированное антитело, имеющее константные области IgG1/каппа. Аминокислотная последовательность домена Fab пертузумаба доступна в банке белковых структур (идентификационный номер: 117i). Антитело «**8H11**» представляет собой мышинное анти-HER2 моноклональное антитело, которое связывает эпитоп HER2, который отличается от эпитопа, распознаваемого маргетуксимабом, трастузумабом и пертузумабом (публикация РСТ № WO 2001/036005). Известны гуманизированные варианты антитела **8H11** (обозначенные как «**hHER2 MAB-1**») (см., например, WO 2018/156740), и типичные гуманизированные домены VH и VL представлены ниже. В

дополнение к обозначенным выше HER2-связывающим молекулам в настоящем изобретении предполагается применение любой из следующих HER2-связывающих молекул: **1.44.1; 1.140; 1.43; 1.14.1; 1.100.1; 1.96; 1.18.1; 1.20; 1.39; 1.24; и 1.71.3** (раскрыты в патенте США № 8350011; 8858942; и публикации РСТ № WO 2008/019290); **F5 и C1** (раскрыты в патентах США № 7892554; 8173424; 8974792; и публикации РСТ № WO 99/55367); а также HER2-связывающие молекулы из патентной публикации США 2011/0097323, 2013/017114, 2014/0328836, 2016/0130360 и 2016/0257761 и патентной публикации РСТ WO2011/147986.

[00178] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ТА-связывающая молекула связывает В7-НЗ ТА («В7-НЗ-связывающая молекула»). Согласно одному из вариантов реализации В7-НЗ-связывающая молекула согласно настоящему изобретению представляет собой анти-В7-НЗ антитело. Антитела, которые связывают В7-НЗ человека, включают «эноблитузумаб» и «омбуртамаб» и «мирзотамаб». Эноблитузумаб (также известный как MGH22; регистрационный номер CAS 1350624-75-7, KEGG D11752, см., например, патент США № 8802093) представляет собой Fc-оптимизированное моноклональное антитело, которое связывается с HER2 и опосредует повышенную активность ADCC. Последовательность маргетуксимаба представлена ниже. Омбуртамаб (также известный как 8H9; регистрационный номер CAS 1895083-75-6, см., например, патент США № 7737258) представляет собой мышиное моноклональное антитело. Аминокислотную последовательность омбуртамаба можно найти в Информации ВОЗ о лекарственных средствах, 2018, рекомендуемое МНН: Перечень 119, 32(2):339-340). Гуманизированные версии 8H9 раскрыты в WO 2016/033225. Мирзотамаб клезутоклак (также известный как ABBV-155; регистрационный номер CAS 2229859-12-3, см., например, WO 2017/214322) представляет собой гуманизированное антитело, имеющее константные области IgG1/каппа. Аминокислотную последовательность мирзотамаба можно найти в Информации ВОЗ о лекарственных средствах, 2019, рекомендуемое МНН: Перечень 121, 33(2): 294-6). В дополнение к обозначенным выше В7-НЗ-связывающим молекулам в настоящем изобретении предполагается применение любой из следующих В7-НЗ-связывающих молекул: BRCA84D, BRCA69D и PRCA157 (раскрыты в WO2011109400); L7, L8, L11, M30 и M31 (раскрыты в US2013/0078234), hmAb-C и антитело В7-НЗ hmAb-D (раскрыты в WO 2017/180813).

С. ADCC-Усиленные ТА-связывающие молекулы

[00179] В настоящем изобретении, в частности, предложены композиции и способы, которые включают или используют маргетуксимаб и:

- (1) PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу;
- (2) моноспецифическую PD-1-связывающую молекулу и моноспецифическую LAG-3-связывающую молекулу;
- (3) PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу; или
- (4) моноспецифическую PD-L1-связывающую молекулу и моноспецифическую LAG-3-связывающую молекулу,

где такая моноспецифическая связывающая молекула представляет собой интактное антитело, и такая биспецифическая молекула представляет собой диатело или биспецифическое антитело.

1. Маргетуксимаб

[00180] Маргетуксимаб содержит вариант Fc-домена человека, который проявляет повышенную аффинность к рецептору CD16A. Легкая цепь антитела (IgG Карпа) модифицирована (N65S; дважды подчеркнуто ниже) путем удаления N-связанного сайта гликозилирования.

[00181] Домен VL маргетуксимаба имеет аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:61**:

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKKASQDVN TAWAWYQQKP GHSPKLLIYS
ASFRYTGVDPD RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTTPPTFGG
 GTKVEIK

[00182] Доменами CDR домена VL маргетуксимаба являются:

CDR_{L1} **SEQ ID NO:62**: KASQDVNTAVA

CDR_{L2} **SEQ ID NO:63**: SASFRYT и

CDR_{L3} **SEQ ID NO:64**: QQHYTTPPT.

[00183] Легкая цепь маргетуксимаба имеет аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:65**:

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAWAWYQQKP GHSPKLLIYS
 ASFRYTGVDPD RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQ HYTTPPTFGG
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEK

[00184] Домен VH маргетуксимаба имеет аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:66**:

QVQLQQSGPE LVKPGASLKL SCTASGFNIK DTYIHWVKQR PEQGLEWIGR
IYPTNGYTRY DPKFQDKATI TADTSSNTAY LQVSRLTSED TAVYYCSRWG
GDGFYAMDYW GQGASVTVSS

[00185] Доменами CDR домена VH маргетуксимаба являются:

CDR_{H1} **SEQ ID NO:67**: DTYIH

CDR_{H2} **SEQ ID NO:68**: RIYPTNGYTRYDPKFQD и

CDR_{H3} **SEQ ID NO:69** WGGDGFYAMDY.

[00186] Тяжелая цепь маргетуксимаба содержит **FcMT2 ADCC-усиленный Fc-домен** (содержащий замены L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L; подчеркнуто), имеющий аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:70**:

QVQLQQSGPE LVKPGASLKL SCTASGFNIK DTYIHWVKQR PEQGLEWIGR
 IYPTNGYTRY DPKFQDKATI TADTSSNTAY LQVSRLTSED TAVYYCSRWG
 GDGFYAMDYW GQGASVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
 DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPELVGG PSVFLPPKP
 KDTLMISRTP EVTCVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPPEEQYN
 STLRVVSFLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPLV
 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

[00187] Вариант тяжелой цепи маргетуксимаба содержит **FcMT1 ADCC-усиленный Fc-домен** (содержащий замены F243L, R292P, Y300L, V305I, и P396L; см. **SEQ ID NO:16**). Другой вариант тяжелой цепи маргетуксимаба содержит **FcMT3 ADCC-усиленный Fc-домен** (содержащий замены F243L, R292P и Y300L; см. **SEQ ID NO:18**).

[00188] В настоящем изобретении, в частности, предложены композиции и способы, которые включают или в которых используется эноблитузумаб и:

- (1) PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу;
- (2) моноспецифическую PD-1-связывающую молекулу и моноспецифическую LAG-3-связывающую молекулу;
- (3) PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу; или
- (4) моноспецифическая PD-L1-связывающая молекула и моноспецифическая LAG-3-связывающая молекула,

где такая моноспецифическая молекула на основе антитела представляет собой интактное антитело, и такая биспецифическая молекула на основе антитела представляет собой диатело или биспецифическое антитело.

2. Эноблитузумаб

[00189] Домен VL эноблитузумаба имеет аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:71**:

DIQLTQSPSF LSASVGDRVITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
 GTKLEIK

[00190] Доменами CDR домена VL эноблитузумаба являются:

CDR_{L1} **SEQ ID NO:72**: KASQNVDTNVA

CDR_{L2} **SEQ ID NO:73**: SASYRYS и

CDR_{L3} **SEQ ID NO:74**: QQYNNYPFT.

[00191] Легкая цепь эноблитузумаба имеет аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:75**:

DIQLTQSPSF LSASVGDRVITCKASQNVDTNVAWYQQKP GKAPKALIYS
 ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ
 GTKLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
 LSSPVTKSFN RGEC

[00192] Домен VH эноблитузумаба имеет аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:76**:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCGRGR
ENIYYGSRLD YWGQTTVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL
 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPVSSSLGT
 QTYICNVNHK PSNTKVDKRV

[00193] Доменами CDR домена VH эноблитузумаба являются:

CDR_{H1} **SEQ ID NO:77**: SFGMH

CDR_{H2} **SEQ ID NO:78**: YISSDSSAIYYADTVKG и

CDR_{H3} **SEQ ID NO:79**: GRENIYYGSRLDY

[00194] Тяжелая цепь эноблитузумаба содержит **ADCC-усиленный Fc-домен FcMT2** (содержащий замены L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L; подчеркнуто) и имеет аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:80**:

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCGRGR
ENIYYGSRLD YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL
VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT
QTYICNVNHK PSNTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCPAPELV GGPSVFLPP
KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPPEEQ
YNSTLRVVSV LTVLHQDWLN GKEYCKKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
LVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP
GK
```

[00195] Вариант тяжелой цепи эноблитузумаба содержит **ADCC-усиленный Fc-домен FcMT1** (содержащий замены F243L, R292P, Y300L, V305I, и P396L; см. **SEQ ID NO:16**). Другой вариант тяжелой цепи эноблитузумаба содержит **ADCC-усиленный Fc-домен FcMT3** (содержащий замены F243L, R292P и Y300L; см. **SEQ ID NO:18**).

3. Другие ADCC-Усиленные Fc ТА-связывающие молекулы

[00196] В настоящем изобретении, в частности, рассматриваются композиции и способы, которые включают или в которых используется ADCC-усиленная ТА-связывающая молекула и:

- (1) PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула;
- (2) моноспецифическую PD-1-связывающую молекулу и моноспецифическую LAG-3-связывающую молекулу;
- (3) PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу; или
- (4) моноспецифическая PD-L1-связывающая молекула и моноспецифическая LAG-3-связывающая молекула,

где такая моноспецифическая связывающая молекула представляет собой интактное антитело, и такая биспецифическая молекула представляет собой диатело или биспецифическое антитело.

[00197] Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к ADCC-усиленным ТА-связывающим молекулам, которые содержат ТА-связывающий

домен, который иммуноспецифично связывает любой из ТА, перечисленных в **Таблицах 6А-6В**.

[00198] Согласно одному варианту реализации настоящее изобретение относится к ADCC-усиленным ТА-связывающим молекулам, которые содержат домены CDR (или домены VL и VH) любого из антител, перечисленных в **Таблице 7**. Такие молекулы могут содержать **ADCC-усиленный Fc-домен**, как предложено в настоящей заявке, или как известно в данной области техники.

[00199] Настоящее изобретение в частности относится к композициям и способам, которые включают или в которых используются другие ТА-связывающие молекулы, которые содержат улучшенный **ADCC-усиленный Fc-домен**, включая, но не ограничиваясь указанными: Обинутузумаб (KEGG D0932; Marcus, R. et al. (2017) “*Obinutuzumab for the First-Line Treatment of Follicular Lymphoma*,” N. Engl. J. Med. 377(14): 1331-1344) и BAT4306F (Yu, J.-C. et al. (2018) “*Abstract 3823: Bat4306f, An Anti-CD20 Antibody Devoid Of Fucose Modification, Demonstrates Enhanced ADCC Effect And Potent In Vivo Efficacy*,” Cancer Res. 78:(13 Supplement):3823), которые представляют собой анти-CD20 антитела, амивантамаб, EGFR-сMET биспецифическое антитело (KEGG D11894; Yun, et al. (2020) “*Antitumor Activity of Amivantamab (JNJ-61186372), an EGFR-MET Bispecific Antibody, in Diverse Models of EGFR Exon 20 Insertion-Driven NSCLC*” Cancer Discovery DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-0116); и тафазитамаб (MOR208) (KEGG D11601; Kellner, C. et al. (2013) “*The Fc-Engineered CD19 Antibody MOR208 (Xmab5574) Induces Natural Killer Cell-Mediated Lysis Of Acute Lymphoblastic Leukemia Cells From Pediatric And Adult Patients*,” Leukemia 27(7):1595-1598) и обекселимаб (KEGG D11496), которые представляют собой анти-CD19 антитела.

IV. Способы получения

[00200] Молекулы на основе антител согласно изобретению могут быть получены рекомбинантно и экспрессированы с использованием любого способа, известного в данной области техники для получения рекомбинантных белков. Например, нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептидные цепи таких связывающих молекул, могут быть сконструированы, введены в экспрессионный вектор и экспрессированы в подходящих клетках-хозяевах. Связывающие молекулы могут быть рекомбинантно получены в бактериальных клетках (*например*, клетках *E. coli*) или эукариотических

клетках (*например*, клетках CHO, 293E, COS, NS0). Кроме того, связывающие молекулы могут экспрессироваться в дрожжевой клетке, такой как *Pichia* или *Saccharomyces*.

[00201] Для получения молекул на основе антител согласно изобретению можно сконструировать один или более полинуклеотидов, кодирующих молекулу, ввести в экспрессионный вектор и затем экспрессировать в подходящих клетках-хозяевах. Стандартные методики молекулярной биологии используются для получения рекомбинантного вектора экспрессии, трансфекции клеток-хозяев, отбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и выделения молекул (см., например, методики, описанные в Green, M.R. *et al.*, (2012), MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 4th Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY and Ausubel *et al.* eds., (1998,) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY). Вектор(ы) экспрессии должен иметь свойства, позволяющие реплицировать вектор в клетке-хозяине. Вектор также должен иметь промоторные и сигнальные последовательности, необходимые для экспрессии в клетках-хозяевах. Такие последовательности хорошо известны в области техники. В дополнение к последовательности (последовательностям) нуклеиновой кислоты, кодирующей такие связывающие молекулы, рекомбинантные векторы экспрессии могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (*например*, начало репликации) и селектируемые маркерные гены. Другой способ, который можно применять, представляет собой экспрессию последовательности гена в растениях (*например*, табаке) или трансгенном животном. Подходящие способы, пригодные для рекомбинантной экспрессии таких связывающих молекул в растениях или молоке, известны (см., например, Peeters *et al.* (2001) “*Production Of Antibodies and Antibody Fragments In Plants*,” Vaccine 19:2756; патент США № 5849992; и Pollock *et al.* (1999) “*Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies*,” J. Immunol Methods 231:147-157).

[00202] После рекомбинантной экспрессии молекулы на основе антитела согласно изобретению она может быть очищена изнутри или снаружи (*например*, из культуральной среды) клетки-хозяина с помощью любого способа, известного в данной области техники для очистки полипептидов или полипротеинов. Способы выделения и очистки, обычно применяемые для очистки антител (*например*, схемы очистки антител

на основе селективности антигенов), могут быть применены для выделения и очистки таких молекул и не ограничиваются каким-либо конкретным способом. Например, с помощью, колоночной хроматографии, фильтрации, ультрафильтрации, высаливания, осаждения растворителем, экстракции растворителем, дистилляции, иммунопреципитации, электрофореза в SDS-полиакриламидном геле, изоэлектрической фокусировки, диализа и рекристаллизации. Хроматография включает, *например*, ионообмен, аффинность, в частности, по аффинности к конкретному антигену (необязательно после отбора белка А, где молекула на основе антитела содержит Fc-область или ее часть, связывающую белок А), колоночную хроматографию по размеру, гидрофобную хроматографию, гель-фильтрацию, обращено-фазовую хроматографию и адсорбцию (Marshak *et al.* (1996) STRATEGIES FOR PROTEIN PURIFICATION AND CHARACTERIZATION: A LABORATORY COURSE MANUAL. (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

V. Фармацевтические композиции

[00203] Молекула на основе антитела согласно настоящему изобретению, например, антитело, которое связывает ТА (необязательно содержит ADCC-усиленный Fc-домен), антитело, которое связывает PD-1, антитело, которое связывает PD-L1, антитело, которое связывает LAG-3, PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула, может быть представлена в виде композиции. Композиции согласно настоящему изобретению включают нерасфасованные композиции лекарственных средств (*например*, неочищенные или нестерильные композиции), подходящие для получения фармацевтических композиций, которые подходят для введения субъекту (*например*, пациенту-человеку или другому млекопитающему) для лечения рака или других заболеваний и состояний. Такие фармацевтические композиции содержат одну или более молекул на основе антител (*например*, антитело, которое связывает ТА (необязательно содержащее ADCC-усиленный Fc-домен), антитело, которое связывает PD-1, антитело, которое связывает PD-L1, антитело, которое связывает LAG-3, PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу) и один или более фармацевтически приемлемых носителей и могут необязательно включать один или более дополнительных терапевтических агентов. Фармацевтические композиции могут быть предоставлены, например, в виде водного раствора, сухого лиофилизированного

порошка или безводного концентрата, специально адаптированного для восстановления с таким фармацевтически приемлемым носителем или восстановленного с таким носителем.

[00204] Используемый в настоящей заявке термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает разбавитель, растворитель, дисперсионную среду, антибактериальные и противогрибковые агенты, вспомогательное вещество или носитель, одобренные регулирующим федеральным или региональным органом власти, или приведенные в Фармакопее США или иной общепризнанной фармакопее как подходящие для введения животным, и, более конкретно, людям. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла углеводородного, животного, растительного или синтетического происхождения. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также могут применяться в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Композиция, если необходимо, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или буферизирующих агентов для поддержания pH. Такие композиции могут иметь форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пиллюль, капсул, порошков, составов с замедленным высвобождением и тому подобные.

[00205] Как правило, ингредиенты композиций согласно настоящему изобретению обеспечиваются либо отдельно, либо в виде смеси друг другом в дозированной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата, либо в виде водного раствора в герметично закрытой емкости, такой как флакон, ампула или саше, с указанием количества активного агента. В случае, если композицию предполагается вводить путем инфузии, ее можно дозировать с помощью инфузионного флакона, содержащего стерильную воду фармацевтической степени чистоты или солевой раствор. В случае, если композицию вводят путем инъекции, в комплект может входить ампула со стерильной водой для инъекций, физиологическим раствором или другим разбавителем, таким образом, что компоненты можно смешать перед введением.

VI. Фармацевтические наборы

[00206] В настоящем изобретении также предложены фармацевтические наборы, которые содержат одну или более емкостей, содержащих фармацевтическую

композицию согласно настоящему изобретению и инструктивный материал (*например*, уведомление, листок-вкладыш в упаковку, инструкцию *и т. д.*). Дополнительно в фармацевтический набор также могут быть включены один или более других профилактических или терапевтических агентов, подходящих для лечения заболевания. Емкости таких фармацевтических наборов могут, например, включать один или более герметично закупоренных флаконов, ампул, саше *и т. д.*, с указанием количества содержащегося в них активного агента. В случае, если композиция предназначена для введения путем инфузии, емкость может представлять собой инфузионный флакон, пакет *и т. д.*, содержащий стерильный раствор фармацевтической степени чистоты (*например*, воду, солевой раствор, буфер *и т. д.*). В случае, если композиция предназначена для введения путем инъекции, фармацевтический набор может содержать ампулу со стерильной водой, солевым раствором или другим разбавителем для инъекций таким образом, чтобы облегчить смешивание компонентов фармацевтического набора для введения субъекту (*например*, пациенту, представляющему собой человека или другому млекопитающему).

[00207] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция в таком наборе представлена в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закупоренной емкости и может быть разведена, *например*, в воде, солевом растворе или другом разбавителе до подходящей концентрации для введения субъекту. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция в таком наборе представлена в виде водного раствора в герметично закупоренной емкости и может быть разбавлена, *например*, водой, солевым раствором или другим разбавителем до подходящей концентрации для введения субъекту. Набор может дополнительно содержать один или более других профилактических и/или терапевтических агентов, подходящих для лечения рака, в одной или более емкостях, и/или набор может дополнительно содержать одно или более цитотоксических антител, которые связывают один или более раковых антигенов, связанных с раком. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения указанный другой профилактический или терапевтический агент является химиотерапевтическим. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения профилактический или терапевтический агент представляет собой биологический или гормональный терапевтический агент.

[00208] Инструктивный материал, входящий в состав фармацевтических наборов согласно настоящему изобретению, может, например, иметь содержание и формат, предписанные государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу лекарственных средств или биологических продуктов, и может означать одобрение таким органом производства, продажи или применения фармацевтической композиции для введения человеку и/или для лечения человека. Инструктивный материал может, например, представлять информацию, относящуюся к содержащейся дозе фармацевтической композиции, способам ее введения *и т. д.*

[00209] Так, например, в инструктивном материале, входящем в состав фармацевтических наборов согласно настоящему изобретению, может быть указано, что предложенную фармацевтическую композицию следует вводить в комбинации с дополнительным агентом, который может быть представлен в том же фармацевтическом наборе или в отдельном фармацевтическом наборе. Такой инструктивный материал может указывать на то, что предложенную фармацевтическую композицию следует вводить один раз приблизительно каждые 2 недели, один раз приблизительно каждые 3 недели или более или менее часто. Такой инструктивный материал может указывать на то, что предложенная фармацевтическая композиция содержит или должна быть восстановлена/разведена для введения фиксированной дозы, составляющей приблизительно 120 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 420 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 800 мг или приблизительно 840 мг или более, или для введения дозы, рассчитанной на основе массы тела, составляющей приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 18 мг/кг или более. Такой инструктивный материал может указывать на то, что предложенная фармацевтическая композиция содержит или должна быть восстановлена/разведена таким образом, что она будет содержать однократную дозу или более одной дозы (*например*, 2 дозы, 4 дозы, 6 доз, 12 доз, 24 дозы *и т. д.*). Такой инструктивный материал, входящий в состав фармацевтических наборов, может объединять любой набор такой информации (*например*, может быть указано, что предложенная фармацевтическая композиция, содержащая PD-1 x LAG-3 биспецифические молекулы, содержит или должна быть восстановлена/разбавлена таким образом, что она будет содержать дозу, составляющую

приблизительно 400 мг или приблизительно 600 мг, и что такую дозу следует вводить один раз приблизительно каждые 2 недели; может быть указано, что предложенная фармацевтическая композиция содержит или должна быть восстановлена таким образом, что она будет содержать дозу, составляющую приблизительно 600 мг или приблизительно 800 мг, и что такую дозу следует вводить один раз приблизительно каждые 3 недели; и *т. д.*, и/или может быть указано, что предложенная фармацевтическая композиция, содержащая HER2- или В7-Н3-связывающую молекулу, содержит или должна быть восстановлена таким образом, что она будет содержать дозу, составляющую приблизительно 15 мг/кг, и что такую дозу следует вводить один раз приблизительно каждые 3 недели; и *т. д.*). Такой инструктивный материал может содержать указания относительно способа введения указанной фармацевтической композиции, например, что ее следует вводить путем внутривенной (в/в) инфузии. Инструктивный материал, входящий в состав указанных фармацевтических наборов может содержать указания относительно продолжительности или времени такого введения, например, что указанная фармацевтическая композиция представляет собой композицию, которую следует вводить путем внутривенной (в/в) инфузии в течение периода времени, составляющего 30-240 минут, периода времени, составляющего 30-90 минут и *т. д.*

[00210] Инструктивный материал, входящий в состав фармацевтических наборов согласно настоящему изобретению, может содержать указания относительно подходящего или желаемого применения указанной фармацевтической композиции, например, указания о том, что такую фармацевтическую композицию (*например*, PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу) следует вводить для лечения рака. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в инструктивном материале, входящем в состав фармацевтических наборов, может быть указано, что фармацевтическую композицию(композиции) PD-1 (или PD-L1) -связывающей молекулы и LAG-3-связывающей молекулы или PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифической молекулы согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с ТА-связывающей молекулой (необязательно имеющей ADCC-усиленный Fc-домен) для лечения рака, экспрессирующего ТА (*например*, HER2 или В7-Н3). Виды рака, который можно лечить, включают, но не ограничиваются указанными: рак надпочечников, СПИД-ассоциированный рак, альвеолярную саркому мягких тканей, рак анального

канала (включая плоскоклеточную карциному анального канала (SCAC)), рак мочевого пузыря, рак кости, рак головного и спинного мозга, рак молочной железы (включая HER2⁺ рак молочной железы или тройной негативный рак молочной железы (TNBC)), опухоль каротидного тела, рак шейки матки (включая связанный с ВПЧ рак шейки матки), хондросаркому, хордому, хромофобную почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному, рак толстой кишки, колоректальный рак, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпендимому, рак эндометрия (включая неселективный рак эндометрия, рак эндометрия с высоким уровнем MSI, рак эндометрия с дефицитом репарации ошибок репликации (dMMR) и/или положительный рак эндометрия с мутацией в экзонуклеазном домене POLE), саркому Юинга, экстраклеточную миксоидную хондросаркому, рак желчного пузыря или желчного протока (включая холангиокарциному, рак желчных протоков), рак желудка, рак гастроэзофагеального перехода (GEJ), гестационное трофобластическое заболевание, эмбрионально-клеточную опухоль, глиобластому, рак головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN)), гематологическое злокачественное новообразование, гепатоцеллюлярную карциному, инсулиному, саркому Капоши, рак почки, лейкоз (включая острый миелоидный лейкоз), липосаркому/злокачественную липоматозную опухоль рак печени (включая гепатоцеллюлярную карциному (HCC)), лимфому (включая диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), неходжкинскую лимфому (NHL)), рак легких (включая мелкоклеточный рак легких (SCLC), немелкоклеточный рак легких (NSCLC)), медуллобластому, меланому (включая увеальную меланому), менингиому, карциному Меркеля, мезотелиому (включая мезотелиальный фарингеальный рак), множественную эндокринную неоплазию, множественную миелому, миелодиспластический синдром, нейробластому, нейроэндокринные опухоли, рак яичников, рак поджелудочной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, парашитовидную опухоль, рак детского возраста, опухоль оболочек периферических нервов, фарингеальный рак, феохромоцитому, опухоль гипофиза, рак предстательной железы (включая метастатический кастрационно-резистентный рак предстательной железы (mCRPC)), потерянную увеальную меланому, метастатический рак почек, рабдоидную опухоль, рабдомиосаркому, саркому, рак кожи, мелкокруглоклеточную опухоль с окрашиванием в синий цвет у детей (включая нейробластому и рабдомиосаркому), саркому мягких тканей, плоскоклеточный рак, рак желудка,

синовиальную саркому, тестикулярный рак, карциному тимуса, тимому, рак щитовидной железы и рак матки.

VII. Варианты применения молекул на основе антител согласно настоящему изобретению

[00211] Как предложено в настоящей заявке, PD-1 x LAG-3 биспецифические молекулы согласно настоящему изобретению можно применять для лечения или предотвращения различных расстройств, включая рак. Кроме того, PD-1-связывающие (или PD-L1-связывающие), LAG-3-связывающие, PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифические молекулы согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с ТА-связывающей молекулой согласно настоящему изобретению (необязательно имеющей ADCC-уиленный Fc-домен) для лечения рака, экспрессирующего такой ТА.

[00212] Соответственно, в настоящем изобретении предложены способы лечения рака, причем такие способы включают введение субъекту, нуждающемуся в этом, PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы.

[00213] Кроме того, в настоящем изобретении предложены способы лечения рака, включающие введение ТА-связывающей молекулы и:

- (1) PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу;
- (2) моноспецифической PD-1-связывающей молекулы в комбинации с моноспецифической LAG-3-связывающей молекулой;
- (3) PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу; или
- (4) моноспецифической PD-L1-связывающей молекулы в комбинации с моноспецифической LAG-3-связывающей молекулой,

где такая моноспецифическая связывающая молекула представляет собой интактное антитело, и такая биспецифическая молекула представляет собой диатело или биспецифическое антитело, причем такой рак экспрессирует такой ТА. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ТА-связывающая молекула содержит ADCC-усиленный Fc-домен.

[00214] В настоящей заявке предложены конкретные схемы дозирования для введения такой PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы или комбинаций молекул субъекту, нуждающемуся в этом.

[00215] Используемый в настоящей заявке термин «**в комбинации**» относится к применению более чем одного терапевтического агента (*например*, молекулы на основе антитела согласно настоящему изобретению). Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок, в котором отдельные терапевтические агенты следует вводить субъекту, имеющему заболевание или расстройство (*например*, пациенту-человеку или другому млекопитающему), а также не означает, что указанные агенты вводят или следует вводить точно в одно и то же время, скорее, это означает, что такие агенты вводят субъекту одновременно или последовательно в течение такого временного промежутка, что такие агенты обеспечивают повышенную эффективность по сравнению с эффективностью, обеспечиваемой при введении таких агентов иным образом. Например, каждую молекулу на основе антитела (*например*, ТА-связывающую молекулу, PD-1-связывающую молекулу (или PD-L1-связывающую молекулу) и LAG-3-связывающую молекулу; или ТА-связывающую молекулу и PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифическую молекулу) можно вводить одновременно или последовательно в любом порядке в разные моменты времени; однако, если их не вводят одновременно, их следует вводить достаточно близко по времени таким образом, чтобы обеспечить желаемый терапевтический или профилактический эффект. Каждый вводимый агент может быть введен отдельно, в любой подходящей форме и любым подходящим путем, *например*, один пероральным путем и один парентерально и так *далее*. В настоящей заявке предложены конкретные схемы дозирования для введения молекул на основе антител согласно настоящему изобретению нуждающемуся в этом субъекту.

[00216] Виды рака, которые можно лечить путем введения PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы; или ТА-связывающей молекулы и: PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифической молекулы; или PD-1-связывающей (или PD-L1-связывающей) молекулы в комбинации с LAG-3-связывающей молекулой, включают, но не ограничиваются указанными: рак надпочечников, СПИД-ассоциированный рак, альвеолярную саркому мягких тканей, рак анального канала (включая плоскоклеточную карциному анального канала (SCAC)), рак мочевого пузыря, рак кости, рак головного и

спинного мозга, рак молочной железы (включая HER2⁺ рак молочной железы или тройной негативный рак молочной железы (TNBC)), опухоль каротидного тела, рак шейки матки (включая связанный с ВПЧ рак шейки матки), хондросаркому, хордому, хромофобную почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному, рак толстой кишки, колоректальный рак, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпендимому, рак эндометрия (включая неселективный рак эндометрия, рак эндометрия с высоким уровнем MSI, рак эндометрия с дефицитом репарации ошибок репликации (dMMR) и/или положительный рак эндометрия с мутацией в экзонуклеазном домене POLE), саркому Юинга, экстраклеточную миксоидную хондросаркому, рак желчного пузыря или желчного протока (включая холангиокарциному, рак желчных протоков), рак желудка, рак гастроэзофагеального перехода (GEJ), гестационное трофобластическое заболевание, эмбрионально-клеточную опухоль, глиобластому, рак головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN)), гематологическое злокачественное новообразование, гепатоцеллюлярную карциному, инсулиному, саркому Капоши, рак почки, лейкоз (включая острый миелоидный лейкоз), липосаркому/злокачественную липоматозную опухоль, рак печени (включая гепатоцеллюлярную карциному (HCC)), лимфому (включая диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), неходжкинскую лимфому (NHL)), рак легких (включая мелкоклеточный рак легких (SCLC), немелкоклеточный рак легких (NSCLC)), медуллобластому, меланому (включая увеальную меланому), менингиому, карциному Меркеля, мезотелиому (включая мезотелиальный фарингеальный рак), множественную эндокринную неоплазию, множественную миелому, миелодиспластический синдром, нейробластому, нейроэндокринные опухоли, рак яичников, рак поджелудочной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, парашитовидную опухоль, рак детского возраста, опухоль оболочек периферических нервов, фарингеальный рак, феохромоцитому, опухоль гипофиза, рак предстательной железы (включая метастатический кастрационно-резистентный рак предстательной железы (mCRPC)), потериальную увеальную меланому, метастатический рак почек, рабдоидную опухоль, рабдомиосаркому, саркому, рак кожи, мелкокруглоклеточную опухоль с окрашиванием в синий цвет у детей (включая нейробластому и рабдомиосаркому), саркому мягких тканей, плоскоклеточный рак, рак желудка, синовиальную саркому, тестикулярный рак, карциному тимуса, тимому, рак щитовидной железы и рак матки.

[00217] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифические молекулы согласно настоящему изобретению могут применяться для лечения: рака молочной железы (включая HER2⁺ рак молочной железы и/или TNBC), рака желчных протоков (включая холангиокарциному), рака шейки матки (включая рак шейки матки, связанный с ВПЧ), рака эндометрия (включая неселективный рак эндометрия, рак эндометрия с высоким уровнем MSI, рак эндометрия с дефицитом репарации ошибок репликации (dMMR) и/или положительный рак эндометрия с мутацией в экзонуклеазном домене POLE), рака желудка, рака GEJ, рака головы и шеи (включая SCCHN), рака печени (включая HCC), рака легких (включая SCLC и/или NSCLC), лимфомы (включая NHL и DLBCL), рака яичников, рака предстательной железы.

[00218] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения PD-1-связывающие (или PD-L1-связывающие) и LAG-3-связывающие молекулы или PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифические молекулы согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с HER2-связывающими молекулами (такими как маргетуксимаб) при лечении HER⁺ раковых заболеваний, включая: рак молочной железы, метастатический рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак GEJ, рак яичников, рак поджелудочной железы и рак желудка. Согласно одному такому варианту реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу применяют в комбинации с ADCC-усиленной HER2-связывающей молекулой. Согласно другому такому варианту реализации настоящего изобретения DART-I применяют в комбинации с маргетуксимабом.

[00219] Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения PD-1-связывающие (или PD-L1-связывающие) и LAG-3-связывающие молекулы или PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифические молекулы согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации с B7-H3-связывающими молекулами (такими как эноблитузумаб) при лечении B7-H3⁺ видов рака, включая: рак анального канала, SCAC, рак молочной железы, TNBC, рак головы и шеи, SCCHN, рак легкого, NSCLC, меланому, увеальную меланому, рак предстательной железы, mCRPC. Согласно одному из таких вариантов реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу применяют в комбинации с ADCC-усиленной B7-H3-

связывающей молекулой. Согласно другому такому варианту реализации настоящего изобретения DART-I применяют в комбинации с эноблитузумабом.

[00220] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу; или ТА-связывающую молекулу и PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифическую молекулу; или PD-1-связывающую (или PD-L1-связывающую) молекулу в комбинации с LAG-3-связывающей молекулой вводят в качестве терапии первой линии для лечения рака. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения такие молекулы вводят после одной или более предшествующих линий терапии. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения такие молекулы вводят в дополнительной комбинации с одним или более дополнительными лекарственными средствами. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения такие молекулы могут быть использованы в качестве адъювантной терапии во время или после хирургического удаления опухоли для задержки, подавления или предотвращения развития метастазов. Такие молекулы также можно вводить до хирургического вмешательства (*например*, в качестве неoadъювантной терапии), с целью уменьшения размера опухоли и, таким образом, обеспечения или упрощения такого хирургического вмешательства, сохранения ткани во время такого хирургического вмешательства и/или уменьшения любого возникающего в результате физического дефекта.

[00221] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в комбинации с ТА-связывающей молекулой (*например*, HER2 или B7-H3) в качестве терапии первой линии для лечения рака. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в комбинации с ТА-связывающей молекулой после одной или более предшествующих линий терапии. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в комбинации с ТА-связывающей молекулой и дополнительно в комбинации с одним или более дополнительными лекарственными средствами. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 молекула согласно настоящему изобретению может применяться в комбинации с ТА-связывающей молекулой в качестве адъювантной терапии во время или после хирургического удаления опухоли. PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу согласно настоящему изобретению также

можно вводить в комбинации с ТА-связывающей молекулой или перед хирургическим вмешательством. Согласно одному из таких вариантов реализации настоящего изобретения ТА-связывающая молекула представляет собой HER2-связывающую молекулу или B7-H3-связывающую молекулу.

[00222] В частности, настоящее изобретение охватывает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы; или PD-1-связывающей (или PD-L1-связывающей) и LAG-3-связывающей молекулы, или PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифической молекулы в комбинации с ТА-связывающей молекулой в комбинации с одним или более другими вариантами терапии, известными специалистам в данной области техники для лечения или предотвращения рака, включая, но не ограничиваясь указанными, современные стандартные и экспериментальные варианты химиотерапии, гормональной терапии, биологической терапии, иммунотерапии, лучевой терапии или хирургии. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения комбинацию PD-1-связывающих (или PD-L1-связывающих) и LAG-3-связывающих молекул или PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифическую молекулу вводят в комбинации с ТА-связывающей молекулой (*например*, ADCC-усиленной ТА-связывающей молекулой) и дополнительно в комбинации с терапевтически или профилактически эффективным количеством одного или более терапевтических агентов, известных специалистам в данной области техники, для лечения и/или предотвращения рака, в частности, рака, экспрессирующего ТА (*например*, HER2⁺ рака или B7-H3⁺ рака). Химиотерапевтические агенты, обычно применяемые при лечении HER2-экспрессирующих видов рака, включают, но не ограничиваются указанными, антрациклины (в частности, даунорубин, доксорубин и эпирубин), капецитабин, карбоплатин, циклофосфамид, лейковорин, метотрексат, оксалиплатин, таксаны (в частности, доцетаксел и паклитаксел), 5-фторурацил (5-ФУ).

[00223] В другом аспекте настоящее изобретение включает усовершенствованные способы определения восприимчивости субъекта к такому лечению путем измерения степени экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках субъекта до начала лечения. Экспрессия PD-L1 в более чем 10% опухолевых клеток была установлена как клинически значимая точка отсечения для лечения определенными PD-1-связывающими (или PD-L1-связывающими) молекулами. Способы измерения степени экспрессии PD-L1 известны в данной области техники (de Vicente, J.C. *et al.* (2018) “PD-

L1 Expression in Tumor Cells Is an Independent Unfavorable Prognostic Factor in Oral Squamous Cell Carcinoma,” Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 28(3):546-554; Davis, A.A. et al. (2019) “The Role Of PD-L1 Expression As A Predictive Biomarker: An Analysis Of All US Food And Drug Administration (FDA) Approvals Of Immune Checkpoint Inhibitors,” J. ImmunoTher. Canc.7:278:1-8; Khozin, S. et al. (2017) “Rates Of PD-L1 Expression Testing In US Community-Based Oncology Practices (uSCPS) For Patients With Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer (mNSCLC) Receiving Nivolumab (N) Or Pembrolizumab (P),” J. Clin. Oncol. 35(15_suppl):11596). Например, такое измерение может быть выполнено с использованием мышиного моноклонального антитела PD-L1 (клон 22C3, разведение 1:200; PD-L1 IHC 22C3 pharmDx; Dako SK006) с использованием системы визуализации Dako EnVision Flex + (Dako Autostainer). В таком анализе фиксированный формалином, залитый парафином образец биопсии опухоли инкубируют в присутствии моноклонального мышиного анти-PD-L1 антитела (клон 22C3). Экспрессию белка PD-L1 определяют с использованием показателя пропорции опухоли (TPS), который представляет собой процент жизнеспособных опухолевых клеток, демонстрирующих частичное или полное окрашивание мембраны любой интенсивности, или с помощью комбинированного положительного показателя (CPS), который представляет собой количество PD-L1 окрашивающих клеток (опухолевые клетки, лимфоциты, макрофаги), деленное на общее количество жизнеспособных опухолевых клеток, умноженное на сто.

[00224] Определение того, что экспрессия PD-L1 в опухолях субъекта составляет менее 1% (как определено с использованием комбинированного положительного показателя (CPS) или показателя пропорции опухоли (TPS) в анализе ИГХ) до лечения, свидетельствует о восприимчивости пациента к способам лечения согласно настоящему изобретению, в частности, способов, включающих введение PD-1-связывающей (или PD-L1-связывающей) и LAG-3-связывающей молекулы или PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифической молекулы в комбинации с ADCC-усиленной ТА-связывающей молекулой. Такая восприимчивость также усиливается у субъектов, которые ранее не отвечали или имели недостаточный ответ по меньшей мере на одно предшествующее лечение, включая предшествующее лечение PD-1-связывающей молекулой или PD-L1-связывающей молекулой в отсутствие лечения ADCC-усиленной ТА-связывающей молекулой. Настоящее изобретение включает способы лечения рака путем введения ТА-связывающей молекулы и: PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3)

биспецифической молекулы; или PD-1-связывающей (или PD-L1-связывающей) молекулы в комбинации с LAG-3-связывающей молекулой субъекту, причем экспрессия PD-L1 на поверхности клеток такого рака до такого лечения составляет менее 1%, как определено с использованием комбинированного положительного показателя (CPS) или показателя пропорции опухоли (TPS).

VIII. Введение и дозировка

[00225] Молекулу на основе антитела согласно настоящему изобретению (*например*, биспецифическую молекулу PD-1 x LAG-3) можно вводить субъекту, *например*, субъекту, нуждающемуся в этом, *например*, пациенту, представляющему собой человека, различными способами. Для многих вариантов применения способ введения представляет собой один из: внутривенной инъекции или инфузии (в/в), подкожной инъекции (п/к), внутривенной инъекции (в/б) или внутримышечной инъекции. Также возможно применение внутрисуставной доставки. Также можно применять другие пути парентерального введения. Примеры таких путей включают: внутриартериальный, интратекальный, внутрикапсульный, внутриорбитальный, внутрисердечный, внутридермальный, транстрахеальный, субкутикулярный, внутрисуставный, субкапсулярный, субарахноидальный, внутрипозвоночный, а также эпидуральную и интратермальную инъекцию.

[00226] Молекулу на основе антитела согласно настоящему изобретению можно вводить в виде фиксированной дозы или в виде дозы, рассчитанной на основе массы тела (*например*, дозе, рассчитанной как мг/кг массы тела пациента). Доза также может быть подобрана для уменьшения или предотвращения продукции антител против вводимого средства. Схемы дозирования корректируют для обеспечения желаемого ответа, *например*, терапевтического ответа или комбинаторного терапевтического эффекта. Как правило, дозы молекул на основе антител (и, необязательно, дополнительного агента) могут применяться для обеспечения субъекта агентом в биодоступных количествах. Используемый в настоящей заявке термин «доза» относится к определенному количеству лекарственного средства, принимаемому одновременно. Термин «**дозировка**» относится к введению определенного количества, числа и частоты доз в течение определенного периода времени; таким образом, термин «дозировка» включает хронологические признаки, такие как продолжительность и периодичность.

Что касается времени введения доз (*т. е.* дозировкам), термин «приблизительно» предназначен для обозначения диапазона, который составляет ± 3 дня после указанного введения.

[00227] Термин "**фиксированная доза**", используемый в настоящей заявке, относится к дозе, которая не зависит от массы тела пациента и включает физически дискретные единицы вводимой молекулы на основе антитела (*например*, антитело, которое связывает **ТА**, антитело, которое связывает PD-1, антитело, которое связывает PD-L1, антитело, которое связывает LAG-3, PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифическую молекулу), которые являются подходящими для применения в качестве унитарной дозы для субъектов, которых лечат; причем каждая такая единица содержит заданное количество такой молекулы на основе антитела (рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта) в сочетании с фармацевтическим носителем и, необязательно, в сочетании с дополнительным агентом. Могут быть введены одна или несколько фиксированных доз. Термин «**доза, рассчитанная на основе массы тела**», используемый в настоящей заявке, относится к дискретному количеству молекулы согласно настоящему изобретению, которое следует вводить на единицу массы тела пациента, например, миллиграммы лекарственного средства на килограмм массы тела субъекта (мг/кг массы тела, сокращенно в настоящей заявке обозначенный как «мг/кг»). Рассчитанную дозу вводят исходя из массы тела субъекта на исходном уровне. Как правило, значительное ($\geq 10\%$) изменение массы тела относительно исходного уровня или установленного плато массы тела приводит к перерасчету дозы. Однократные или многократные дозы можно вводить согласно схеме дозирования. Композиции, содержащие молекулу на основе антитела, можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, путем инфузии.

[00228] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекулы на основе антител, которые связываются с **ТА** (в частности, с ADCC-усиленными ТА-связывающими молекулами), PD-1 или PD-L1 и/или LAG-3, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в соответствии с утвержденными предписанными схемами дозирования, которые могут включать фиксированные дозы или дозы, рассчитанные на основе массы тела. Известны утвержденные предписанные схемы дозирования для таких молекул (*например*, вкладыши в упаковку для трастузумаба, пертузумаба, пембролизумаба, ниволумаба, атезолизумаба, дурвалумаба,

тафаситамаба и т. д., доступны на веб-сайте Национальной медицинской библиотеки США: dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекулы на основе антител, которые связываются с PD-1 или с PD-L1 и/или с LAG-3, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе от приблизительно 120 мг до приблизительно 800 мг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекулы на основе антител, которые связываются с ТА (*например*, молекулы на основе антител, которые связываются с HER2 или B7-H3), вводят нуждающемуся в этом субъекту в дозе, рассчитанной на основе массы тела, составляющей от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг.

[00229] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифическую молекулу PD-1 x LAG-3 (*например*, DART-I) вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе от приблизительно 120 мг до приблизительно 800 мг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифическую молекулу PD-1 x LAG-3 вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 120 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 600 мг или приблизительно 800 мг. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения биспецифическую молекулу PD-1 x LAG-3 вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 400 мг. Согласно другому конкретному варианту реализации настоящего изобретения биспецифическую молекулу PD-1 x LAG-3 вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг. Согласно другому конкретному варианту реализации настоящего изобретения биспецифическую молекулу PD-1 x LAG-3 вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 800 мг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения анти-PD-1 антитело (*например*, ретифанлимаб) вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей от приблизительно 120 мг до приблизительно 750 мг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения анти-PD-1 антитело вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 375 мг, приблизительно 500 мг или приблизительно 750 мг. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения анти-PD-1 антитело вводят субъекту,

нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 375 мг. Согласно другому конкретному варианту реализации настоящего изобретения анти-PD-1 антитело вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 500 мг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения анти-LAG-3 антитело (*например*, релатлимаб) вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей от приблизительно 80 мг до приблизительно 200 мг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения анти-LAG-3 антитело вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 80 мг, приблизительно 100 мг или приблизительно 160 мг. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения анти-LAG-3 антитело вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 160 мг. В отношении фиксированных доз или фиксированных дозировок, термин «приблизительно» предназначен для обозначения диапазона, который составляет $\pm 10\%$ от заявленной дозы, таким образом, что, например, доза, составляющая приблизительно 600 мг составляет от 540 мг до 660 мг. В отношении дозировок, термин «приблизительно» предназначен для обозначения диапазона, который составляет ± 3 дня для заявленной дозы.

[00230] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения HER2- или B7-H3-связывающую молекулу (*например*, анти-HER2 антитело, анти-B7-H3 антитело) вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в дозе, рассчитанной на основе массы тела, составляющей от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения HER2- или B7-H3-связывающую молекулу вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в дозе, составляющей приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг или приблизительно 18 мг/кг. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения HER2- или B7-H3-связывающую молекулу вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в дозе, составляющей приблизительно 15 мг/кг. Согласно другим конкретным вариантам реализации настоящего изобретения первую дозу HER2-связывающей молекулы вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в дозе, составляющей приблизительно 8 мг/кг, после чего вводят одну или более дополнительных доз такой

HER2-связывающей молекулы в дозе, составляющей приблизительно 6 мг/кг. Согласно другим конкретным вариантам реализации настоящего изобретения первую дозу HER2-связывающей молекулы вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в дозе, составляющей приблизительно 4 мг/кг, после чего вводят одну или более дополнительных доз такой HER2-связывающей молекулы в дозе, составляющей приблизительно 2 мг/кг. В отношении доз, рассчитанных на основе массы тела, термин «приблизительно» предназначен для обозначения диапазона, который составляет $\pm 10\%$ от заявленной дозы, таким образом, например, доза, составляющая приблизительно 15 мг/кг, составляет от 13,6 мг/кг до 16,5 мг/кг.

[00231] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения HER2-связывающую молекулу вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей от приблизительно 420 мг до приблизительно 1650 мг. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения HER2-связывающую молекулу вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 420 мг. Согласно другому конкретному варианту реализации настоящего изобретения HER2-связывающую молекулу вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг. Согласно другим конкретным вариантам реализации настоящего изобретения HER2-связывающую молекулу вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 840 мг. Согласно другому конкретному варианту реализации настоящего изобретения HER2-связывающую молекулу вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 1650 мг. Согласно другим конкретным вариантам реализации настоящего изобретения первую дозу HER2-связывающей молекулы вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 840 мг, после чего вводят одну или более дополнительных доз такой HER2-связывающей молекулы в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 420 мг.

[00232] Дозировку молекулы на основе антитела (*например*, дозу антитела, которое связывает ТА, антитела, которое связывает PD-1, антитела, которое связывает PD-L1, антитела, которое связывает LAG-3, PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифической молекулы) можно вводить с периодичностью в течение периода времени, достаточного для включения по меньшей мере 2 доз, по меньшей мере 4 доз,

по меньшей мере 6 доз, по меньшей мере 12 доз или по меньшей мере 24 доз (курс лечения). Например, дозировка может быть введена, *например*, один или два раза в сутки или приблизительно от одного до четырех раз в неделю. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дозировка может быть введена один раз в неделю («Q1W»), один раз в две недели («Q2W»), один раз в три недели («Q3W»), один раз в четыре недели («Q4W») и т. д. Такое периодическое введение может продолжаться в течение периода времени, *например*, составляющего от приблизительно 1 до 52 недель или более 52 недель. Такой курс лечения может представлять собой курс с шагом повышения дозы, каждый такой шаг в настоящей заявке называется «циклом», продолжительностью, *например*, от 2 до 24 недель, от приблизительно 3 до 7 недель, приблизительно 4 недели или приблизительно 6 недель, или приблизительно 8 недель, или приблизительно 12 недель, или приблизительно 24 недели, в течение которого вводят заданное количество доз. Доза и/или частота введения могут быть одинаковыми или различными в течение каждого цикла. Факторы, которые могут влиять на дозировку и сроки, необходимые для эффективного лечения субъекта, включают, *например*, тяжесть заболевания или расстройства, лекарственную форму, путь доставки, предшествующее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта, и наличие других заболеваний у субъекта. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством соединения может включать один курс лечения или несколько курсов лечения.

[00233] В настоящем изобретении предложено предоставление субъекту множественных доз молекулы на основе антитела (*например*, антитела, которое связывает ТА, антитела, которое связывает PD-1, антитела, которое связывает PD-L1, антитела, которое связывает LAG-3, PD-1 x LAG-3 (или PD-L1 x LAG-3) биспецифической молекулы). Количество каждой молекулы на основе антитела в каждой такой дозе может быть одинаковым или может отличаться от предыдущей введенной дозы. Таким образом, *например*, лечение может включать введение «первой» (или «нагрузочной») дозы такой молекулы на основе антитела, а затем сниженной «второй» дозы такой молекулы на основе антитела. Например, если первая доза молекулы на основе антитела составляет приблизительно 8 мг/кг, вторая доза будет составлять менее 8 мг/кг (*например*, приблизительно 6 мг/кг). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последующие дозы вводят в той же

концентрации, что и вторую более низкую дозу. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одну и ту же дозу молекулы на основе антитела вводят в течение всего курса лечения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ТА-связывающую молекулу, которая связывает HER2, вводят в первой дозе, составляющей приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг или в первой фиксированной дозе, составляющей приблизительно 840 мг, с последующим введением второй более низкой дозы, при этом вторую дозу вводят приблизительно через три недели после введения первой дозы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вводят дополнительные последующие дозы HER2-связывающей молекулы, при этом последующие дозы вводят приблизительно через три недели после введения второй дозы или предыдущей последующей дозы.

[00234] «Режим дозирования» представляет собой введение дозировки, при котором пациенту вводят predetermined дозу (или набор таких predetermined доз) с predetermined частотой (или серией таких частот) с predetermined периодичностью.

[00235] Типичная схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы (*например, DART-1*) в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 120 мг 1 раз в 2 недели (Q2W). Другая типичная схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 300 мг 1 раз в 2 недели (Q2W). Еще одна типичная схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 300 мг 1 раз в 3 недели (Q3W). Другая типичная схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 400 мг 1 раз в 2 недели (Q2W). Другая типичная схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 400 мг 1 раз в 3 недели (Q3W). Другая типичная схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг 1 раз в 2 недели (Q2W). Еще одна типичная схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг 1 раз в 3 недели (Q3W). Другие типичные схемы дозирования включают введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы в

фиксированной дозе, составляющей приблизительно 800 мг 1 раз в 2 недели (Q2W) или введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 800 мг 1 раз в 3 недели (Q3W). Как предложено в настоящей заявке, такие схемы дозирования могут дополнительно включать введение ТА-связывающей молекулы. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в соответствии со схемой дозирования, предложенной в настоящей заявке, в комбинации с одобренной для лечения ТА-связывающей молекулой (*например*, трастузумабом, пертузумабом и т. д.), которую вводят в соответствии с утвержденной предписанной схемой дозирования. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в соответствии со схемой дозирования, предложенной в настоящей заявке, в комбинации с одобренной для лечения ADCC-усиленной ТА-связывающей молекулой (*например*, тафаситамабом и т. д.), которую вводят в соответствии с утвержденной предписанной схемой дозирования. Согласно некоторым вариантам реализации вышеуказанных схем дозирования PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула представляет собой DART-I. Согласно одному из таких вариантов реализации настоящего изобретения DART-I вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг один раз в три недели (Q3W). Согласно другому такому варианту реализации настоящего изобретения DART-I вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг, один раз в три недели (Q3W) в комбинации с одобренной для лечения ТА-связывающей молекулой (*например*, трастузумабом, пертузумабом и т.д.), которую вводят в соответствии с утвержденной предписанной схемой дозирования. Согласно другому такому варианту реализации настоящего изобретения DART-I вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг, один раз в три недели (Q3W) в комбинации с одобренной для лечения ADCC-усиленной ТА-связывающей молекулой (*например*, тафаситамабом и т.д.), которую вводят в соответствии с утвержденной предписанной схемой дозирования.

[00236] Другая типичная схема дозирования включает введение анти-PD-1 антитела (*например*, ретифанлимаба) в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 375 мг, один раз в три недели (Q3W) и анти-LAG-3 антитела (*например*, релатлимаба) в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 160 мг, один раз в четыре недели (Q4W). Другая типичная схема дозирования включает введение анти-PD-1 антитела в

фиксированной дозе, составляющей приблизительно 500 мг, один раз в четыре недели (Q4W) и анти-LAG-3 антитела в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 160 мг, один раз в четыре недели (Q4W). Еще одна типичная схема дозирования включает введение анти-PD-1 антитела в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 750 мг, один раз в четыре недели (Q4W) и анти-LAG-3 антитела в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 160 мг, один раз в четыре недели (Q4W). Как предложено в настоящей заявке, такие схемы дозирования могут дополнительно включать введение ТА-связывающей молекулы. Согласно одному из вариантов реализации настоящего изобретения анти-PD-1 антитело и анти-LAG-3 антитело вводят согласно схеме дозирования, предложенной в настоящей заявке, в комбинации с одобренной для лечения ТА-связывающей молекулой (*например*, трастузумабом, пертузумабом *и т. д.*), которую вводят в соответствии с утвержденной предписанной схемой дозирования. Согласно одному из вариантов реализации настоящего изобретения анти-PD-1 антитело и анти-LAG-3 антитело вводят в соответствии со схемой дозирования, предложенной в настоящей заявке, в комбинации с одобренной для лечения ADCC-усиленной ТА-связывающей молекулой (*например*, тафаситамабом *и т. д.*), которую вводят в соответствии с утвержденной предписанной схемой дозирования. Согласно некоторым вариантам реализации вышеуказанных схем дозирования анти-PD-1 антитело представляет собой ретифанлимаб, а анти-LAG-3 антитело представляет собой релатлимаб. Согласно одному из таких вариантов реализации ретифанлимаб вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 375 мг, один раз в три недели (Q3W), релатлимаб вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 160 мг, один раз в четыре недели (Q4W) и одобренную для лечения ТА-связывающую молекулу (*например*, трастузумаб, пертузумаб *и т. д.*) вводят в соответствии с утвержденной предписанной схемой дозирования. Согласно другому такому варианту реализации настоящего изобретения ретифанлимаб вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 500 мг, один раз в четыре недели (Q4W), релатлимаб вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 160 мг, один раз в четыре недели (Q4W) и одобренную для лечения ТА-связывающую молекулу (*например*, трастузумаб, пертузумаб *и т. д.*) вводят в соответствии с утвержденной предписанной схемой дозирования. Согласно другому такому варианту реализации настоящего изобретения ретифанлимаб вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 375 мг, один раз в три недели (Q3W), релатлимаб вводят

в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 160 мг, один раз в четыре недели (Q4W), и одобренную для лечения ADCC-усиленную ТА-связывающую молекулу (*например*, тафаситамаб и т. д.) вводят в соответствии с утвержденной предписанной схемой дозирования. Согласно еще одному такому варианту реализации настоящего изобретения ретифанлимаб вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 500 мг, один раз в четыре недели (Q4W), релатлимаб вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 160 мг, один раз в четыре недели (Q4W), и одобренную для лечения ADCC-усиленную ТА-связывающую молекулу (*например*, тафаситамаб и т. д.) вводят в соответствии с утвержденной предписанной схемой дозирования.

[00237] Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят согласно схеме дозирования, предложенной в настоящей заявке, в комбинации с ADCC-усиленной ТА-связывающей молекулой. Типичная комбинированная схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы (*например*, DART-I) в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 120 мг, один раз в две недели (Q2W), и ADCC-усиленной HER2- или B7-H3-связывающей молекулы (*например*, маргетуксимаба или эноблитузумаба), в дозе, составляющей от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг, вводимой один раз в три недели (Q3W). Другая типичная комбинированная схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы (*например*, DART-I) в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 120 мг, один раз в три недели (Q3W), и ADCC-усиленной HER2- или B7-H3-связывающей молекулы (*например*, маргетуксимаба или эноблитузумаба), в дозе, составляющей от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг, вводимой один раз в три недели (Q3W). Другая типичная схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 300 мг, один раз в две недели (Q2W), и ADCC-усиленной HER2- или B7-H3-связывающей молекулы в дозе, составляющей от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг, вводимой один раз в три недели (Q3W). Еще одна типичная схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 300 мг, один раз в три недели (Q3W) и ADCC-усиленной HER2- или B7-H3-связывающей молекулы в дозе, составляющей от приблизительно 2 мг/кг до

приблизительно 18 мг/кг, вводимой один раз в три недели (Q3W). Другая типичная схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 400 мг, один раз в две недели (Q2W), и ADCC-усиленной HER2- или B7-H3-связывающей молекулы в дозе, составляющей от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг, вводимой один раз в три недели (Q3W). Другая типичная схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы в дозе, составляющей 400 мг, один раз в три недели (Q3W) и ADCC-усиленной HER2- или B7-H3-связывающей молекулы в дозе, составляющей от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг, вводимой один раз в три недели (Q3W). Конкретная схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг, один раз в две недели (Q2W) и ADCC-усиленной HER2- или B7-H3-связывающей молекулы в дозе, составляющей от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг, вводимой один раз в три недели (Q3W). Другая конкретная схема введения включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг, один раз в три недели (Q3W) и ADCC-усиленной HER2- или B7-H3-связывающей молекулы в дозе, составляющей от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг, вводимой один раз в три недели (Q3W). Другая конкретная схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 800 мг, один раз в две недели (Q2W), и ADCC-усиленной HER2- или B7-H3-связывающей молекулы в дозе, составляющей от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг, вводимой один раз в три недели (Q3W). Другая конкретная схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 800 мг, один раз в три недели (Q3W) и ADCC-усиленной HER2- или B7-H3-связывающей молекулы в дозе, составляющей от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг, вводимой один раз в три недели (Q3W). Согласно некоторым вариантам реализации вышеуказанных схем дозирования PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула представляет собой DART-I. Согласно некоторым вариантам реализации вышеуказанных схем дозирования ADCC-усиленная HER2-связывающая молекула представляет собой маргетуксимаб. Согласно некоторым вариантам реализации вышеуказанных схем дозирования ADCC-усиленная B7-H3-связывающая молекула представляет собой эноблитузумаб.

[00238] Предпочтительно, согласно указанным выше вариантам реализации введение осуществляют с заданной частотой или периодичностью или в течение 1-3 дней после такого запланированного интервала, таким образом, что введение осуществляют в течение 1-3 дней до, 1-3 дней после или в день введения запланированной дозы, *например*, один раз в 3 недели (± 3 дня). Как правило, согласно указанным выше вариантам реализации изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу и ADCC-усиленную HER2- или B7-H3-связывающую молекулу вводят путем в/в инфузии в течение периода времени, составляющего 24 часа. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу и ADCC-усиленную HER2- или B7-H3-связывающую молекулу вводят путем в/в инфузии согласно любой из вышеперечисленных схем дозирования в течение периода (т.е., курса лечения), составляющего по меньшей мере 1 месяц или более, по меньшей мере 3 месяца или более, или по меньшей мере 6 месяцев или более, или по меньшей мере 12 месяцев или более. В частности, предложена продолжительность лечения, составляющая по меньшей мере 6 месяцев или более, или по меньшей мере 12 месяцев или более, или до ремиссии заболевания или неконтролируемой токсичности. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения лечение продолжается в течение периода времени после ремиссии заболевания.

[00239] Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения молекулы на основе антитела вводят путем в/в инфузии. Таким образом, молекулы на основе антител обычно разводят (отдельно или вместе) в инфузионном мешке, содержащем подходящий разбавитель, *например*, 0,9% хлорид натрия. Поскольку могут возникнуть инфузионные или аллергические реакции, рекомендуется проводить премедикацию для предотвращения таких инфузионных реакций и соблюдать меры предосторожности в отношении анафилаксии, наблюдаемой во время введения антител. Такая в/в инфузия может быть введена субъекту в течение периода времени, составляющего от 30 минут до 24 часов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в/в инфузию вводят в течение периода времени, составляющего приблизительно 30-240 минут, приблизительно 30-180 минут, приблизительно 30-120 минут или приблизительно 30-90 минут, или в течение периода времени, составляющего приблизительно 60-90 минут, или в течение периода времени, составляющего

приблизительно 60-75 минут, или в течение меньшего периода, если субъект не проявляет признаки или симптомы нежелательной инфузионной реакции.

[00240] Хотя, как было показано выше, для доставки нуждающимся в этом субъектам-реципиентам молекул на основе антител в соответствии с настоящим изобретением могут применяться различные способы дозирования и введения, для применения в таком лечении, в частности, предлагаются определенные комбинации, способы дозирования и введения. В настоящей заявке конкретно описано применение PD-1 x LAG-3 биспецифического диатела согласно настоящему изобретению (*например, DART-I*) в комбинации с анти-HER2 или анти-B7-H3 антителом (*например, маргетуксимабом, трастузумабом, пертузумабом и/или эноблитузумабом*) при таком дозировании и введении.

[00241] Соответственно, такая схема дозирования включает введение PD-1 x LAG-3 биспецифического диатела в фиксированной дозе, составляющей от приблизительно 300 мг до приблизительно 800 мг, и анти-HER2 антитела ли анти-B7-H3 антитела в дозе, составляющей от приблизительно 2 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг и/или в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 420-840 мг, где такие молекулы вводят один раз в три недели (Q3W) (± 3 дня). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическое диатело вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 300 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 600 мг или приблизительно 800 мг, а анти-HER2 или анти-B7-H3 антитело вводят в дозе, составляющей приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг или приблизительно 15 мг/кг. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическое диатело вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 300 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 600 мг или приблизительно 800 мг, а анти-HER2 антитело вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 420 мг или приблизительно 840 мг.

(A) Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическое диатело вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 300 мг. Согласно таким вариантам реализации настоящего изобретения если анти-HER2 или анти-B7-H3 антитело, предназначенное для введения, представляет собой маргетуксимаб или эноблитузумаб,

соответственно, и такой маргетуксимаб или эноблитузумаб вводят в дозе, составляющей приблизительно 15 мг/кг массы тела. В качестве альтернативы, если в таких вариантах реализации настоящего изобретения анти-HER2 антитело, предназначенное для введения, представляет собой трастузумаб, первую дозировку трастузумаба вводят в дозе, составляющей приблизительно 8 мг/кг, с последующим введением одной или более дополнительных доз трастузумаба, каждая в дозе, составляющей приблизительно 6 мг/кг, или первую дозировку трастузумаба вводят в дозе, составляющей приблизительно 4 мг/кг, с последующим введением одной или более дополнительных дозировок трастузумаба, каждая в дозе, составляющей приблизительно 2 мг/кг. В качестве альтернативы, если в таких вариантах реализации настоящего изобретения анти-HER2 антитело, предназначенное для введения, представляет собой пертузумаб, первую дозировку пертузумаба вводят в дозе, составляющей приблизительно 840 мг, с последующим введением одной или более дополнительных дозировок пертузумаба, каждая в дозе, составляющей приблизительно 420 мг.

- (B) Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическое диатело вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 400 мг, в комбинации с анти-HER2 антителом или анти-B7-H3 антителом. Согласно таким вариантам реализации настоящего изобретения если анти-HER2 или анти-B7-H3 антитело, предназначенное для введения, представляет собой маргетуксимаб или эноблитузумаб, соответственно, то такой маргетуксимаб или эноблитузумаб вводят в дозе, составляющей приблизительно 15 мг/кг массы тела. В качестве альтернативы, если в таких вариантах реализации настоящего изобретения анти-HER2 антитело, предназначенное для введения, представляет собой трастузумаб, первую дозировку трастузумаба вводят в дозе, составляющей приблизительно 8 мг/кг, с последующим введением одной или более дополнительных дозировок трастузумаба, каждая в дозе, составляющей приблизительно 6 мг/кг, или первую дозировку трастузумаба вводят в дозе, составляющей приблизительно 4 мг/кг, с последующим введением одной или более дополнительных дозировок трастузумаба, каждая в дозе, составляющей приблизительно 2 мг/кг. В качестве альтернативы, если в таких вариантах реализации настоящего изобретения ант-HER2 антитело, предназначенное для введения, представляет собой пертузумаб, первую

дозировку пертузумаба вводят в дозе, составляющей приблизительно 840 мг, с последующим введением одной или более дополнительных дозировок пертузумаба, каждая в дозе, составляющей приблизительно 420 мг каждый.

- (C) Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическое диатело вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг. Согласно таким вариантам реализации настоящего изобретения если анти-HER2 или анти-B7-H3 антитело, предназначенное для введения, представляет собой маргетуксимаб или эноблитузумаб, соответственно, то такой маргетуксимаб или эноблитузумаб вводят в дозе, составляющей приблизительно 15 мг/кг массы тела. Согласно таким вариантам реализации настоящего изобретения, если анти-HER2 антитело, предназначенное для введения, представляет собой трастузумаб, первую дозировку трастузумаба вводят в дозе, составляющей приблизительно 8 мг/кг, с последующим введением одной или более дополнительных дозировок трастузумаба каждая в дозе, составляющей приблизительно 6 мг/кг, или первую дозировку трастузумаба вводят в дозе, составляющей приблизительно 4 мг/кг, с последующим введением одной или более дополнительных доз трастузумаба каждая в дозе, составляющей приблизительно 2 мг/кг. В качестве альтернативы, если в таких вариантах реализации настоящего изобретения анти-HER2 антитело, предназначенное для введения, представляет собой пертузумаб, первую дозировку пертузумаба вводят в дозе, составляющей приблизительно 840 мг, с последующим введением одной или более дополнительных дозировок пертузумаба, каждая в дозе, составляющей приблизительно 420 мг.
- (D) Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическое диатело вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 800 мг. Согласно таким вариантам реализации настоящего изобретения если анти-HER2 или анти-B7-H3 антитело, предназначенное для введения, представляет собой маргетуксимаб или эноблитузумаб, соответственно, то такой маргетуксимаб или эноблитузумаб вводят в дозе, составляющей приблизительно 15 мг/кг массы тела. В качестве альтернативы, если анти-HER2 антитело, предназначенное для введения, представляет собой трастузумаб, то первую дозу трастузумаба вводят в дозе, составляющей приблизительно 8 мг/кг, с последующим введением одной или более

дополнительных дозировок трастузумаба каждая в дозе, составляющей приблизительно 6 мг/кг, или первую дозу трастузумаба вводят в дозе, составляющей приблизительно 4 мг/кг, с последующим введением одной или более дополнительных дозировок трастузумаба, каждая в дозе, составляющих приблизительно 2 мг/кг. В качестве альтернативы, анти-HER2 антитело, предназначенное для введения, представляет собой пертузумаб, то первую дозировку такого пертузумаба вводят в дозе, составляющей приблизительно 840 мг, с последующим введением одной или более дополнительными дозировками пертузумаба, каждая в дозе, составляющей приблизительно 420 мг.

[00242] Согласно любому из указанных выше вариантов реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическое диатело и анти-HER2 или анти-B7-H3 анттело вводят путем внутривенной инфузии одновременно, последовательно, попеременно или в разное время в течение 24-часового периода. Согласно любому из указанных выше вариантов реализации настоящего изобретения PD-1 x LAG-3 биспецифическое диатело представляет собой DART-I.

[00243] Согласно настоящему изобретению также предложены схемы дозирования, в которых PD-1 x LAG-3 биспецифическое диатело вводят в комбинации с двумя различными анти-HER2 антителами (*например*, трастузумабом и пертузумабом), в которых введение каждой молекулы осуществляют в соответствии с любым из указанных выше вариантов реализации или в соответствии с утвержденной предписанной схемой дозирования.

IX. Варианты реализации настоящего изобретения

[00244] После приведения общего описания настоящего изобретения для лучшего понимания представлены следующие пронумерованные варианты реализации («ЕА» и «ЕВ»), которые представлены в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения настоящего изобретения, если специально не указано иное:

ЕА1. Способ лечения рака, включающий введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы нуждающемуся в этом субъекту, при этом указанный способ включает введение указанной PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы указанному

субъекту в фиксированной дозе, составляющей от приблизительно 120 мг до приблизительно 800 мг.

- EA2. Способ согласно EA1, где указанный рак характеризуется экспрессией опухолевого антигена (ТА), и при этом указанный способ дополнительно включает введение указанному субъекту молекулы, связывающей опухолевый антиген (ТА) (ТА-связывающей молекулы).
- EA3. Способ лечения рака у субъекта, где указанный рак характеризуется экспрессией ТА, при этом указанный способ включает введение ТА-связывающей молекулы указанному субъекту и дополнительно включает введение указанному субъекту:
- (a) биспецифической молекулы (PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы); или
 - (b) молекулы, которая иммуноспецифично связывает PD-1 (PD-1-связывающая молекула) в комбинации с молекулой, которая иммуноспецифично связывает LAG-3 (LAG-3-связывающая молекула); или
 - (c) биспецифической молекулы, которая иммуноспецифично связывает как PD-L1, так и LAG-3 (PD-L1 x LAG-3 биспецифической молекулы); или
 - (d) молекулы, которая иммуноспецифично связывает PD-L1 (PD-L1-связывающей молекулы) в комбинации с LAG-3-связывающей молекулой.
- EA4. Способ согласно любому из EA2-EA3, где указанная ТА-связывающая молекула содержит ADCC-усиленный Fc-домен.
- EA5. Способ согласно любому из EA2-EA4, где:
- (a) каждая молекула представлена в отдельной композиции; или
 - (b) каждая молекула представлена в одной и той же композиции; или
 - (c) указанная PD-1-связывающая молекула и указанная LAG-3-связывающая молекула представлены в одной композиции, и указанная ТА-связывающая молекула представлена в отдельной композиции; или

- (d) указанная PD-L1-связывающая молекула и указанная LAG-3-связывающая молекула представлены в одной композиции, и указанная TA-связывающая молекула представлена в отдельной композиции.

- EA6. Способ согласно любому из EA2-EA5, где указанная TA-связывающая молекула представляет собой антитело.
- EA7. Способ согласно любому из EA2-EA6, где указанная PD-1-связывающая молекула представляет собой антитело.
- EA8. Способ согласно любому из EA2-EA6, где указанная PD-L1-связывающая молекула представляет собой антитело.
- EA9. Способ согласно любому из EA2-EA8, где указанная LAG-3-связывающая молекула представляет собой антитело.
- EA10. Способ согласно любому из EA3-EA6, причем указанный способ включает введение указанной TA-связывающей молекулы и указанной PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы.
- EA11. Способ согласно любому из EA3-EA9, причем указанный способ включает введение указанной TA-связывающей молекулы и указанной PD-1-связывающей молекулы в комбинации с указанной LAG-3-связывающей молекулой.
- EA12. Способ согласно любому из EA3-EA6, причем указанный способ включает введение указанной TA-связывающей молекулы и указанной PD-L1 x LAG-3 биспецифической молекулы.
- EA13. Способ согласно любому из EA3-EA9, причем указанный способ включает введение указанной TA-связывающей молекулы и указанной PD-L1-связывающей молекулы в комбинации с указанной LAG-3-связывающей молекулой.
- EA14. Способ согласно любому из EA4-EA13, где указанный ADCC-усиленный Fc-домен содержит:

- (a) сконструированную гликоформу; и/или
- (b) аминокислотную замену относительно Fc-области дикого типа.

EA15. Способ согласно EA14, где указанный ADCC-усиленный Fc-домен содержит сконструированную гликоформу, которая представляет собой комплексную N-гликозид-связанную сахарную цепь, которая не содержит фукозу, и/или которая содержит бисекционирующий O-GlcNAc.

EA16. Способ согласно EA14 или EA15, где указанный ADCC-усиленный Fc-домен содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из F243L, R292P, Y300L, V305I, I332E и P396L.

EA17. Способ согласно любому из EA14-EA16, где указанный ADCC-усиленный Fc-домен содержит аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из:

- (a) одну замену, выбранную из группы, состоящей из:
F243L, R292P, Y300L, V305I, I332E и P396L;
- (b) две замены, выбранные из группы, состоящей из:
 - (1) F243L и P396L;
 - (2) F243L и R292P;
 - (3) R292P и V305I; и
 - (4) S239D и I332E;
- (c) три замены, выбранные из группы, состоящей из:
 - (1) F243L, R292P и Y300L;
 - (2) F243L, R292P и V305I;
 - (3) F243L, R292P и P396L; и
 - (4) R292P, V305I и P396L;
- (d) четыре замены, выбранные из группы, состоящей из:
 - (1) F243L, R292P, Y300L и P396L; и
 - (2) F243L, R292P, V305I и P396L; или
- (e) пять замен, выбранных из группы, состоящей из:
 - (1) F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L; и
 - (2) L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L,

где нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.

- EA18. Способ согласно любому из EA14-EA16, где указанный ADCC-усиленный Fc-домен содержит аминокислотные замены: L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L, где нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.
- EA19. Способ согласно любому из EA14-EA16, где указанный ADCC-усиленный Fc-домен содержит аминокислотные замены: S239D и I332E, где нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.
- EA20. Способ согласно любому из EA2-EA19, где указанный ТА выбран из **Таблицы 6А** или **Таблицы 6В**.
- EA21. Способ согласно любому из EA2-EA19, где указанная ТА-связывающая молекула содержит домены VL и VH антитела, выбранного из **Таблицы 7**.
- EA22. Способ согласно любому из EA3-EA7, EA9, EA11 или EA14-EA21, где указанная PD-1-связывающая молекула представляет собой антитело, которое содержит:
- (a) домен VL PD-1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:35**, и домен VH PD-1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:39**;
 - (b) домен VH и VL анти-PD-1 антитела, выбранного из **Таблицы 1**; или
 - (c) легкую цепь и тяжелую цепь анти-PD-1 антитела, выбранного из **Таблицы 1**.
- EA23. Способ согласно любому из EA3-EA6, EA8-EA9 или EA13-EA21, где указанная PD-L1-связывающая молекула представляет собой антитело, которое содержит:

- (a) домен VL PD-L1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:43**, и домен VH PD-L1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:47**;
- (b) домен VH и VL анти-PD-L1 антитела, выбранного из **Таблицы 2**; или
- (c) легкую цепь и тяжелую цепь анти-PD-L1 антитела, выбранного из **Таблицы 2**.

EA24. Способ согласно любому из EA3-EA9, EA11 или EA13-EA23, причем указанная LAG-3-связывающая молекула представляет собой антитело, которое содержит:

- (a) домен VL LAG-3, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:51**, и домен VH LAG-3, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:55**;
- (b) домен VH и VL анти-LAG-3 антитела, выбранного из **Таблицы 3**; или
- (c) легкую цепь и тяжелую цепь анти-LAG-3 антитела, выбранного из **Таблицы 3**.

EA25. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10 или EA14-EA21, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит:

- (a) домен VL PD-1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:35**, и домен VH PD-1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:39**, или домен VH и VL анти-PD-1 антитела, выбранного из **Таблицы 1**; и/или
- (b) домен VL LAG-3, содержащий аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:51**, и домен VH LAG-3, содержащий аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:55**, или домен VH и VL анти-LAG-3 антитела, выбранного из **Таблицы 3**; или
- (c) молекулу на основе биспецифического антитела, выбранную из **Таблиц 4-5**.

- EA26. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10 или EA14-EA21, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит:
- (a) PD-1-связывающий домен, содержащий переменный домен легкой цепи (VL_{PD-1}), который содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} последовательности **SEQ ID NO:35**, и переменный домен тяжелой цепи (VH_{PD-1}), который содержит PD-1-специфичные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} последовательности **SEQ ID NO:39**; и
 - (b) LAG-3-связывающий домен, содержащий переменный домен легкой цепи (VL_{LAG-3}), который содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} последовательности **SEQ ID NO:51**, и переменный домен тяжелой цепи (VH_{LAG-3}), который содержит LAG-3-специфичные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} последовательности **SEQ ID NO:55**.
- EA27. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21 или EA25-EA26, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит:
- (a) два из указанных PD-1-связывающих доменов; и
 - (b) два из указанных LAG-3-связывающих доменов.
- EA28. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21 или EA25-EA27, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит домен VL с последовательностью **SEQ ID NO:35** и домен VH с последовательностью **SEQ ID NO:39**.
- EA29. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21 или EA25-EA28, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит домен VL с последовательностью **SEQ ID NO:51** и домен VH с последовательностью **SEQ ID NO:55**.
- EA30. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA12, EA14-EA21 или EA25-EA29, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит Fc-область.
- EA31. Способ согласно EA30, где указанный указанная Fc-область относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

- EA32. Способ согласно любому из EA30 или EA31, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула дополнительно содержит шарнирный домен.
- EA33. Способ согласно EA32, где указанная Fc-область и указанный шарнирный домен оба относятся к изотипу IgG4, и при этом указанный шарнирный домен содержит стабилизирующую мутацию.
- EA34. Способ согласно любому из EA30-EA33, где указанная Fc-область представляет собой вариант Fc-области, который содержит:
- (A) одну или более модификаций аминокислот, снижающих аффинность варианта Fc-области в отношении FcγR, и/или
 - (B) одну или более модификаций аминокислот, которые увеличивают время полужизни варианта Fc-области в сыворотке крови.
- EA35. Способ согласно EA34, где указанные модификации, которые снижают аффинность варианта Fc-области в отношении FcγR, включают замену L234A; L235A или L234A и L235A, причем нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.
- EA36. Способ согласно любому из EA34 или EA35, где указанные модификации, которые увеличивают время полужизни варианта Fc-области в сыворотке крови, включают замену M252Y; M252Y и S254T; M252Y и T256E; M252Y, S254T и T256E; или K288D и H435K, где указанная нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.
- EA37. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21 или EA25-EA36, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит две полипептидные цепи с последовательностью **SEQ ID NO:59** и две полипептидные цепи с последовательностью **SEQ ID NO:60**.
- EA38. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21 или EA25-EA37, где указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 120 мг.

- EA39. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21 или EA25-EA37, где указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 300 мг.
- EA40. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21 или EA25-EA37, где указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 400 мг.
- EA41. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21 или EA25-EA37, где указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг.
- EA42. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21 или EA25-EA37, где указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 800 мг.
- EA43. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21 или EA25-EA42, где указанную фиксированную дозу вводят один раз приблизительно каждые 2 недели.
- EA44. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21 или EA25-EA42, где указанную фиксированную дозу вводят один раз приблизительно каждые 3 недели.
- EA45. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21, EA25-EA37, EA40 или EA43, где указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 400 мг, один раз приблизительно каждые 2 недели.
- EA46. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21, EA25-EA37, EA41 или EA43, где указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или

указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг, один раз приблизительно каждые 2 недели.

- EA47. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21, EA25-EA37, EA41 или EA44, где указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг, один раз приблизительно каждые 3 недели.
- EA48. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21, EA25-EA37, EA42 или EA44, где указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 800 мг, один раз приблизительно каждые 3 недели.
- EA49. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21, EA25-EA48, где указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят путем внутривенной (в/в) инфузии.
- EA50. Способ согласно EA49, где указанная внутривенная (в/в) инфузия длится в течение периода времени, составляющего 30-240 минут.
- EA51. Способ согласно EA49, где указанная внутривенная (в/в) инфузия проводится в течение периода времени, составляющего приблизительно 30-90 минут.
- EA52. Способ согласно любому из EA1-EA51, где указанный рак представляет собой рак надпочечников, СПИД-ассоциированный рак, альвеолярную саркому мягких тканей, рак анального канала (включая плоскоклеточную карциному анального канала (SCAC)), рак мочевого пузыря, рак кости, рак головного и спинного мозга, рак молочной железы (включая HER2⁺ рак молочной железы или тройной негативный рак молочной железы (TNBC)), опухоль каротидного тела, рак шейки матки (включая связанный с ВПЧ рак шейки матки), хондросаркому, хордому, хромофобную почечно-клеточную

карциному, светлоклеточную карциному, рак толстой кишки, колоректальный рак, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпендимому, рак эндометрия (включая неселективный рак эндометрия, рак эндометрия с высоким уровнем MSI, рак эндометрия с дефицитом репарации ошибок репликации (dMMR) и/или положительный рак эндометрия с мутацией в экзонуклеазном домене POLE), саркому Юинга, экстраклеточную миксоидную хондросаркому, рак желчного пузыря или желчного протока (включая холангиокарциному, рак желчных протоков), рак желудка, рак гастроэзофагеального перехода (GEJ), гестационное трофобластическое заболевание, эмбрионально-клеточную опухоль, глиобластома, рак головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN)), гематологическое злокачественное новообразование, гепатоцеллюлярную карциному, инсулиному, саркому Капоши, рак почки, лейкоз (включая острый миелоидный лейкоз), липосаркому/злокачественную липоматозную опухоль, рак печени (включая гепатоцеллюлярную карциному (HCC)), лимфому (включая диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), неходжкинскую лимфому (NHL)), рак легких (включая мелкоклеточный рак легких (SCLC), немелкоклеточный рак легких (NSCLC)), медуллобластома, меланому (включая увеальную меланому), менингиому, карциному Меркеля, мезотелиому (включая мезотелиальный фарингеальный рак), множественную эндокринную неоплазию, множественную миелому, миелодиспластический синдром, нейробластома, нейроэндокринные опухоли, рак яичников, рак поджелудочной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, парашитовидную опухоль, рак детского возраста, опухоль оболочек периферических нервов, фарингеальный рак, феохромоцитому, опухоль гипофиза, рак предстательной железы (включая метастатический кастрационно-резистентный рак предстательной железы (mCRPC)), потерянную увеальную меланому, метастатический рак почек, рабдоидную опухоль, рабдомиосаркому, саркому, рак кожи, мелкокруглоклеточную опухоль с окрашиванием в синий цвет у детей (включая нейробластома и рабдомиосаркому), саркому мягких тканей, плоскоклеточный рак, рак желудка, синовиальную саркому, тестикулярный рак, карциному тимуса, тимому, рак щитовидной железы и рак матки.

- EA53. Способ согласно EA52, где указанный рак представляет собой рак анального канала, рак молочной железы, рак желчного протока, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак желудка, рак GEJ, рак головы и шеи, рак печени, рак легкого, лимфому, меланому, рак яичников или рак предстательной железы.
- EA54. Способ согласно любому из EA52 или EA53, где указанный рак представляет собой HER2⁺ рак молочной железы или TNBC.
- EA55. Способ согласно любому из EA52 или EA53, где указанный рак представляет собой рак желчного протока, холангиокарциному.
- EA56. Способ согласно любому из EA52 или EA53, где указанный рак представляет собой рак шейки матки, ассоциированный с ВПЧ.
- EA57. Способ согласно любому из EA52 или EA53, где указанный рак представляет собой SCCHN.
- EA58. Способ согласно любому из EA52 или EA53, где указанный рак представляет собой HCC.
- EA59. Способ согласно любому из EA52 или EA53, где указанный рак представляет собой SCLC или NSCLC.
- EA60. Способ согласно любому из EA52 или EA53, где указанный рак представляет собой NHL.
- EA61. Способ согласно любому из EA52 или EA53, где указанный рак представляет собой рак предстательной железы.
- EA62. Способ согласно любому из EA52 или EA53, где указанный рак представляет собой рак желудка.
- EA63. Способ согласно любому из EA2-EA62, где указанная ТА-связывающая молекула представляет собой HER2-связывающую молекулу, содержащую HER2-связывающий домен, содержащий вариабельный домен легкой цепи ($V_{L_{HER2}}$) и вариабельный домен тяжелой цепи ($V_{H_{HER2}}$), причем:

- (a) указанный переменный домен легкой цепи (VL_{HER2}) содержит переменный домен легкой цепи маргетуксимаба, содержащий CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} с последовательностью **SEQ ID NO:61**, и указанный переменный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}) содержит переменный домен тяжелой цепи маргетуксимаба, содержащий CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} с последовательностью **SEQ ID NO:66**;
- (b) указанный переменный домен легкой цепи (VL_{HER2}) содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} трастузумаба, и указанный переменный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}) содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} трастузумаба;
- (c) указанный переменный домен легкой цепи (VL_{HER2}) содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} пертузумаба, и указанный переменный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}) содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} пертузумаба; или
- (d) указанный переменный домен легкой цепи (VL_{HER2}) содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} из hHER2 MAB-1, и указанный переменный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}) содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} из hHER2 MAB-1.

- EA64. Способ согласно любому из EA2-EA63, где указанная HER2-связывающая молекула представляет собой анти-HER2 антитело.
- EA65. Способ согласно EA64, где указанное анти-HER2 антитело представляет собой маргетуксимаб, и указанный способ включает введение маргетуксимаба в дозировке, составляющей от приблизительно 6 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг один раз приблизительно каждые 3 недели.
- EA66. Способ согласно EA65, где маргетуксимаб вводят один раз приблизительно каждые 3 недели в дозе, выбранной из группы, состоящей из: приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг и приблизительно 18 мг/кг.
- EA67. Способ согласно любому из EA65 или EA66, где указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг, один раз приблизительно каждые 3 недели, а

маргетуксимаб вводят в дозе, составляющей приблизительно 15 мг/кг приблизительно один раз каждые 3 недели.

- EA68. Способ согласно любому из EA63-EA67, где указанный способ дополнительно включает введение химиотерапевтического агента.
- EA69. Способ согласно любому из EA63-EA68, где указанный рак представляет собой рак, экспрессирующий HER2.
- EA70. Способ согласно EA69, где указанный HER2-экспрессирующий рак представляет собой рак молочной железы, метастатический рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак GEJ, рак яичников, рак поджелудочной железы или рак желудка.
- EA71. Способ согласно любому из EA2-EA62, где указанная ТА-связывающая молекула представляет собой B7-H3-связывающую молекулу, содержащую B7-H3-связывающий домен, содержащий вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH), где:
указанный VL содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} последовательности **SEQ ID NO:71**, и указанный VH содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} последовательности **SEQ ID NO:76**.
- EA72. Способ согласно любому из EA2-EA62 или EA71, где указанная ТА-связывающая молекула представляет собой эноблитузумаб.
- EA73. Способ согласно EA72, где указанный эноблитузумаб вводят в дозировке, составляющей от приблизительно 6 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг один раз приблизительно каждые 3 недели.
- EA74. Способ согласно EA73, где эноблитузумаб вводят один раз приблизительно каждые 3 недели в дозе, выбранной из группы, состоящей из: приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг и приблизительно 18 мг/кг.
- EA75. Способ согласно любому из EA73 или EA74, где указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей

приблизительно 600 мг, один раз приблизительно каждые 3 недели, а эноблитузумаб вводят в дозе, составляющей приблизительно 15 мг/кг, приблизительно один раз каждые 3 недели.

- EA76. Способ согласно любому из EA71-EA75, где указанный рак представляет собой рак, экспрессирующий B7-H3.
- EA77. Способ согласно EA76, где указанный B7-H3 экспрессирующий рак представляет собой рак анального канала, SCAC, рак молочной железы, TNBC, рак головы и шеи, SCCHN, рак легких, NSCLC, меланому, увеальную меланому, рак предстательной железы, mCRPC.
- EA78. Способ согласно любому из EA2-EA77, где указанную ТА-связывающую молекулу вводят путем внутривенной (в/в) инфузии.
- EA79. Способ согласно EA78, где указанная в/в инфузия длится в течение периода, составляющего приблизительно 30-240 минут.
- EA80. Способ согласно EA78, где указанная в/в инфузия длится в течение периода, составляющего приблизительно 30-90 минут.
- EA81. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21, EA25-EA80, где указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу и указанную ТА-связывающую молекулу вводят указанному субъекту одновременно в отдельных фармацевтических композициях, причем указанные отдельные композиции вводят в течение 24-часового периода.
- EA82. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21, EA25-EA80, где указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу и указанную ТА-связывающую молекулу вводят последовательно указанному субъекту в отдельных фармацевтических композициях, причем вторую вводимую композицию вводят по меньшей мере через 24 часа после введения первой вводимой композиции.
- EA83. Способ согласно любому из EA1-EA82, где указанный субъект ранее получал терапию CAR T-клетками.

- EA84. Способ согласно любому из EA1-EA6, EA10, EA14-EA21, EA25-EA82, где указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят одновременно или после лечения Т-клеточной терапией CAR.
- EA85. Способ согласно любому из EA1-EA84, где клетки, экспрессирующие LAG-3, присутствуют в биопсии указанного рака до указанного лечения.
- EA86. Способ по любому из EA1-EA85, где клетки, экспрессирующие PD-1, присутствуют в биопсии указанного рака до указанного лечения.
- EA87. Способ согласно EA1-EA86, где совместная экспрессия PD-1 и LAG-3 в биопсии рака до лечения свидетельствует о том, что указанный пациент является подходящим для применения таких способов.
- EA88. Способ согласно EA87, в котором экспрессия представляет собой экспрессию гена.
- EA89. Способ согласно любому из EA1-EA88, где экспрессия PD-L1 на поверхности клеток указанного рака до указанного лечения составляет менее 1%, как определено с использованием комбинированного положительного показателя (CPS) или показателя пропорции опухоли (TPS).
- EA90. Способ согласно любому из EA1-EA89, где указанный субъект ранее не отвечал или проявлял недостаточный ответ по меньшей мере на одно предшествующее лечение.
- EA91. Способ согласно EA90, где по меньшей мере один из указанных предшествующих вариантов лечения представлял собой лечение с помощью PD-1-связывающей молекулой или PD-L1-связывающей молекулой.
- EB1. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула для применения в лечении рака у субъекта, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула предназначена для введения в фиксированной дозе, составляющей от приблизительно 120 мг до приблизительно 800 мг.

- EB2. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB1, где указанный рак характеризуется экспрессией ТА, и где указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу применяют в комбинации с ТА-связывающей молекулой.
- EB3. Комбинация, содержащая:
- (I) ТА-связывающую молекулу; и
 - (II) (а) PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу; или
 - (b) PD-1-связывающую молекулу в комбинации с LAG-3-связывающей молекулой; или
 - (c) PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу; или
 - (d) PD-L1-связывающую молекулу в комбинации с LAG-3-связывающей молекулой,
 для лечения рака, характеризующегося экспрессией указанной ТА.
- EB4. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB2, или комбинация согласно EB3, или комбинация согласно EB7, где указанная ТА-связывающая молекула содержит ADCC-усиленный Fc-домен.
- EB5. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2 или EB4, или комбинация согласно любому из EB2-4, или комбинация согласно любому из EB7-8, где:
- (a) каждая молекула представлена в отдельной композиции; или
 - (b) каждая молекула представлена в одной и той же композиции; или
 - (c) указанная PD-1-связывающая молекула и указанная LAG-3-связывающая молекула представлены в одной композиции, и указанная ТА-связывающая молекула представлена в отдельной композиции; или
 - (d) указанная PD-L1-связывающая молекула и указанная LAG-3-связывающая молекула представлены в одной композиции, и указанная ТА-связывающая молекула представлена в отдельной композиции.
- EB6. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2 или EB4-EB5, или комбинация согласно любому из EB3-5, или комбинация согласно

любому из EB7-EB9, где указанная ТА-связывающая молекула представляет собой антитело.

- EB7. Комбинация согласно любому из EB3-EB6, где указанная PD-1-связывающая молекула представляет собой антитело.
- EB8. Комбинация согласно любому из EB3-EB6, где указанная PD-L1-связывающая молекула представляет собой антитело.
- EB9. Комбинация согласно любому из EB3-EB8, где указанная LAG-3-связывающая молекула представляет собой антитело.
- EB10. Комбинация согласно любому из EB3-EB6, где применяют указанную ТА-связывающую молекулу и указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу.
- EB11. Комбинация согласно любому из EB3-EB9, где указанную ТА-связывающую молекулу и указанную PD-1-связывающую молекулу применяют в комбинации с указанной LAG-3-связывающей молекулой.
- EB12. Комбинация согласно любому из EB3-EB6, в которой применяют указанную ТА-связывающую молекулу и указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу.
- EB13. Комбинация согласно любому из EB3-EB9, в которой применяют указанную ТА-связывающую молекулу и указанную PD-L1-связывающую молекулу в комбинации с указанной LAG-3-связывающей молекулой.
- EB14. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB4-EB6 или комбинация согласно любому из EB4-EB9, где указанный ADCC-усиленный Fc-домен содержит:
 (a) сконструированную гликоформу; и/или
 (b) аминокислотную замену относительно Fc-области дикого типа.
- EB15. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB14 или комбинация согласно EB14, где указанный ADCC-усиленный Fc-домен содержит сконструированную гликоформу, которая представляет собой сложную N-

гликозид-связанную сахарную цепь, которая не содержит фукозу, и/или которая содержит биссекционирующий O-GlcNAc.

EB16. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB14 или EB15, или комбинация согласно EB14 или EB15, где указанный ADCC-усиленный Fc-домен содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из F243L, R292P, Y300L, V305I, I332E и P396L.

EB17. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB14-EB16 или комбинация согласно любому из EB14-EB16, где указанный ADCC-усиленный Fc-домен содержит аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из:

(a) одну замену, выбранную из группы, состоящей из:

F243L, R292P, Y300L, V305I, I332E и P396L;

(b) две замены, выбранные из группы, состоящей из:

(1) F243L и P396L;

(2) F243L и R292P;

(3) R292P и V305I; и

(4) S239D и I332E;

(c) три замены, выбранные из группы, состоящей из:

(1) F243L, R292P и Y300L;

(2) F243L, R292P и V305I;

(3) F243L, R292P и P396L; и

(4) R292P, V305I и P396L;

(d) четыре замены, выбранные из группы, состоящей из:

(1) F243L, R292P, Y300L и P396L; и

(2) F243L, R292P, V305I и P396L; или

(e) пять замен, выбранных из группы, состоящей из:

(1) F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L; и

(2) L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L,

где нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.

- EB18. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB14-EB16 или комбинация согласно любому из EB14-EB16, где указанный ADCC-усиленный Fc-домен содержит аминокислотные замены: L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L, где нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.
- EB19. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB14-EB16 или комбинация согласно любому из EB14-EB16, где указанный ADCC-усиленный Fc-домен содержит аминокислотные замены: S239D и I332E, где нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.
- EB20. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6 или EB14-EB19 или комбинация согласно любому из EB3-EB19, где указанный ТА выбран из **Таблицы 6А** или **Таблицы 6В**.
- EB21. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6 или EB14-EB19 или комбинация согласно любому из EB3-EB19, где указанная ТА-связывающая молекула содержит домены VL и VH антитела, выбранного из **Таблицы 7**.
- EB22. Комбинация согласно любому из EB3-EB7, EB9, EB11 или EB14-EB21, где указанная PD-1-связывающая молекула представляет собой антитело, которое содержит:
- (a) домен VL PD-1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:35**, и домен VH PD-1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:39**;
 - (b) домен VH и VL анти-PD-1 антитела, выбранного из **Таблицы 1**; или
 - (c) легкую цепь и тяжелую цепь анти-PD-1 антитела, выбранного из **Таблицы 1**.
- EB23. Комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB8-EB9 или EB13-EB21, где указанная PD-L1-связывающая молекула представляет собой антитело, которое содержит:

- (a) домен VL PD-L1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:43**, и домен VH PD-L1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:49**;
- (b) домен VH и VL анти-PD-L1 антитела, выбранного из **Таблицы 2**; или
- (c) легкую цепь и тяжелую цепь анти-PD-L1 антитела, выбранного из **Таблицы 2**.

EB24. Комбинация согласно любому из EB3-EB9, EB11 или EB13-EB23, где указанная LAG-3-связывающая молекула представляет собой антитело, которое содержит:

- (a) домен VL LAG-3, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:51**, и домен VH LAG-3, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:55**;
- (b) домен VH и VL анти-LAG-3 антитела, выбранного из **Таблицы 3**; или
- (c) легкую цепь и тяжелую цепь анти-LAG-3 антитела, выбранного из **Таблицы 3**.

EB25. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6 или EB14-EB21 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10 или EB14-EB21, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит:

- (a) домен PD-1 VL, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:35**, и домен PD-1 VH, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:39**, или домен VH и VL анти-PD-1 антитела, выбранного из **Таблицы 7**; и/или
- (b) домен VL LAG-3, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:51**, и домен VH LAG-3, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:55**, или VH и VL домен анти-LAG-3 антитела, выбранного из **Таблицы 9**; или

- (с) молекулу на основе биспецифического антитела, выбранную из
Таблиц 4-5.

EB26. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6 или EB14-EB21 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10 или EB14-EB21, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит:

- (a) PD-1-связывающий домен, содержащий переменный домен легкой цепи ($V_{L\text{PD-1}}$), который содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} последовательности **SEQ ID NO:35**, и переменный домен тяжелой цепи ($V_{H\text{PD-1}}$), который содержит PD-1-специфичные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} последовательности **SEQ ID NO:39**; и
- (b) LAG-3-связывающий домен, содержащий переменный домен легкой цепи ($V_{L\text{LAG-3}}$), который содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} последовательности **SEQ ID NO:51**, и переменный домен тяжелой цепи ($V_{H\text{LAG-3}}$), который содержит LAG-3-специфичные CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} последовательности **SEQ ID NO:55**.

EB27. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB26 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21 или EB25-EB26, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит:

- (a) два из указанных PD-1-связывающих доменов; и
- (b) два из указанных LAG-3-связывающих доменов.

EB28. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB27, или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21 или EB25-EB27, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит домен VL с последовательностью **SEQ ID NO:35** и домен VH с последовательностью **SEQ ID NO:39**.

EB29. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB28, или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21 или EB25-EB28, где указанная PD-1 x LAG-3

биспецифическая молекула содержит домен VL с последовательностью **SEQ ID NO:51** и домен VH с последовательностью **SEQ ID NO:39**.

- EB30. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB29 или комбинация согласно любому из EB2-6, EB10, 12, EB14-EB21 или EB25-EB29, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит Fc-область.
- EB31. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB30 или комбинация согласно EB30, где указанная Fc-область относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.
- EB32. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB30 или EB31, или комбинация согласно любому из EB30 или EB31, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула дополнительно содержит шарнирный домен.
- EB33. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB32 или комбинация согласно EB32, где указанная Fc-область и указанный шарнирный домен относятся к изотипу IgG4, и где указанный шарнирный домен содержит стабилизирующую мутацию.
- EB34. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB30-EB33 или комбинация согласно любому из EB30-EB33, характеризующаяся тем, что указанная Fc-область представляет собой вариант Fc-области, которая содержит:
- (A) одну или более модификаций аминокислот, снижающих аффинность варианта Fc-области в отношении FcγR, и/или
 - (B) одну или более модификаций аминокислот, которые увеличивают время полужизни варианта Fc-области в сыворотке крови.
- EB35. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB34 или комбинация согласно EB34, где указанные модификации, которые снижают аффинность варианта Fc-области в отношении FcγR, включают замену L234A; L235A или

L234A и L235A, где нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.

- EB36. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB34 или EB35, или комбинация согласно любому из EB34 или EB35, где указанные модификации, которые увеличивают время полужизни варианта Fc-области в сыворотке крови, включают замену M252Y; M252Y и S254T; M252Y и T256E; M252Y, S254T и T256E; или K288D и H435K, где нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.
- EB37. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB36, или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21 или EB25-EB36, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит две полипептидные цепи с последовательностью **SEQ ID NO:59** и две полипептидные цепи с последовательностью **SEQ ID NO:60**.
- EB38. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB37 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21 или EB25-EB37, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула предназначена для введения в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 120 мг.
- EB39. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB37, или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21 или EB25-EB37, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула предназначена для введения в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 300 мг.
- EB40. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB37 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21 или EB25-EB37, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная PD-L1 x LAG-3 биспецифическая

молекула предназначена для введения в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 400 мг.

- EB41. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB37 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21 или EB25-EB37, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула предназначена для введения в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг.
- EB42. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB37 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21 или EB25-EB37, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула предназначена для введения в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 800 мг.
- EB43. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB42 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21 или EB25-EB42, где указанная фиксированная доза предназначена для введения один раз приблизительно каждые 2 недели.
- EB44. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB42 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21 или EB25-EB42, где указанная фиксированная доза предназначена для введения один раз приблизительно каждые 3 недели.
- EB45. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21, EB25-EB37, EB40 или EB43 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21, EB25-EB37, EB40 или EB43, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула предназначена для введения в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 400 мг, один раз приблизительно каждые 2 недели.

- EB46. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21, EB25-EB37, EB41 или EB43 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21, EB25-EB37, EB41 или EB43, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула предназначена для введения в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг, один раз приблизительно каждые 2 недели.
- EB47. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21, EB25-EB37, EB41 или EB44 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21, EB25-EB37, EB41 или EB44, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула предназначена для введения в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг, один раз приблизительно каждые 3 недели.
- EB48. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21, EB25-EB37, EB42 или EB44 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21, EB25-EB37, EB42 или EB44, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула предназначена для введения в фиксированной дозе составляющей приблизительно 800 мг, один раз приблизительно каждые 3 недели.
- EB49. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB48 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21, EB25-EB48, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула предназначена для введения путем внутривенной (в/в) инфузии.
- EB50. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB49 или комбинация согласно EB49, где указанная внутривенная (в/в) инфузия длится в течение периода времени, составляющего 30-240 минут.

- EB51. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB49 или комбинация согласно EB49, где указанная внутривенная (в/в) инфузия длится в течение периода времени, составляющего приблизительно 30-90 минут.
- EB52. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB51, или комбинация согласно любому из EB3-EB51, где указанный рак представляет собой рак надпочечников, СПИД-ассоциированный рак, альвеолярную саркому мягких тканей, рак анального канала (включая плоскоклеточную карциному анального канала (SCAC)), рак мочевого пузыря, рак кости, рак головного и спинного мозга, рак молочной железы (включая HER2⁺ рак молочной железы или тройной негативный рак молочной железы (TNBC)), опухоль каротидного тела, рак шейки матки (включая связанный с ВПЧ рак шейки матки), хондросаркому, хордому, хромофобную почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному, рак толстой кишки, колоректальный рак, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпендимому, рак эндометрия (включая неселективный рак эндометрия, рак эндометрия с высоким уровнем MSI, рак эндометрия с дефицитом репарации ошибок репликации (dMMR) и/или положительный рак эндометрия с мутацией в экзонуклеазном домене POLE), саркому Юинга, экстраклеточную миксоидную хондросаркому, рак желчного пузыря или желчного протока (включая холангиокарциному, рак желчных протоков), рак желудка, рак гастроэзофагеального перехода (GEJ), гестационное трофобластическое заболевание, эмбрионально-клеточную опухоль, глиобластому, рак головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN)), гематологическое злокачественное новообразование, гепатоцеллюлярную карциному, инсулиному, саркому Капоши, рак почки, лейкоз (включая острый миелоидный лейкоз), липосаркому/злокачественную липоматозную опухоль, рак печени (включая гепатоцеллюлярную карциному (HCC)), лимфому (включая диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), неходжкинскую лимфому (NHL)), рак легких (включая мелкоклеточный рак легких (SCLC), немелкоклеточный рак легких (NSCLC)), медуллобластому, меланому (включая увеальную меланому), менингиому, карциному Меркеля,

мезотелиому (включая мезотелиальный фарингеальный рак), множественную эндокринную неоплазию, множественную миелому, миелодиспластический синдром, нейробластому, нейроэндокринные опухоли, рак яичников, рак поджелудочной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, парашитовидную опухоль, рак детского возраста, опухоль оболочек периферических нервов, фарингеальный рак, феохромоцитому, опухоль гипофиза, рак предстательной железы (включая метастатический кастрационно-резистентный рак предстательной железы (mCRPC)), потеряльную увеальную меланому, метастатический рак почек, рабдоидную опухоль, рабдомиосаркому, саркому, рак кожи, мелкокруглоклеточную опухоль с окрашиванием в синий цвет у детей (включая нейробластому и рабдомиосаркому), саркому мягких тканей, плоскоклеточный рак, рак желудка, синовиальную саркому, тестикулярный рак, карциному тимуса, тимому, рак щитовидной железы и рак матки.

- EB53. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB52 или комбинация согласно EB52, где указанный рак представляет собой рак анального канала, рак молочной железы, рак желчного протока, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак желудка, рак GEJ, рак головы и шеи, рак печени, рак легкого, лимфому, меланому, рак яичников или рак предстательной железы.
- EB54. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB52 или EB53, или комбинация согласно любому из EB52 или EB53, где указанный рак представляет собой HER2⁺ рак молочной железы или TNBC.
- EB55. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB52 или EB53, или комбинация согласно любому из EB52 или EB53, где указанный рак представляет собой рак желчного протока, холангиокарциному.
- EB56. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB52 или EB53, или комбинация согласно любому из EB52 или EB53, где указанный рак представляет собой рак шейки матки, ассоциированный с ВПЧ.

- EB57. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB52 или EB53 или комбинация согласно любому из EB52 или EB53, где указанный рак представляет собой SCCHN.
- EB58. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB52 или EB53 или комбинация согласно любому из EB52 или EB53, где указанный рак представляет собой HCC.
- EB59. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB52 или EB53 или комбинация согласно любому из EB52 или EB53, где указанный рак представляет собой SCLC или NSCLC.
- EB60. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB52 или EB53 или комбинация согласно любому из EB52 или EB53, где указанный рак представляет собой NHL.
- EB61. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB52 или EB53 или комбинация согласно любому из EB52 или EB53, где указанный рак представляет собой рак предстательной железы.
- EB62. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB52 или EB53 или комбинация согласно любому из EB52 или EB53, где указанный рак представляет собой рак желудка.
- EB63. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB62 или комбинация согласно любому из EB3-EB62, где указанная ТА-связывающая молекула представляет собой HER2-связывающую молекулу, содержащую HER2-связывающий домен, содержащий переменный домен легкой цепи (VL_{HER2}) и переменный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}), где:
- (a) указанный переменный домен легкой цепи (VL_{HER2}) содержит переменный домен легкой цепи маргетуксимаба, содержащий CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} с последовательностью **SEQ ID NO:61**, и указанный переменный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}) содержит

вариабельный домен тяжелой цепи маргетуксимаба, содержащий CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} с последовательностью **SEQ ID NO:66**;

- (b) указанный вариабельный домен легкой цепи (VL_{HER2}) содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} трастузумаба, и указанный вариабельный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}) содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} трастузумаба;
- (c) указанный вариабельный домен легкой цепи (VL_{HER2}) содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} пертузумаба, и указанный вариабельный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}) содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} пертузумаба; или
- (d) указанный вариабельный домен легкой цепи (VL_{HER2}) содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} из hHER2 MAB-1, и указанный вариабельный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}) содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} из hHER2 MAB-1.

EB64. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB63 или комбинация согласно любому из EB3-EB63, где указанная HER2-связывающая молекула представляет собой анти-HER2 антитело.

EB65. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB64 или комбинация согласно EB64, где указанное анти-HER2 антитело представляет собой маргетуксимаб, и где маргетуксимаб предназначен для введения в дозировке, составляющей от приблизительно 6 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг, один раз приблизительно каждые 3 недели.

EB66. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB65 или комбинация согласно EB65, где маргетуксимаб предназначен для введения один раз приблизительно каждые 3 недели в дозе, выбранной из группы, состоящей из приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг и приблизительно 18 мг/кг.

EB67. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB65 или EB66 или комбинация согласно любому из EB65 или EB66, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула предназначена для введения в

фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг, один раз приблизительно каждые 3 недели, а маргетуксимаб предназначен для введения в дозе, составляющей приблизительно 15 мг/кг приблизительно один раз каждые 3 недели.

- EB68. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB63-67 или комбинация согласно любому из EB63-EB67, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная комбинация предназначена для введения с химиотерапевтическим агентом.
- EB69. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB63-EB68 или комбинация согласно любому из EB63-EB68, где указанный рак представляет собой HER2-экспрессирующий рак.
- EB70. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB69 или комбинация согласно EB69, где указанный HER2-экспрессирующий рак представляет собой рак молочной железы, метастатический рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак желудка, рак GEJ, рак яичников, рак поджелудочной железы или рак желудка.
- EB71. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB62 или комбинация согласно любому из EB3-EB62, где указанная ТА-связывающая молекула представляет собой B7-H3-связывающую молекулу, содержащую B7-H3-связывающий домен, содержащий вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH), где:
указанный VL содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} последовательности **SEQ ID NO:71**, и указанный VH содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} последовательности **SEQ ID NO:76**.
- EB72. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21, EB25-EB62 или EB71 или комбинация согласно любому из EB3-62 или EB71, где указанная ТА-связывающая молекула представляет собой эноблитузумаб.

- EB73. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB72 или комбинация согласно EB72, где указанный эноблитузумаб предназначен для введения в дозировке, составляющей от приблизительно 6 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг, один раз приблизительно каждые 3 недели.
- EB74. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB73 или комбинация согласно EB73, где эноблитузумаб предназначен для введения один раз приблизительно каждые 3 недели в дозе, выбранной из группы, состоящей из приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг и приблизительно 18 мг/кг.
- EB75. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB73 или EB74 или комбинация согласно любому из EB73 или EB74, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула предназначена для введения в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг, один раз приблизительно каждые 3 недели, а эноблитузумаб предназначен для введения в дозе, составляющей приблизительно 15 мг/кг, приблизительно один раз каждые 3 недели.
- EB76. D-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB71-EB75 или комбинация согласно любому из EB71-EB75, где указанный рак представляет собой рак, экспрессирующий B7-H3.
- EB77. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB76 или комбинация согласно EB76, где указанный B7-H3-экспрессирующий рак представляет собой рак анального канала, SCAC, рак молочной железы, TNBC, рак головы и шеи, SCCHN, рак легких, NSCLC, меланому, увеальную меланому, рак предстательной железы, mCRPC.
- EB78. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB77 или комбинация согласно любому из EB3-EB77, где указанная ТА-связывающая молекула предназначена для введения путем внутривенной (в/в) инфузии.

- EB79. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB78 или комбинация согласно EB78, где указанная в/в инфузия длится в течение периода времени, составляющего приблизительно 30-240 минут.
- EB80. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB78 или комбинация согласно EB78, где указанная в/в инфузия длится в течение периода времени, составляющего приблизительно 30-90 минут.
- EB81. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB80 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21, EB25-EB80, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула и указанная ТА-связывающая молекула предназначены для одновременного введения указанному субъекту в отдельных фармацевтических композициях, где указанные отдельные композиции предназначены для введения в течение 24-часового периода.
- EB82. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB80 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21, EB25-EB80, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула и указанная ТА-связывающая молекула предназначены для последовательного введения указанному субъекту в отдельных фармацевтических композициях, где вторая вводимая композиция предназначена для введения по меньшей мере через 24 часа после введения первой вводимой композиции.
- EB83. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB82 или комбинация согласно любому из EB3-EB82, где указанный субъект ранее получал терапию CAR Т-клетками.
- EB84. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB83 или комбинация согласно любому из EB3-EB6, EB10, EB14-EB21, EB25-EB82, где указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула предназначена для введения одновременно или после лечения CAR Т-клетками.

- EB85. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB84 или комбинация согласно любому из EB3-EB84, где клетки, экспрессирующие LAG-3, присутствуют в биопсии указанного рака до начала указанного лечения.
- EB86. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB85 или комбинация согласно любому из EB3-EB85, где клетки, экспрессирующие PD-1, присутствуют в биопсии указанного рака до начала указанного лечения.
- EB87. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB1-EB86 или комбинация согласно любому из EB3-EB86, где совместная экспрессия PD-1 и LAG-3 в биопсии рака до начала лечения свидетельствует о том, что такие способы подходят для лечения указанного пациента.
- EB88. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB87 или комбинация согласно EB87, где экспрессия представляет собой экспрессию гена.
- EB89. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB88 или комбинация согласно любому из EB3-EB88, где экспрессия PD-L1 на поверхности клеток указанного рака до начала указанного лечения составляет менее 1%, как определено с использованием комбинированного положительного показателя (CPS) или показателя пропорции опухоли (TPS).
- EB90. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно любому из EB2, EB4-EB6, EB14-EB21 или EB25-EB89 или комбинация согласно любому из EB3-EB89, где указанный субъект ранее не отвечал или демонстрировал недостаточный ответ на по меньшей мере одно предшествующее лечение.
- EB91. PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула согласно EB90 или комбинация согласно EB88, где по меньшей мере один из вариантов предшествующего лечения представляет собой лечение с помощью PD-1-связывающей молекулы или PD-L1-связывающей молекулы.

ПРИМЕРЫ

[00245] Следующие примеры приведены для лучшей иллюстрации заявленного изобретения и не должны быть истолкованы как ограничивающие объем настоящего изобретения. Конкретные материалы, в той степени как они упоминаются в настоящей заявке, предназначены только для целей иллюстрации, но не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Специалист в данной области техники может разработать эквивалентные средства или реагенты, не используя изобретательский потенциал и не выходя за рамки объема настоящего изобретения.

Пример 1 Фаза I исследований

[00246] С целью определения переносимости пациентами DART-I (биспецифическая молекула, связывающая PD-1 и LAG-3, также известная как MGD013 и теботелимаб) проводили I фазу клинического исследования. Исследование включает фазу с повышением дозы и фазу с расширением когорты. Исследование было одобрено экспертными советами медицинских учреждений в каждом месте проведения клинических исследований, и все пациенты подписали письменное информированное согласие.

[00247] Для когорт с повышением начальной дозы и расширенных когорт DART-I вводили один раз в две недели (Q2W). Для целей исследования используется цикл длительностью в восемь (8) недель (56 дней), в котором DART-I вводили один раз в две недели (Q2W), начиная с дня первого дня каждого двухнедельного периода (*то есть*, вводят в день 1 и в дни 15 ± 1 день, 29 ± 1 день и 43 ± 1 день) первого цикла, и один раз в две недели (Q2W), начиная с дня 1 ± 1 день каждого последующего цикла. Пациенты могут получать несколько 8-недельных Q2W циклов лечения в зависимости от переносимости и ответа на исследуемое лечение.

[00248] В дополнительных расширенных когортах DART-I вводили один раз каждые три недели (Q3W). Для целей исследования применяли три (3)-недельных цикла (каждый продолжительностью 21 день). DART-I вводили в день 1 первого цикла и в день 1 ± 3 дня каждого последующего цикла. Пациенты могут получать несколько 3-х недельных (Q3W) циклов лечения в зависимости от переносимости и ответа на исследуемое лечение.

[00249] В когортах комбинированного расширения как DART-I, так и анти-HER2 антитело маргетуксимаб (ТА-связывающая молекула, имеющая ADCC-усиленный Fc-домен) вводили один раз в три недели (Q3W). Для целей исследования применяли три (3)-недельных цикла (каждый из которых составляет 21 день), в которых DART-I и маргетуксимаб вводили в день 1 первого цикла и в день 1 ± 3 дня каждого последующего цикла. Пациенты могут получать несколько 3-х недельных циклов лечения Q3W в зависимости от переносимости и ответа на исследуемое лечение.

[00250] В этих исследованиях дозы DART-I разводили до диапазона концентраций от 0,12 мг/мл до 6,4 мг/мл в физиологическом растворе и вводили в течение приблизительно 60-75 минут внутривенно с использованием коммерчески доступного шприца или инфузионной помпы.

[00251] В этих исследованиях дозы маргетуксимаба разводили до концентрации от 2,4 до 7,2 мг/мл в физиологическом растворе и вводят путем в/в инфузии в течение приблизительно 30-120 минут с использованием коммерчески доступного шприца или инфузионной помпы.

[00252] Противоопухолевую активность оценивали с использованием: обычных критериев оценки ответа при солидных опухолях (RECIST), версия 1.1 (Eisenhauer, E.A., *et al.* (2009) “*New Response Evaluation Criteria In Solid Tumors: Revised RECIST Guideline (Version 1.1)*” Eur. J. Cancer. 45(2):228-247); критерии оценки иммунного ответа при солидных опухолях (irRECIST) (Wolchok, J.D., *et al.*, (2009) “*Guidelines For The Evaluation Of Immune Therapy Activity In Solid Tumors: Immune-Related Response Criteria*. Clin. Cancer Res, 15:7412-7420); или Пересмотренные критерии Международной рабочей группы (*m.e.* Lugano Classification; Cheson, B.D., *et al.*, (2014) “*Recommendations For Initial Evaluation, Staging, And Response Assessment Of Hodgkin And Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification*.” J. Clin. Oncol, 32:3059-3068) для оценки ответа, соответственно.

[00253] В фазе с повышением дозы последовательные повышающиеся фиксированные дозы от 1 мг до 1200 мг вводили один раз в две недели (Q2W) в последовательных когортах от 1 до 6 пациентов, каждую из которых оценивали (**Таблица 8**). При различных уровнях дозы пациентов, которые определены как не поддающиеся оценке для повышения дозы, заменяли. Для получения дополнительных клинических данных в исследование с несколькими искомыми уровнями доз включали дополнительных

пациентов. В фазу с повышением дозы были включены пациенты с неоперабельными, местно-распространенными или метастатическими солидными опухолями любой гистологии. 47 пациентов (49%, исследуемых в контрольных точках) получали лечение с увеличением дозы, и максимально переносимую дозу не определяли.

Таблица 8 – Когорты повышения дозы		
Уровень дозы	Доза DART-I	Когорты
Уровень дозы 1	1 мг	Когорта 1
Уровень дозы 2	3 мг	Когорта 2
Уровень дозы 3	10 мг	Когорта 3
Уровень дозы 4	30 мг	Когорта 4
Уровень дозы 5	120 мг	Когорта 5
Уровень дозы 6	400 мг	Когорта 6
Уровень дозы 7	800 мг	Когорта 7
Уровень дозы 8	1200 мг	Когорта 8

[00254] Основываясь на совокупности клинических данных, полученных в фазе увеличения дозы, включая, но не ограничиваясь указанными, наблюдаемую клиническую активность, занятость периферических рецепторов и фармакокинетику (ФК), в качестве схемы дозирования, оцениваемой в фазе расширения когорты, первоначально была выбрана доза, составляющая 600 мг, вводимая один раз в две недели (Q2W).

[00255] Пациенты с выраженными злокачественными заболеваниями (в том числе: NSCLC (когорты пациентов, ранее получавших лечение в контрольной точке и ранее не получавших лечение в контрольной точке); SCCHN (когорты пациентов, ранее получавших лечение в контрольной точке и ранее не получавших лечение в контрольной точке); SCLC; холангиокарцинома; HCC; рак шейки матки; TNBC; эпителиальный рак яичников (EOC); DLBCL и рак желудка) лечат с помощью DART-I в фиксированной дозе, составляющей 600 мг, вводимой один раз в две недели (Q2W) в начальных когортах в фазе расширения когорты. Частично на основании данных фармакокинетики (ПК) и занятости рецепторов (РО), подробно описанных ниже, дополнительные когорты в фазе расширения когорты (первоначально пациенты с раком желудка, или EOC) получали DART-I в фиксированной дозе, составляющей 600 мг, вводимой один раз в три недели (Q3W).

[00256] В отдельной когорте, включающей пациентов с распространенными или метастатическими солидными опухолями, экспрессирующими опухолевый антиген HER2 (*т.е.* HER2+ солидные опухоли, в частности, HER2+ рак желудка или молочной железы), получали DART-I и маргетуксимаб, вводимые последовательно в один и тот же день. DART-I (300 мг или 600 мг) вводили с последующим введением маргетуксимаба (15 мг/кг) один раз в три недели (Q3W). Эта когорта следовала традиционному подходу 3 + 3, начиная с включения в исследование 3 пациентов при уровне дозы DART-I 300 мг, а затем пациентов, получавших DART-I при уровне дозы 600 мг.

Фармакокинетика (ФК)

[00257] В текущем исследовании оценивали фармакокинетический профиль DART-I в диапазоне режимов дозирования от 1 до 1200 мг 1 раз в 2 недели (Q2W). ФК образцы сыворотки собирали (i) перед введением дозы, (ii) в конце инфузии EOI и (iii) через 2, 4, 24, 72, 168 часов после начала инфузии для первой дозы в день 1 циклов 1-2. Дополнительные ФК образцы сыворотки собирали перед введением дозы и EOI для каждой дополнительной дозы, вводимой во время циклов 1-2, а концентрации DART-I в сыворотке крови человека измеряли с использованием ИФА (ELISA). Вкратце, аналитические планшеты покрывали в течение ночи 2 мкг/мл иммобилизованного антитела (антиидиотипическое антитело, распознающее домен LAG-3 DART-I, «анти-ID»). После блокирования неспецифических сайтов 0,5% бычьим сывороточным альбумином (BSA) в 1X фосфатно-солевом буфере (PBS) с 0,1% Tween-20 планшет инкубировали со стандартными калибраторами DART-I, контрольными образцами качества и исследуемыми образцами. Иммобилизованное анти-ID антитело захватывает DART-I, присутствующий в стандартных калибраторах, контролях качества и исследуемых образцах. Захваченный DART-I обнаруживали путем последовательного добавления 0,25 мкг/мл 2A5-биотина (биотинилированного антитела к ЕК-спирали) с последующим разведением 1:10000 стрептавидина-HRP. Связанную активность HRP количественно определяли по образованию субстратом ELISA PICO люминесцентного света. Интенсивность люминесцентного света измеряли в виде относительной световой единицы (RLU) с помощью считывателя для планшетов Victor X4. Стандартную кривую формировали путем подгонки сигнала RLU от стандартов DART-I к четырехпараметрической логистической модели. Концентрацию DART-I в образцах сыворотки определяли путем интерполяции из стандартной кривой с использованием четырехпараметрической кривой, соответствующей взвешиванию $1/y^2$, которая связывает интенсивность света с концентрацией DART-I.

[00258] Для анализа данных с использованием программы анализа ФК WinNonlin (Phoenix[®] 64 WinNonlin[®], версия 8.0, Certara Inc., Принстон, Нью-Джерси) использовали метод предварительного компартментного моделирования ФК. Используемая модель представляла собой открытую одно- или двухкомpartmentную модель с весовым коэффициентом, обратно пропорциональным квадрату прогнозируемой концентрации.

Указанную модель адаптировали к Циклу 1, Дню 1 (C1D1), первоначальная оценка сгенерирована согласно данным по первой дозе с помощью WinNonlin.

[00259] Сорок пять пациентов (все получали препарат 1 раз в две недели (Q2W)) являлись подходящими для предварительного анализа ФК (по одному пациенту для дозировок 1 и 3 мг Q2W, 4 пациента для дозировки 10 мг Q2W, 5 пациентов для дозировки 30 мг Q2W, 6 пациентов для дозировки 120 мг Q2W, 9 пациентов для дозировки 400 мг Q2W, 8 пациентов для дозировки 600 мг Q2W, 7 пациентов для дозировки 800 мг Q2W, и 4 пациента для дозировки 1200 мг Q2W). ФК профили представлены на **Фигуре 2**.

[00260] ФК параметры обобщены по схеме лечения в **таблице 9**. Эти результаты показали, что воздействие первой дозы DART-I увеличивалось дозозависимым образом. Концентрация $C_{\max}$ DART-I увеличивалась дозопропорционально (наклон: 0,985 [90% доверительный интервал (ДИ): 0,949 – 1,022]), а $AUC_{(INF)}$ для первой дозы увеличивалась более чем дозопропорционально (наклон: 1,345 [90% ДИ: 1,294 – 1,397]) в диапазоне доз от 1 до 1200 мг. Значения общего клиренса (CL) уменьшались с увеличением дозы, а значения как равновесных объемов распределения (V_{ss}), так и периода полувыведения ($t_{1/2}$) увеличивались с увеличением дозы в диапазоне доз от 1 до 1200 мг. Однако CL, V_{ss} и $t_{1/2}$, по-видимому, не зависели от дозы в диапазоне доз от 400 до 1200 мг, хотя при увеличении дозы наблюдались незначительные тенденции. Средний период полувыведения DART-I составлял приблизительно 11 суток, и объем распределения указывает на то, что распределение DART-I ограничено объемом крови.

Таблица 9: Параметры ФК					
DART-I Дозировка (Доза в мг)	C _{max} (мкг/мл)	AUC _(INF) (мкг•ч/мл)	CL (мл/ч)	V _{ss} (мл)	t _{1/2} (h)
	Геометрическое среднее (%CV)	Геометрическое среднее (%CV)	Среднее значение (SD)	Среднее значение (SD)	Среднее значение (SD)
1 Q2W (n=1)	0,4	6	159,4	2358	10,3
3 Q2W (n=1)	1,2	44	68,5	2470	25,0
10 Q2W (n=4)	3,0 (25)	207 (30)	49,9 (13,7)	2818 (700)	40,4 (10,1)
30 Q2W (n=5)	8,0 (13)	590 (26)	52,2 (12,8)	3756 (505)	51,5 (9,8)
120 Q2W (n=6)	32,9 (20)	5503 (8)	21,9 (1,7)	4442 (975)	152,5 (40,9)
400 Q2W (n=9)	119,7 (26)	26213 (41)	16,5 (7,8)	4857 (1866)	247,3 (157,2)
600 Q2W (n=8)	198,7 (26)	50878 (35)	12,5 (5,4)	4515 (1745)	285,3 (116,0)
800 Q2W (n=7)	201,5 (20)	47393 (50)	18,5 (8,2)	6149 (1854)	285,9 (169,3)
1200 Q2W (n=4)	500,0 (18)	121384 (23)	10,1 (2,3)	3888 (1406)	288,3 (106,3)
от 400 до 1200 Q2W В целом (n=28)	NR	NR	14,9 (7,1)	4944 (1845)	273,7 (137,0)

[00261] Сокращения: AUC(INF) - площадь под кривой зависимости концентрации в сыворотке от времени, начиная от нулевого времени, экстраполированная до бесконечного времени; C_{1D1} - день 1 цикла 1; C_{max} - максимальная наблюдаемая концентрация в сыворотке; CL - общий клиренс; CV - коэффициент вариации; GeoMean - среднее геометрическое; N - количество пациентов; NR - не сообщалось; Q2W - один раз в 2 недели; SD - стандартное отклонение; t_{1/2} - период полувыведения; V_{ss} - объем распределения в равновесном состоянии.

Фармакодинамика (ФД)

[00262] Оценивали профиль занятости рецепторов (RO) DART-I в диапазоне доз от 1 до 1200 мг один раз в две недели (Q2W). RO DART-I в каждом образце определяли с помощью флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS). Вкратце, пять аликвот цельной крови на образец распределяли в пять пробирок 12 x 75 мм. К двум из этих аликвот добавляли DART-I - по одному образцу с добавлением предназначены для каждой панели обратного осмоса. После 30-минутной инкубации при комнатной температуре (RT) все аликвоты обрабатывали буфером для лизиса эритроцитов (BD Biosciences) при комнатной температуре без доступа света в течение 15 минут и затем центрифугировали при 1200 об./мин в течение 5 минут. Супернатант удаляли и клеточный осадок, содержащий лейкоциты, промывали 2 мл буфера для окрашивания FBS (BD Biosciences). Две аликвоты (одна из которых с добавлением) окрашивали

панелью антител 1, две аликвоты (одна из которых с добавлением) окрашивали панелью антител 2 (см. **таблицу 10**) и одну аликвоту окрашивали соответствующим изотипическим контролем в общем объеме 100 мкл в течение 30 минут при комнатной температуре без доступа света. Образцы дважды промывали 2 мл буфера FACS. 0,2 мкг стрептавидина, конъюгата R-фикоэритрина (SAPE, Life Technologies) добавляли в аликвоты панели антител 2, которые затем смешивали и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре без доступа света, затем промывали один раз 2 мл буфера FACS. Клетки ресуспендировали в 200 мкл окрашивающего буфера с DAPI (0,1 мкг/мл) (образцы панели 1 и 2) или без DAPI (изотипический образец) и через 10 минут собирали данные на FACS Canto II. Геометрическая средняя интенсивность флуоресценции (gMFI) регистрировали для всей популяции CD4⁺ или CD8⁺ для каналов IgG4 или ЕК для всех временных точек. Образец до введения дозы Цикл1 Днгъ1 (C1D1) считается фоновым и вычитается из всех образцов (образец изотипа используется, если данные по образцу до введения дозы C1D1 недоступны). Занятость рецепторов (RO), выраженная в процентах (%), рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Receptor Occupancy(RO)}_{\text{ЕК or IgG4}} = \frac{\text{gMFI Sample}_{\text{No Spike}} - \text{gMFI Background}}{\text{gMFI Sample}_{\text{Spike}} - \text{gMFI Background}}$$

$$\text{Receptor Occupancy(RO)}_{\text{ЕК or IgG4}} = \frac{\text{gMFI Sample}_{\text{No Spike}} - \text{gMFI Background}}{\text{gMFI Sample}_{\text{Spike}} - \text{gMFI Background}}$$

Таблица 10: Панели антител		
Флуоресцентно меченое антитело/источник	Панель 1 мкл/тест	Панель 2 мкл/тест
Alexafluor 488 (AF488)-конъюгированное анти-PD-1 [неконкурентное]/MacroGenics	5	-
фикоэритрин (PE)-Cy7-конъюгированное анти-LAG-3 [клон 3DS223H] (неконкурентное)/Ebioscience	-	5
Конъюгированное с биотином анти-ЕК [клон 2A5]/MacroGenics	-	10
PE-конъюгированное анти-IgG4 [клон HP6023]/Southern Biotech	2	-
PerCP Cy5.5-конъюгированное анти-CD8 [клон RPA-T8]/BD Biosciences	5	5

Таблица 10: Панели антител		
Флуоресцентно меченое антитело/источник	Панель 1 мкл/тест	Панель 2 мкл/тест
PE-Cy7-конъюгированное анти-CD45RA [клон L48]/BD Biosciences	5	5
АПК-конъюгированное анти-CCR7 [клон G043H7]/BioLegend	5	5
АПК-Cy7-конъюгированное анти-CD4 [клон SK3]/BD Biosciences	5	5
V500-конъюгированное анти-CD3 [клон SP34-2]/BD Biosciences	5	5
Окрашивающий буфер	68	60

[00263] Пятьдесят шесть пациентов (все получали препарат 1 раз в 2 недели (Q2W)) являлись подходящими для предварительного ФД-анализа (по одному пациенту для дозировок 1 и 3 мг Q2W, 4 пациента для дозировки 10 мг Q2W, 5 пациентов для дозировки 30 мг Q2W, 7 пациентов для дозировки 120 мг Q2W, 9 пациентов для дозировки 400 мг Q2W, 16 пациентов для дозировки 600 мг Q2W, 8 пациентов для дозировки 800 мг Q2W, и 6 пациентов для дозировки 1200 мг Q2W). Процент занятости рецепторов (RO) клеток CD4⁺ и CD8⁺ в момент EOI (конец инфузии после введения первой дозы Цикла 1 или Цикла 2) и PRE (до введения следующей дозы) представлен на **Фигурах 3А-3Д**. Связь между концентрацией DART-I и связыванием с клетками CD4⁺ и CD8⁺ исследовали с использованием модели E_{max}: $E = (E_{max} \cdot C) / (EC_{50} + C)$; где E = % связывания, E_{max} = максимальный % связывания, EC₅₀ = концентрация, дающая половину максимального эффекта, и C = концентрация DART-I. Было обнаружено, что DART-I демонстрирует значительную RO с EC₅₀ 0,045 и 0,011 мкг/мл для клеток CD4⁺ и CD8⁺, соответственно. Максимальная RO наблюдалось при дозах ≥ 120 мг во всем интервале дозирования один раз в две недели (Q2W), и 90% от максимального RO достигалось при 0,6 и 0,1 мкг/мл для клеток CD4⁺ и CD8⁺, соответственно.

Моделирование ФК и целевой концентрации

[00264] Дополнительные моделирования ФК, основанные на данных о концентрации в сыворотке пациентов, получавших препарат в дозах от 400 мг до 1200 мг один раз в две недели (Q2W) (n=28) (см. выше, где представлена подробная информация об анализе и моделировании данных), были выполнены для 1-компарментного: V и CL, и для 2-компарментного: V₁, V₂, CL и CLD. Смоделированные медианные профили ФК

многократных доз для доз 400, 600, 800, 1000 и 1200 мг с использованием схем Q2W, Q3W и Q4W (один раз в четыре недели) показаны на **фигурах 4А, 4В и 4С**, соответственно. Как показано на **Фигурах 4А-4С**, медианные профили ФК показали, что целевые минимальные концентрации DART-I ($C_{\text{минимальная}}$) ≥ 23 мкг/мл могут быть получены при введении ≥ 400 мг с использованием схемы Q2W и при введении ≥ 600 мг DART-I с использованием схемы Q3W. Кроме того, все моделируемые дозы и схемы DART-I приводят к тому, что C_{trough} DART-I $\geq 100 \times RO$ EC₅₀ составляет 4,5 мкг/мл.

[00265] Эти исследования подтверждают использование ряда доз и схем для достижения целевой пороговой минимальной концентрации (23 мкг/мл). Эти исследования подтверждают эффективность схемы дозирования, которая включает введение количества большего или равного 400 мг PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы согласно настоящему изобретению один раз в две недели (Q2W), и, в частности, эффективность схемы дозирования, которая включает введение приблизительно 600 мг PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы согласно настоящему изобретению один раз в две недели (Q2W). Эти исследования также, в частности, подтверждают эффективность схемы дозирования, которая включает введение количества, большего или равного 600 мг, PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы согласно настоящему изобретению один раз в три недели (Q3W). Кроме того, как отмечалось выше, максимальная RO наблюдалась при дозах ≥ 120 мг при всей схеме дозирования Q2W. Таким образом, эти исследования подтверждают эффективность схемы дозирования, которая включает введение $\geq$ приблизительно 120 мг один раз в две недели (Q2W) для обеспечения целевой минимальной концентрации PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы согласно настоящему изобретению, достаточной для достижения максимальной RO.

Обобщенная информация о первичных клинических результатах

[00266] Представлены результаты после лечения первоначальных 188 пациентов (47 пациентов (49% ранее получавших лечение) в ходе исследования с эскалацией дозы Q2W и последующих 141 пациента (33% ранее получали лечение) в ходе исследования с расширением когорты Q2W). Связанные с лечением нежелательные явления (TRAE) возникли у 117/188 (62,2%) пациентов, чаще всего утомляемость (n=33) и тошнота (n=20). Частота TRAE ≥ 3 степени составила 19,7%. Нежелательные явления, связанные с иммунной системой, соответствовали явлениям, наблюдаемым для анти-PD-1 антител.

Средний период полувыведения составлял приблизительно 11 дней; анализы цитометрии периферической крови подтвердили полное и устойчивое целевое связывание во время лечения с использованием доз ≥ 120 мг.

[00267] Среди первых 39 пациентов, у которых оценивали ответ в исследовании с повышением дозы, получавших монотерапию DART-I в дозах в диапазоне от 1 до 1200 мг один раз в неделю (Q2W), наблюдались 3 подтвержденных частичных ответа (PR) у пациентов с тройным негативным раком молочной железы (TNBC), мезотелиомой или раком желудка) согласно RECIST 1.1, в то время как у 19 пациентов наблюдалось заболевание в стадии стабилизации. Несмотря на то, что исследование продолжается и данные набираются, на **Фигуре 5** представлен каскадный график, демонстрирующий процент снижения целевых поражений среди 120 пациентов, у которых оценивали ответ в исследовании с расширением когорты, получавших монотерапию DART-I в дозе, составляющей 600 мг, один раз в две недели (Q2W). Среди расширенных когорт для монотерапии солидных опухолей (*т.е.* исключая диффузную В-крупноклеточную лимфому [DLBCL]) на дату исследования наблюдалось 7 объективных ответов по RECIST 1.1 (3 подтвержденных/4 неподтвержденных), включая 6 частичных ответов (PR) (рак яичников, NSCLC и TNBC [каждый n=2] и 1 полный ответ [CR] (NSCLC). У 51 пациента наблюдалось заболевание в стадии стабилизации. Дальнейшие результаты от 75 пациентов, у которых оценивали ответ в расширенных когортах TNBC, EOC, NSCLC (ранее не получавших ингибитор контрольных точек (CPI) и ранее получавшие PD-1) приведены в **таблице 11**.

Таблица 11: Обобщенные данные о частоте ответа (75 оцениваемых пациентов) - монотерапия				
	TNBC	EOC	NSCLC (не получавшие CPI)	NSCLC получавшие PD1
Пациенты, подлежащие оценке	23	23	14	15
ЧОО (подтвержденные)	4,3% (1/23)	8,7% (2/23)	14,3% (2/14)	0% (0/15)
ЧОО (подтвержденные и неподтвержденные)	17,4% (4/23)	8,7% (2/23)	21,4% (3/14)	13,3% (2/15)
SD	34,8 (8/23)	43,5 (10/23)	50% (7/14)	53,3% (8/15)
DCR	39,1% (9/23)	52,2 (12/23)	64,3% (9/14)	53,3% (8/15)

[00268] В когорте расширения DLBCL среди 2 оцениваемых пациентов наблюдались 1 полный ответ (CR) и 1 частичный ответ (PR) в соответствии с классификацией Lugano. В частности, у пациентов с DLBCL после рецидива CAR T-клеток, нацеленных на CD19, наблюдался полный ответ (CR) после однократной инфузии DART-I (600 мг). Пациенты с NSCLC, не получавшие ранее ингибиторы контрольных точек (после лобэктомии и лечения карбоплатином + пеметрекседом), демонстрировали полный ответ (CR) после 8-недельного цикла (четыре введения DART-I 600 мг 1 раз в две недели (Q2W)). Дальнейшие результаты у 13 пациентов, у которых оценивали ответ в расширенной когорте с DLBCL, приведены в **таблице 12**. В этой более крупной группе, 7 пациентов демонстрировали ответ, включая активированные В-клетки (ABC), В-клетки зародышевого центра (GCB) и молекулярные подтипы с двойным попаданием (MYC/BCL2). Продолжительность ответа варьируется от 1 (данные второго сканирования ожидаются) до 168 дней, при этом 6 из 7 демонстрирующих ответ, продолжают отвечать. Монотерапия, как правило, хорошо переносилась у пациентов с R/R DLBCL, ранее получавших интенсивное лечение. Реакции, связанные с инфузией, поддавались контролю, и признаков синдрома распада опухоли выявлено не было. Эти результаты демонстрируют противоопухолевую активность у пациентов с R/R DLBCL, ранее получавших и не получавших CAR T, представляющих различные молекулярные подтипы с предварительным ЧОО: 53,8%.

Таблица 12 Обобщенные данные о частоте ответа (13 оцениваемых пациентов) - монотерапия			
	Количество (%) пациентов, подходящих для оценки ответа †		
	После CAR-T (N=6)	Не получавшие CAR T (N=7)	Всего (N=13)
Лучший общий ответ‡			
Полный ответ (CR)	2 (33,3)	0 (0)	2 (15,4)
Частичный ответ (PR)	0 (0)	5 (71,4)	5 (38,5)
Заболевание в состоянии стабилизации	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Прогрессирующее заболевание	4 (66,7)	2 (28,6)	6 (46,2)
ОЧЧ, n (%)	2 (33,3)	5 (71,4)	7 (53,8)
DCR, n (%)	2 (33,3)	5 (71,4)	7 (53,8)

† пациенты, получившие по меньшей мере одну оценку опухоли после исходного уровня, исключая 3 пациентов, которые прекратили лечение до первого сканирования из-за смерти (n=2) и побочных эффектов (n=1)

‡ оценка опухоли по классификации Lugano

[00269] В когорте пациентов с HER-2+ опухолями, получавшими DART-I в комбинации с анти-HER-2 антителом (маргетуксимаб), у двух пациентов с HER2+ раком молочной железы наблюдались частичные ответы (ЧО), один из которых был подтвержден, а другой не был подтвержден, среди первых 5 пациентов, получавших лечение, у которых оценивали ответ. В частности, у пациента, ранее получавшего интенсивное лечение рака молочной железы, с обширным поражением грудной стенки и метастазами в печени и легких, через две недели после однократного введения комбинации наблюдалась резкая регрессия заболевания с ЧО, продемонстрированном при первой оценке заболевания во время лечения. Кроме того, объективные ответы наблюдались у нескольких пациентов после предшествующей терапии анти-PD-1. Дополнительные результаты для комбинированной когорты представлены ниже.

[00270] Образцы для биопсии опухоли до лечения оценивали как в отношении экспрессии LAG-3, так и в отношении экспрессии PD-L1. Вкратце, экспрессию LAG-3 исследовали с использованием иммуногистохимических анализов (ИHC) клона LAG-3 Ab EPR4392(2) (Abcam) на платформе Ventana Discovery Ultra. Положительную реакцию определили в виде по меньшей мере одного LAG-3+ve опухоле-инфильтрирующего лимфоцита (TIL) на 40-кратное увеличение поля «горячих точек» (HSF). Экспрессию PD-L1 TPS/CPS определяли в соответствии с инструкциями к набору Agilent PD-L1 (22C3) pharmDx. В контексте настоящей заявки «-ve» означает «отрицательный», а «+ve» означает «положительный».

[00271] Проводили ретроспективную иммуногистохимию (ИHC). Вкратце, архивные биопсии из расширенных когорт TNBC, EOC и NSCLC анализировали в отношении LAG-3 (N=46) или PD-L1 (N = 45) с помощью ИHC. ИHC анализы LAG-3 Ab клона EPR4392 (2) (Abcam) проводили на платформе Ventana Discovery Ultra. Показатель LAG-3 определяли путем расчета среднего значения клеток LAG-3+ на 40x поле в 5 LAG-3+ горячих точках. Экспрессию PD-L1 определяли с помощью набора Agilent PD-L1 (22C3) pharmDx; TPS (NSCLC) рассчитывали в соответствии с руководством по интерпретации, а CPS (EOC, TNBC) рассчитывали следующим образом: количество клеток PD-L1 +

(опухолевых и иммунных)/общее количество жизнеспособных опухолевых клеток $\times 100$. CPS <1 или TPS $<1\%$ считали отрицательным. Индивидуальные показатели LAG-3 и PD-L1 пациента с указанными клиническими ответами представлены на **Фигурах 6А и 6В** соответственно. Показатели LAG-3 в зависимости от клинического ответа, представлены на **Фигуре 6С**.

[00272] Дополнительный ИHC анализ проводили на биопсиях, полученных от пациента с DLBCL (рецидив после лечения CAR Т-клетками, нацеленными на CD19), у которого наблюдался полный ответ после однократной дозы DART-I. Образцы для биопсии лимфатических узлов до и после лечения CAR-T клетками (до обработки DART-I) оценивали в отношении экспрессии CD3 (маркер Т-клеток), CD79a (маркер В-клеток) и PD-1 и LAG-3 с помощью мультиплексного окрашивания IF (флуоресценция) с использованием платформы для анализа изображений HALO®. Окрашивание DAPI использовали для определения общего количества клеток и количества клеток, положительных для каждого маркера. Количество одиночных, двойных и тройных положительных клеток в процентах от клеток, окрашенных DAPI, представлено в **Таблице 13** и показывает, что количество клеток, положительных по PD-1 и/или LAG-3 и/или CD3, было значительно выше после терапии CAR Т-клетками. Экспрессия LAG-3 была самой высокой, наблюдаемой в биопсиях, рассмотренных в этом исследовании.

Таблица 13 Обобщенная информация по одиночным, двойным и тройным положительным клеткам		
Окрашивание	Pre-CAR Т-клетки	Post-CAR Т-клетки
	% от общего количества клеток DAPI	% от общего количества клеток DAPI
PD-1+ve клетки	0,1	34,0
LAG-3+ve клетки	0,0	26,7
CD3+ve клетки	0,0	51,9
CD79a+ve клетки	12,5	11,3
Двойные PD-1+ve/LAG-3+ve клетки	0,0	19,2
Двойные PD-1+ve/CD3+ve клетки	0,0	28,6
Двойные PD-1+ve/CD79a+ve клетки	0,05	7,1
Двойные LAG-3+ve/CD3+ve клетки	0,0	21,2
Двойные LAG-3+ve/CD79a+ve клетки	0,0	5,1
Двойные CD3+ve/CD79a+ve клетки	0,003	7,9
Тройные CD3+ve/LAG-3+ve/PD-1+ve клетки	0,0	16,7

Тройные CD79a+ve/PD-1+ve/LAG-3+ve клетки	0,0	4,5
--	-----	-----

[00273] Дополнительные биопсии перед лечением, полученные из расширенной когорты DLBCL (N = 11), анализировали в отношении экспрессии LAG-3 и PD-L1 с помощью иммуногистохимии (ИHC), по существу, как описано выше. Результаты показаны на **Фигурах 6D и 6E**. На **фигуре 6D** показан порядок экспрессии LAG-3 у отдельных пациентов от высокого до низкого, при этом отвечающие в зависимости от диапазона экспрессии LAG-3 указаны справа. Кроме того, показатель PD-L1 (CPS), указан в ячейках под графиком. На **Фигуре 6E** показана экспрессия LAG-3 в зависимости от объективного ответа. Эти результаты показывают, что пациенты с DLBCL, демонстрирующие более высокие исходные уровни LAG-3, по-видимому, демонстрируют улучшенный ответ.

[00274] С помощью анализа NanoString PanCancer IO 360™ исследовали экспрессию генов, включая обилие 14 типов иммунных клеток и 32 иммуноонкологические сигнатуры из архивных биопсий ЕОС (N= 14) NSCLC (N= 25, включая расширенные когорты после предшествующего лечения ингибитором контрольной точки (P-NSCLC)) и TNBC (N=13). График экспрессия LAG-3 по сравнению с PD-1 (PDCD1) представлен на **Фигуре 7** и демонстрирует, что у отвечающих на лечение пациентов наблюдаются более высокие уровни экспрессии как LAG-3, так и PD-1 (обозначенные пунктирным кругом). Показатели сигнатуры гена IFN-γ (CXCL9, CXCL10, CXCL11, STAT1) в зависимости от клинического ответа показаны на графике на **Фигуре 8** и указывают на то, что пациенты, демонстрирующие частичный ответ, имеют более высокие показатели сигнатуры гена IFN-γ. Эти исследования показывают, что объективные ответы связаны с высокими исходными показателями экспрессии LAG-3/PD-1 и сигнатуры гена IFN-γ.

[00275] Эти данные показывают, что PD-1 x LAG-3 биспецифические молекулы согласно настоящему изобретению (проиллюстрированные DART-I), которые сконструированы для координированного блокирования PD-1 и LAG-3, демонстрируют приемлемый профиль безопасности и демонстрируют обнадеживающие свидетельства противоопухолевой активности, в частности, у пациентов с опухолями, которые демонстрируют более высокие уровни экспрессии LAG-3, и у тех, которые имеют более высокие показатели сигнатуры гена IFN-γ. Эти данные подтверждают эффективность нескольких схем дозирования для таких молекул (и DART-I, в частности), включая

введение: приблизительно ≥ 400 мг таких молекул (и DART-I, в частности) один раз в две недели (Q2W) (в частности, приблизительно 400 мг один раз в две недели (Q2W) или приблизительно 600 мг один раз в две недели (Q2W)) и приблизительно ≥ 600 мг таких молекул (и DART-I, в частности) один раз в три недели (Q3W) (в частности, приблизительно 600 мг один раз в три недели (Q3W) или приблизительно 800 мг один раз в три недели (Q3W)) для достижения целевого значения $C_{\text{trough}} \geq 23$ мкг/мл. Альтернативные схемы дозирования включают: приблизительно ≥ 120 мг таких молекул один раз в две недели для достижения целевого значения $C_{\text{trough}} \geq 100 \times \text{RO EC}_{50}$. Эти исследования дополнительно подтверждают эффективность введения PD-1х LAG-3 биспецифической молекулы согласно настоящему изобретению в соответствии с любой из вышеуказанных доз и схем в комбинации с ТА-связывающей молекулой и, в частности, HER2-связывающей молекулой (*например*, анти-HER2 антителом) для лечения HER2-экспрессирующих (HER2⁺) видов рака. В частности, введение приблизительно ≥ 600 мг такой молекулы (и DART-I, в частности) с применением схемы Q3W в комбинации с ТА-связывающей молекулой, такой как HER2-связывающая молекула, которая также может быть введена с использованием схемы Q3W (*например*, маргетуксимаб, вводимый в дозе 15 мг/кг Q3W).

Пример 2

Опосредованные ТА-связывающей молекулой изменения в контрольной точке Экспрессия и активность НК-клеток

[00276] Способность ТА-связывающих молекул, содержащих ADCC-усиленные Fc-домены и Fc-домены дикого типа, опосредовать изменения экспрессии молекул контрольных точек на поверхности иммунных эффекторных клеток, в частности, НК-клеток, оценивали в условиях *in vitro*. Кроме того, изучали влияние на цитотоксическую активность в условиях *in vitro* (в частности, цитотоксическую активность НК-клеток). Вкратце, эффекторные клетки МКПК ($0,5 \times 10^6$ /мл) совместно инкубировали с клетками-мишенями N87 ($0,05 \times 10^6$ /мл) (соотношение Е:Т составляло 10:1), которые являются положительными для ТА HER2 (линии клеток рака желудка HER2⁺⁺) в присутствии маргетуксимаба (ТА-связывающая молекула, которая связывает эпитоп HER2 и содержит ADCC-усиленный Fc-домен, *то есть* ADCC-усиленная ТА-связывающая молекула), реплики трастузумаба («трастузумаб», который связывает тот же эпитоп HER2, но содержит Fc-домен дикого типа) или только PBS (физиологический раствор с фосфатным буфером). Антитела применяли в концентрации 0,005 мкг/мл и

0,05 мкг/мл и добавляли в культуру IL-2 в концентрации 20 мкг/мл. В качестве культуральной среды использовали среду RPMI 1640 с L-глутамином, дополненным 10% FBS, 10 mM буфером HEPES и пенициллин-стрептомицином.

[00277] На 3-й день часть каждого образца удаляли, а экспрессию белков контрольной точки: CD137, LAG-3, PD-1 и PD-L1 на поверхности НК-клеток исследовали с помощью сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Для определения подмножеств иммунных клеток и экспрессии белков контрольных точек клеточной поверхности использовали следующие антитела: CD3-V500, CD4-PerCP Cy5.5, CD8-FITC, CD56-PE, Lag-3-PE-Cy7, PDL-1-APC, CD137-BV421, PD-1-BV650. Окрашивание клеточной поверхности проводили путем инкубации клеток с коктейлем антител в течение 30 минут при 4°C в буфере FACS с последующей промывкой PBS, затем меченые клетки ресуспендировали в буфере FACS. Образцы FACS отбирали с помощью проточного цитометра LSRFortessa и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo. Репрезентативные изображения FACS показаны на **Фигуре 11** с НК-клетками, положительными по контрольным точкам, представленные в рамках и показанным процентом. Как показано на **Фигуре 11**, маргетуксимаб положительно регулировал экспрессию CD137, LAG-3 и PD-L1 в большей степени, чем ртрасузумаб.

[00278] На 6-й день часть оставшегося образца использовали для обеспечения эффекторных клеток для анализа цитотоксичности с использованием клеток K562, меченных PKH26 красным (линия клеток HER2-, миелогенного лейкоза), в качестве клеток-мишеней при соотношениях Е:Т 0,3:1, 1:1, 3:1 и 10:1. После 4-часовой инкубации клетки собирали и определяли цитотоксичность с помощью FACS-анализа 7-AAD и аннексина V в качестве маркеров для различения живых, апоптотических и мертвых клеток в соответствии с инструкциями производителя. Процент цитотоксичности, наблюдаемый при каждом соотношении Е:Т, показан на **Фигуре 12**. Поскольку клетки-мишени K562 не экспрессируют HER2, уничтожение в этом анализе не опосредовано непосредственно связыванием анти-HER2 с клетками-мишенями K562, а скорее отражает усиление цитотоксической активности (в первую очередь НК-клеток), опосредованное предшествующим воздействием анти-HER2 антител в присутствии ТА-положительных клеток-мишеней. Как показано на **Фигуре 12**, маргетуксимаб опосредует большее усиление цитотоксической активности НК-клеток по сравнению с

ртрастузумабом. Эти результаты указывают на то, что ТА-связывающие молекулы, содержащие ADCC-усиленные Fc-домены, являются более эффективными медиаторами экспрессии PD-L1 и LAG-3 и цитотоксической активности (главным образом, НК-клетки).

[00279] Исследовали способность ADCC-усиленных ТА-связывающих молекул опосредовать изменения в экспрессии молекул контрольных точек на поверхности дополнительных типов иммунных клеток. Вкратце, эффекторные клетки МКПК ($1,5 \times 10^6/\text{мл}$) совместно инкубировали с клетками-мишенями N87 (линия клеток HER2⁺⁺ рака желудка) в соотношении 15:1 Е:Т в присутствии маргетуксимаба (0,5 мкг/мл) или контрольного антитела (MGAWN1, 0,5 мкг/мл). В качестве культуральной среды использовали среду RPMI 1640 с L-глутамином, дополненную 10% FBS, 10 mM буфером HEPES и пенициллин-стрептомицином. В дни 2 и 3 экспрессию белков контрольной точки на клеточной поверхности: CD137, LAG-3, PD-1 и PD-L1 на НК-клетках (день 3), моноцитах (день 2), CD4⁺ (день 3) и CD8⁺ Т-клетках (день 3) исследовали с помощью FACS. Следующие антитела (Abs) применяли для определения подмножеств иммунных клеток и экспрессии белков контрольных точек клеточной поверхности: CD3-V500, CD4-PerCP Cy5.5, CD8-FITC, CD14-FITC, CD56-PE, Lag-3-PE-Cy7, PDL-1-APC, CD137-BV421, PD-1-BV650. Окрашивание клеточной поверхности проводили путем инкубации клеток с коктейлем антител в течение 30 минут при 4°C в буфере FACS с последующей промывкой PBS, затем меченые клетки ресуспендировали в буфере FACS. Образцы FACS получали с помощью проточного цитометра LSRFortessa и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo. Репрезентативные изображения FACS показаны на **Фигуре 13** с иммунными клетками, положительными по контрольным точкам, представленные в рамках и показанным процентом. Как показано на **Фигуре 13**, ADCC-усиленная ТА-связывающая молекула маргетуксимаба опосредовала повышение уровня экспрессии LAG-3 и PD-L1 на всех исследуемых типах клеток, причем наиболее выраженное повышение уровня экспрессии наблюдалось на моноцитах, НК-клетках и CD8 Т-клетках. CD137 повышающе регулировались на НК, а PD-1 повышающе регулировались как на CD4⁺, так и на CD8⁺ Т-клетках.

Пример 3

исследования комбинации в условиях *in vitro*

[00280] Как описано выше, было обнаружено, что ТА-связывающие молекулы в целом и, в частности, те, которые имеют ADCC-усиленные Fc-домены, эффективно опосредуют повышающую решуляцию молекул контрольных точек PD-L1 и LAG-3. Активность ТА-связывающей молекулы в комбинации с ингибитором контрольных точек, который блокирует ингибиторные пути контрольных точек LAG-3 и/или PD-1/PD-L1, исследовали в условиях *in vitro*. Вкратце, эффекторные клетки МКПК ($0,5 \times 10^6$ /мл) совместно инкубировали с клетками-мишенями N87 (клеточная линия HER2⁺⁺⁺ рака желудка) в соотношении 20:1 в присутствии ТА-связывающей молекулы маргетуксимаба (содержащего ADCC-усиленный Fc-домен) или ртрастузумаба (содержащего Fc-домен дикого типа), контрольного антитела (MGAWN1, анти-WNV антитела (mAb), содержащего Fc-домен IgG1 человека дикого типа) или PBS, отдельно или в комбинации с ретифанлимабом (PD-1-связывающая молекула), DART-I (биспецифическая молекула, которая связывает как PD-1, так и LAG-3). Анализы проводили с экзогенным IL-2 или без него (20 ед/мл) (представляя оптимальные и субоптимальные условия). Анти-HER2 антитела применяли в концентрации 0,005 мкг/мл и/или 0,05 мкг/мл, анти-PD-1 антитело ретифанлимаб применяли в концентрации 5 мкг/мл, PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу DART-I применяли в концентрации 5 мкг/мл. На 6-й день клетки собирали в качестве эффекторов, и определяли цитотоксичность по отношению к клеткам-мишеням K562 (E:T=10:1) с помощью FACS с применением 7-AAD и аннексина V в качестве маркеров для различения живых, апоптотических и мертвых клеток, необходимых, как описано выше. Процент цитотоксичности, наблюдаемый для субоптимального состояния от типичного донора, показан на **Фигуре 14**.

[00281] Как показано на **Фигуре 14**, в этом анализе наблюдалось минимальное усиление цитотоксичности при применении ртрастузумаба в комбинации с ингибитором контрольной точки PD-1, ретифанлимабом или с двойным ингибитором контрольной точки PD-1 x LAG-3 DART-I. Напротив, двойной ингибитор контрольных точек PD-1 x LAG-3 DART-I усиливал цитотоксичность в комбинации с ТА-связывающей молекулой, имеющей ADCC-усиленный Fc-домен, маргетуксимаб. У некоторых доноров

наблюдали, что ингибитор контрольных точек PD-1, ретинфанлимаб, также усиливал цитотоксичность маргетуксимаба.

[00282] В другом исследовании дополнительно изучали активность ADCC-усиленной ТА-связывающей молекулы, отдельно или в комбинации с двойным ингибитором контрольных точек PD-1 x LAG-3 DART-I. Вкратце, эффекторные клетки МКПК (1×10^6 /мл) совместно инкубировали с клетками-мишенями N87 (клеточная линия HER2⁺⁺⁺ рака желудка) в соотношении 15:1 в присутствии ТА-связывающей молекулы маргетуксимаба (0,005 мкг/мл) или контрольного антитела (MGAWN1, 0,005 мкг/мл) отдельно или в комбинации с DART-I (5 мкг/мл). Анализы проводили с экзогенным IL-2 или без него (20 ед/мл) (представляя оптимальные и субоптимальные условия). На 7-й день клетки собирали в качестве эффекторов, и определяли цитотоксичность по отношению к меченым PKH26 красным клеткам-мишеням K562 (E:T=10:1) с помощью FACS, используя 7-AAD и аннексин V в качестве маркеров для различения живых, апоптотических и мертвых клеток, в соответствии с инструкциями производителя. Цитотоксичность по отношению к клеткам, экспрессирующим люциферазу N87 (E:T=3:1), определяли путем оценки оставшейся клеточной активности люциферазы с использованием системы анализа люциферазы Steady-Glo (Promega). Цитотоксичность в процентах, наблюдаемая для субоптимального состояния от типичного донора, показана на **Фигуре 15**. Как показано на **Фигуре 15**, МКПК, кондиционированные ADCC-усиленной ТА-связывающей молекулой маргетуксимаба, проявляли более высокую цитотоксическую активность (в первую очередь, NK-клетки) в отношении как клеток K562, так и клеток HER2⁺⁺⁺ N87, опсонизированных маргетуксимабом, по сравнению с МКПК, кондиционированными контрольным антителом. Как показано выше, PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула, DART-I, усиливала цитотоксичность в комбинации с ADCC-усиленной ТА-связывающей молекулой маргетуксимабом. Вместе эти исследования показывают, что двойное ингибирование контрольных точек путей контрольных точек PD/PD-L1 и LAG-3 может синергизировать с противоопухолевой активностью ТА-связывающей молекулы (в частности, обладающей повышенной активностью ADCC).

Пример 4
Фаза I клинических исследований - группа HER2+

[00283] Как описано выше, в когортах продолжающегося клинического исследования фазы I пациентов с распространенными или метастатическими солидными опухолями HER2+ (в частности, раком желудка или молочной железы HER2+) пациенты получают DART-I (биспецифическая молекула, которая связывается с PD-1 и LAG-3) и маргетуксимаб (ТА-связывающая молекула, которая связывается с HER2 и имеет ADCC-усиленный Fc-домен).

[00284] Клинические результаты у 28 оцениваемых пациентов (включая первые 5 пациентов, описанных выше) с солидными опухолями HER2+ обобщены на **Фигуре 16**. Частота объективного ответа (ЧОО) (включая пациентов с неподтвержденными объективными ответами) составила 28,6% (8/28) с частотой контроля заболевания 50% (14/28). **В таблице 14** обобщены показатели ответа среди этих пациентов по типу рака. ЧОО 28,65% является благоприятным по сравнению с исследованием ПАНАЦЕИ (Loi, et al. 2019 Lancet Oncol. Mar;20(3): 371-382. doi: 10.1016/S1470-2045 (18) 30812-X.) с зарегистрированной ЧОО 11,5% (n=52) в одной группе, многоцентровое исследование Ph. 1b/2 пембролизумаба + трастузумаба в HER2+ mBC (15% ЧОО в PD-L1-положительном (n=6/40); и 0% ЧОО в PD-L1-отрицательном (n=0/12). Лечение хорошо переносилось отвечающими пациентами, продолжавшими терапию, и дальнейшее включение в исследование HER2+ опухолеспецифичных пациентов продолжается.

Таблица 14 Обобщенные данные о частоте ответа (28 оцениваемых пациентов) - комбинированная терапия					
	Рак молочной железы	GEJ Рак пищевода	Колоректальный рак	Другое	Всего
Пациенты, подлежащие оценке	9	7	4	8	28
ЧОО (подтвержденные)	22,2% (2/9)	14,3% (1/7)	50% (2/4)	12,5% (1/8)	21,4% (6/28)
ЧОО (подтверждено + не подтверждено)	22,2% (2/9)	28,6% (2/7)	50% (2/4)	25% (2/8)	28,6% (8/28)

Частота контроля заболевания	44,4% (4/9)	57,1% (4/7)	50% (2/4)	50% (4/8)	50% (14/28)
------------------------------	-------------	-------------	-----------	-----------	-------------

[00285] Доступные образцы для биопсии опухоли до начала лечения оценивали как на экспрессию LAG-3, так и на экспрессию PD-L1. Вкратце, экспрессию LAG-3 исследовали с использованием иммуногистохимических анализов (ИНС) клонa LAG-3 Ab EPR4392(2) (Abcam) на платформе Ventana Discovery Ultra. Положительную реакцию определили в виде по меньшей мере одного LAG-3+ve опухоль-инфильтрирующего лимфоцита (TIL) на 40-кратное увеличение поля «горячих точек» (HSF). Экспрессию PD-L1 TPS/CPS определяли в соответствии с инструкциями к набору Agilent PD-L1 (22C3) pharmDx. Экспрессия LAG-3, определенная с помощью ИНС, варьировала у пациентов и не было обнаружено, что она коррелировала с ответом. Было обнаружено, что у большинства отвечавших пациентов опухоли были PD-L1-отрицательными по данным ИНС (экспрессия PD-L1 ≤ 1). Высокая частота ответа среди PD-L1-отрицательных пациентов в таком комбинированном исследовании с использованием двойного ингибирования контрольных точек PD-1 и LAG-3 в комбинации с ТА-связывающей молекулой, имеющей ADCC-усиленный Fc-домен, отличается от опубликованных данных (см., например, Loi, S. *et al.* (2019) “*Pembrolizumab Plus Trastuzumab In Trastuzumab-Resistant, Advanced, HER2-positive Breast Cancer (PANACEA): a Single-Arm, Multicentre, Phase 1b-2 Trial*,” *Lancet Oncol.* 20(3):371-382), которые показывают, что частота ответа среди пациентов с HER2+ раком молочной железы, получавших лечение трастузумабом и анти-PD-1 или анти-PD-L1 антителами, составляет 0% среди PD-L1-отрицательных пациентов и только 15% среди PD-L1-положительных пациентов. Сильный ответ, вероятно, отражает синергическую активность объединения ADCC-усиленной ТА-связывающей молекулы с двойным ингибированием контрольных точек путей контрольных точек PD/PD-L1 и LAG-3.

[00286] С помощью анализа NanoString PanCancer IO 360™ исследовали экспрессию генов, в том числе обилие 14 типов иммунных клеток и 32 иммуноонкологических сигнатур, из архивных биопсий 19 HER2+ расширенных когорт солидных опухолей, получавших лечение маргетуксимабом и DART-I. Нормализованные показатели экспрессии (стандартизованные 0-100) для LAG-3 наносили на график против PDCD1 (**Фигура 17А**). Корреляция стандартизованных уровней экспрессии LAG-3 и PDCD1 с наилучшим процентным изменением целевых очагов от исходного уровня, соответственно, показана на **Фигурах 17В и 17С**, соответственно. Анализ экспрессии генов показывает, что пациенты, демонстрирующие объективные ответы, демонстрируют более высокую экспрессию как мРНК LAG-3, так и мРНК PDCD1 в исходных образцах для биопсии.

[00287] В этой когорте клинических исследований двойной ингибитор контрольных точек DART-I в комбинации с ADCC-усиленной ТА-связывающей молекулой маргетуксимабом с усилением ADCC, как правило, хорошо переносился с профилем безопасности, соответствующим монотерапии DART-I. У рефрактерных пациентов с различными типами опухолей, экспрессирующих опухолевый антиген HER2 (*т.е.* опухоли HER2+), наблюдались признаки противоопухолевой активности. Экспрессия мРНК LAG-3 и PD-1 на исходном уровне, по-видимому, связана с клиническим ответом, но большинство отвечавших пациентов характеризовались исходной экспрессией PD-L1 ≤ 1 (по данным ИHC).

[00288] Таким образом, двойное ингибирование контрольных точек путей контрольных точек PD-1/PD-L1 и LAG-3 с помощью молекулы, такой как DART-I, может синергически взаимодействовать с противоопухолевой активностью ТА-связывающей молекулы (в частности, с повышенной активностью ADCC, такой как маргетуксимаб). Такие комбинации, по-видимому, являются более эффективными, чем лечение с помощью ТА-связывающей молекулы отдельно или в комбинации с ингибированием контрольной точки только пути PD-1/PD-L1, и пригодны для лечения PD-L1-отрицательных пациентов.

[00289] Все публикации и патенты, упомянутые в настоящей заявке, включены в настоящую заявку посредством ссылки в той же степени, как если бы было конкретно и отдельно указано, что каждая отдельная публикация или патентная заявка полностью включена посредством ссылки. Хотя изобретение было описано в связи с его конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что оно допускает дальнейшие модификации, и эта заявка предназначена для охвата любых вариантов, применений или адаптаций изобретения, следующих, в целом, принципам изобретения и включая такие отступления от настоящего раскрытия, которые относятся к известной или общепринятой практике в области техники, к которой относится изобретение, и которые могут быть применены к существенным признакам, изложенным выше.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака, включающий введение PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы субъекту, нуждающемуся в этом, где указанный способ включает введение указанной PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы указанному субъекту в фиксированной дозе от приблизительно 120 мг до приблизительно 800 мг.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный рак характеризуется экспрессией опухолевого антигена (ТА), и при этом указанный способ дополнительно включает введение указанному субъекту молекулы, связывающей опухолевый антиген (ТА) (ТА-связывающей молекулы).
3. Способ лечения рака у субъекта, отличающийся тем, что указанный рак характеризуется экспрессией ТА, причем указанный способ включает введение ТА-связывающей молекулы указанному субъекту и:
 - (a) биспецифической молекулы (PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы); или
 - (b) молекулы, которая иммуноспецифично связывает PD-1 (PD-1-связывающая молекула) в комбинации с молекулой, которая иммуноспецифично связывает LAG-3 (LAG-3-связывающая молекула); или
 - (c) биспецифической молекулы, которая иммуноспецифично связывает как PD-L1, так и LAG-3 (PD-L1 x LAG-3 биспецифической молекулы); или
 - (d) молекулы, которая иммуноспецифично связывает PD-L1 (PD-L1-связывающей молекулы) в комбинации с LAG-3-связывающей молекулой.
4. Способ по любому из пп. 2-3, отличающийся тем, что указанная ТА-связывающая молекула содержит ADCC-усиленный Fc-домен.
5. Способ по любому из пп.2-4, отличающийся тем, что:
 - (a) каждая молекула представлена в отдельной композиции; или
 - (b) каждая молекула представлена в одной и той же композиции; или

- (с) указанная PD-1-связывающая молекула и указанная LAG-3-связывающая молекула представлены в одной композиции, и указанная ТА-связывающая молекула представлена в отдельной композиции; или
 - (d) указанная PD-L1-связывающая молекула и указанная LAG-3-связывающая молекула представлены в одной композиции, и указанная ТА-связывающая молекула представлена в отдельной композиции.
- 6. Способ по любому из пп. 2-5, отличающийся тем, что указанная ТА-связывающая молекула представляет собой антитело.
- 7. Способ по любому из пп. 2-6, отличающийся тем, что указанная PD-1-связывающая молекула представляет собой антитело, указанная PD-L1-связывающая молекула представляет собой антитело, и указанная LAG-3-связывающая молекула представляет собой антитело.
- 8. Способ по любому из пп. 3-6, отличающийся тем, что указанный способ включает введение указанной ТА-связывающей молекулы и указанной PD-1 x LAG-3 биспецифической молекулы.
- 9. Способ по любому из пп. 4-8, отличающийся тем, что указанный ADCC-усиленный Fc-домен содержит:
 - (A) сконструированную гликоформу; и/или
 - (B) аминокислотную замену относительно Fc-области дикого типа.
- 10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанный ADCC-усиленный Fc-домен содержит:
 - (A) сконструированную гликоформу, которая представляет собой сложную N-гликозид-связанную сахарную цепь, которая не содержит фукозы, и/или которая содержит биссекторный O-GlcNAc; и/или
 - (B) содержит аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из:
 - (a) одной замены, выбранной из группы, состоящей из:

F243L, R292P, Y300L, V305I, I332E и P396L;

- (b) двух замен, выбранных из группы, состоящей из:
 - (1) F243L и P396L;
 - (2) F243L и R292P;
 - (3) R292P и V305I; и
 - (4) S239D и I332E;
- (c) трех замен, выбранных из группы, состоящей из:
 - (1) F243L, R292P и Y300L;
 - (2) F243L, R292P и V305I;
 - (3) F243L, R292P и P396L; и
 - (4) R292P, V305I и P396L;
- (d) четырех замен, выбранных из группы, состоящей из:
 - (1) F243L, R292P, Y300L и P396L; и
 - (2) F243L, R292P, V305I и P396L; или
- (e) пяти замен, выбранных из группы, состоящей из:
 - (1) F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L; и
 - (2) L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L,

где нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.

11. Способ по любому из пп. 9-10, отличающийся тем, что указанный ADCC-усиленный Fc-домен содержит аминокислотные замены: L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L, где нумерация соответствует индексу EU по системе Kabat.
12. Способ по любому из пп. 2-11, отличающийся тем, что:
 - (A) указанный ТА выбран из **Таблицы 6А** или **Таблицы 6В**; и/или
 - (В) указанная ТА-связывающая молекула содержит домены VL и VH антитела, выбранного из **таблицы 7**.
13. Способ по любому из пп. 3-7 или 9-12, отличающийся тем, что:
 - (A) указанная PD-1-связывающая молекула представляет собой антитело, которое содержит:

- (a) домен VL PD-1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:35**, и домен VH PD-1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:39**;
- (b) домен VH и VL анти-PD-1 антитела, выбранного из **Таблицы 1**; или
- (c) легкую цепь и тяжелую цепь анти-PD-1 антитела, выбранного из **Таблицы 1**;
- (B) указанная PD-L1-связывающая молекула представляет собой антитело, которое содержит:
 - (a) домен VL PD-L1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:43**, и домен VH PD-L1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:47**;
 - (b) домен VH и VL анти-PD-L1 антитела, выбранного из **Таблицы 2**; или
 - (c) легкую цепь и тяжелую цепь анти-PD-L1 антитела, выбранного из **Таблицы 2**; и
- (C) указанная LAG-3-связывающая молекула представляет собой антитело, которое содержит:
 - (a) домен VL LAG-3, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:51**, и домен VH LAG-3, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:55**;
 - (b) домен VH и VL анти-LAG-3 антитела, выбранного из **Таблицы 3**; или
 - (c) легкую цепь и тяжелую цепь анти-LAG-3 антитела, выбранного из **Таблицы 3**.

14. Способ по любому из пп. 1-6, 8 или 9-12, отличающийся тем, что указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит:
- (a) домен VL PD-1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:35**, и домен

VH PD-1, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в **SEQ ID NO:39**, или домен VH и VL анти-PD-1 антитела, выбранного из **Таблицы 1**; и/или

- (b) домен VL LAG-3, содержащий аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:51**, и домен VH LAG-3, содержащий аминокислотную последовательность **SEQ ID NO:55**, или домен VH и VL анти-LAG-3 антитела, выбранного из **Таблицы 3**; или
- (c) молекулу на основе биспецифического антитела, выбранную из **Таблиц 4-5**.

15. Способ по любому из пп. 1-6, 8, 9-12 или 14, отличающийся тем, что указанная биспецифическая молекула PD-1 x LAG-3 содержит:
 - (a) два из указанных PD-1-связывающих доменов; и
 - (b) два из указанных LAG-3-связывающих доменов.
16. Способ по любому из пп. 1-6, 8, 9-12 или 14-15, отличающийся тем, что указанная биспецифическая молекула PD-1 x LAG-3 содержит домен VL PD-1 с последовательностью **SEQ ID NO:35**, домен VH PD-1 с последовательностью **SEQ ID NO:39**, домен VL LAG-3 с последовательностью **SEQ ID NO:51** и домен VH LAG-3 с последовательностью **SEQ ID NO:55**.
17. Способ по любому из пп. 1-6, 8, 9-12 или 14-16, отличающийся тем, что указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула или указанная PD-L1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит Fc-область и шарнирный домен.
18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанная Fc-область, так же как и указанный шарнирный домен, относятся к изотипу IgG4, и при этом указанный шарнирный домен содержит стабилизирующую мутацию.
19. Способ по любому из пп. 17-18, отличающийся тем, что указанная Fc-область представляет собой вариант Fc-области, которая содержит:

- (A) одну или более модификаций аминокислот, снижающих аффинность варианта Fc-области в отношении FcγR; и/или
- (B) одну или более модификаций аминокислот, которые увеличивают время полужизни варианта Fc-области в сыворотке крови.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что указанные:

- (a) модификации, которые снижают аффинность варианта Fc-области в отношении FcγR, включают замену L234A; L235A или L234A и L235A; и
- (b) модификации, которые увеличивают время полужизни варианта Fc-области в сыворотке крови, включают замену M252Y; M252Y и S254T; M252Y и T256E; M252Y, S254T и T256E; или K288D и H435K,

где указанная нумерация соответствует нумерации согласно индексу EU по системе Kabat.

21. Способ по любому из пп. 1-6, 9-12 или 14-20, характеризующийся тем, что указанная PD-1 x LAG-3 биспецифическая молекула содержит две полипептидные цепи из **SEQ ID NO:59** и две полипептидные цепи из **SEQ ID NO:60**.

22. Способ по любому из пп. 1-6, 9-12 или 14-21, отличающийся тем, что указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 300 мг.

23. Способ по любому из пп. 1-6, 9-12 или 14-21, отличающийся тем, что указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг.

24. Способ по любому из пп. 1-6, 9-12 или 14-23, отличающийся тем, что указанную фиксированную дозу вводят один раз приблизительно каждые 2 недели.

25. Способ по любому из пп. 1-6, 9-12 или 14-23, отличающийся тем, что указанную фиксированную дозу вводят один раз приблизительно каждые 3 недели.
26. Способ по любому из пп. 1-6, 9-12, 14-21, 23 или 24, отличающийся тем, что указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг, один раз приблизительно каждые 2 недели.
27. Способ по любому из пп. 1-6, 9-12, 14-21, 23 или 25, отличающийся тем, что указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят в фиксированной дозе, составляющей приблизительно 600 мг один раз приблизительно каждые 3 недели.
28. Способ по любому из пп. 1-6, 9-12 или 14-27, отличающийся тем, что указанную PD-1 x LAG-3 биспецифическую молекулу или указанную PD-L1 x LAG-3 биспецифическую молекулу вводят путем внутривенной (в/в) инфузии.
29. Способ по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из: рака надпочечника, СПИД-ассоциированного рака, альвеолярной мягкотканной саркомы, рака анального канала (включая плоскоклеточную карциному анального канала (SCAC)), рака мочевого пузыря, рака костей, рака головного и спинного мозга, рака молочной железы (включая HER2⁺ рак молочной железы или тройной негативный рак молочной железы (TNBC)), опухоль каротидного тела, рак шейки матки (включая связанный с ВПЧ рак шейки матки), хондросаркому, хордому, хромофобную почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному, рак толстой кишки, колоректальный рак, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпендимому, рак эндометрия (включая неселективный рак эндометрия, рак эндометрия с высоким уровнем MSI, рак эндометрия с дефицитом репарации ошибок репликации (dMMR) и/или положительный

рак эндометрия с мутацией в экзонуклеазном домене POLE), саркому Юинга, экстраскелетную миксоидную хондросаркому, рак желчного пузыря или желчного протока (включая холангиокарциному, рак желчных протоков), рак желудка, рак гастроэзофагеального перехода (GEJ), гестационное трофобластическое заболевание, эмбрионально-клеточную опухоль, глиобластому, рак головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN)), гематологическое злокачественное новообразование, гепатоцеллюлярную карциному, инсулиному, саркому Капоши, рак почки, лейкоз (включая острый миелоидный лейкоз), липосаркому/злокачественную липоматозную опухоль, рак печени (включая гепатоцеллюлярную карциному (HCC)), лимфому (включая диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), неходжкинскую лимфому (NHL)), рак легких (включая мелкоклеточный рак легких (SCLC), немелкоклеточный рак легких (NSCLC)), медуллобластому, меланому (включая увеальную меланому), менингиому, карциному Меркеля, мезотелиому (включая мезотелиальный фарингеальный рак), множественную эндокринную неоплазию, множественную миелому, миелодиспластический синдром, нейробластому, нейроэндокринные опухоли, рак яичников, рак поджелудочной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, парашитовидную опухоль, рак детского возраста, опухоль оболочек периферических нервов, фарингеальный рак, феохромоцитому, опухоль гипофиза, рак предстательной железы (включая метастатический кастрационно-резистентный рак предстательной железы (mCRPC)), потерянную увеальную меланому, метастатический рак почек, рабдоидную опухоль, рабдомиосаркомы, саркомы, рака кожи, мелкокруглоклеточной опухоли с окрашиванием в синий цвет у детей (включая нейробластому и рабдомиосаркому), саркомы мягких тканей, плоскоклеточного рака, рака желудка, синовиальной саркомы, тестикулярного рака, карциномы тимуса, тимомы, рака щитовидной железы и рака матки.

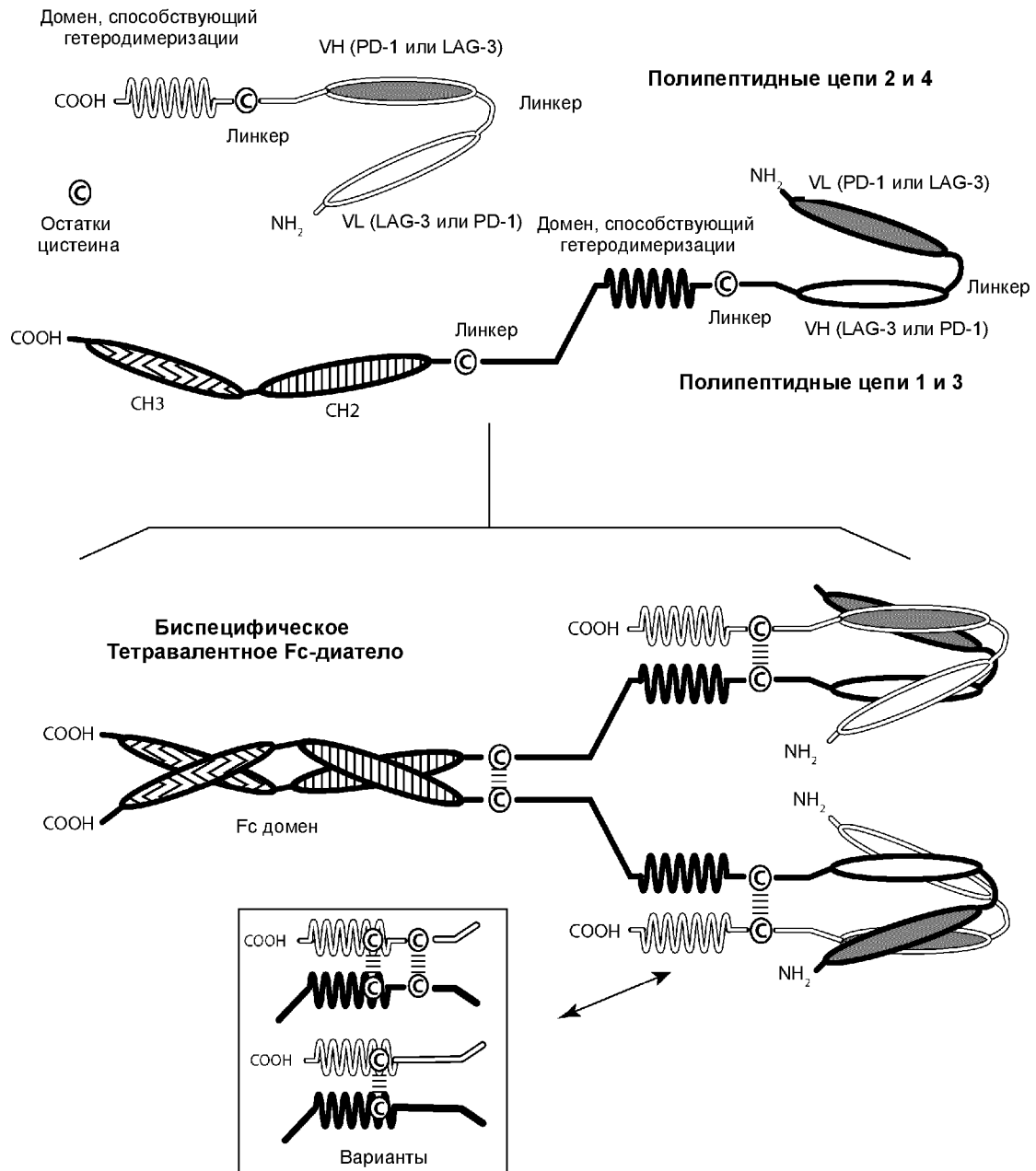
30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из: рака анального канала, рака молочной железы, рака желчного протока, рака шейки матки, колоректального рака, рака эндометрия, рака желудка, рака гастроэзофагеального перехода (GEJ), рака головы и шеи, рака печени, рака легкого, лимфомы, меланомы, рака яичника и рака предстательной железы.
31. Способ по любому из пп. 28 или 29, отличающийся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из: HER2⁺ рака молочной железы, TNBC, холангиокарциномы, рака желчного протока, рака шейки матки, связанного с ВПЧ, SCCHN, HCC, SCLC или NSCLC, NHL, рака предстательной железы, рака желудка и рака GEJ.
32. Способ по любому из пп. 2-31, отличающийся тем, что указанная ТА-связывающая молекула представляет собой HER2-связывающую молекулу, содержащую HER2-связывающий домен, содержащий переменный домен легкой цепи (VL_{HER2}) и переменный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}), причем:
- (A) указанный переменный домен легкой цепи (VL_{HER2}) содержит переменный домен легкой цепи маргетуксимаба, содержащий CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} последовательности **SEQ ID NO:61**, и указанный переменный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}) содержит переменный домен тяжелой цепи маргетуксимаба, содержащий CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} последовательности **SEQ ID NO:66**;
 - (B) указанный переменный домен легкой цепи (VL_{HER2}) содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} трастузумаба, и указанный переменный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}) содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} трастузумаба;
 - (C) указанный переменный домен легкой цепи (VL_{HER2}) содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} пертузумаба, и указанный переменный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}) содержит CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} пертузумаба; или
 - (D) указанный переменный домен легкой цепи (VL_{HER2}) содержит CDR_{L1}, CDR_{L2} и CDR_{L3} из hHER2 MAB-1, и указанный

вариабельный домен тяжелой цепи (VH_{HER2}) содержит CDR_{H1} , CDR_{H2} и CDR_{H3} из hHER2 MAB-1.

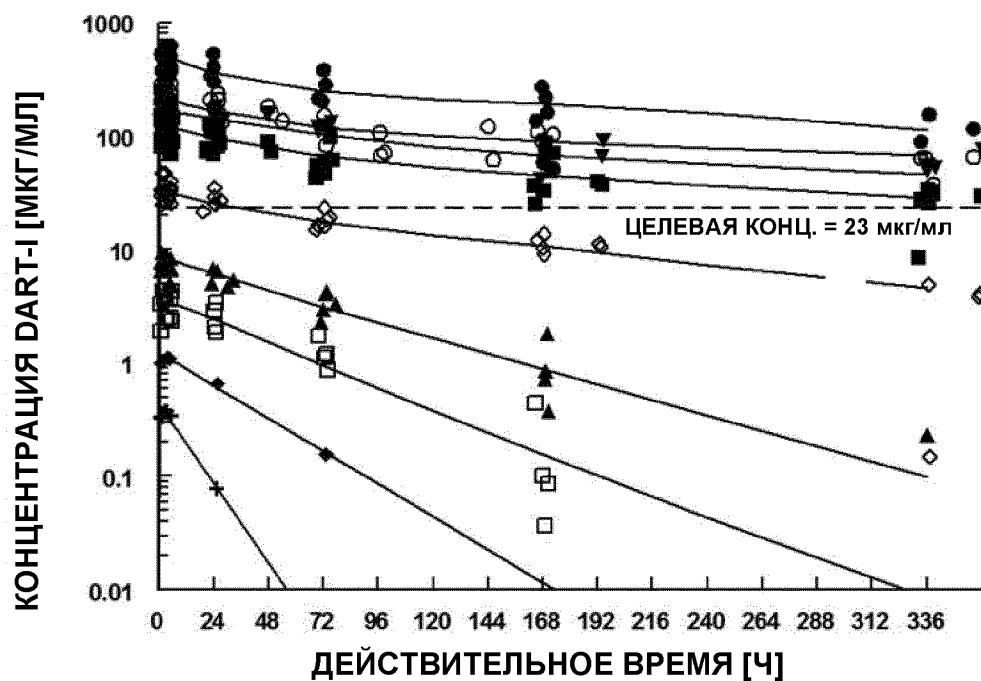
33. Способ по любому из пп. 2-32, отличающийся тем, что указанная HER2-связывающая молекула представляет собой анти-HER2 антитело.
34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что указанное анти-HER2 антитело представляет собой маргетуксимаб, и указанный способ включает введение маргетуксимаба в дозировке, составляющей от приблизительно 6 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг один раз приблизительно каждые 3 недели.
35. Способ по любому из пп. 32-34, отличающийся тем, что указанный способ дополнительно включает введение химиотерапевтического агента.
36. Способ по любому из пп. 2-35, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой рак, экспрессирующий HER2.
37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что указанный HER2-экспрессирующий рак выбран из группы, состоящей из: рака молочной железы, метастатического рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака GEJ, рака яичников, рака поджелудочной железы и рака желудка.
38. Способ по любому из пп. 2-31, отличающийся тем, что указанная ТА-связывающая молекула представляет собой B7-H3-связывающую молекулу, содержащую B7-H3-связывающий домен, содержащий вариабельный домен легкой цепи (VL) и вариабельный домен тяжелой цепи (VH), причем:
указанный VL содержит CDR_{L1} , CDR_{L2} и CDR_{L3} последовательности **SEQ ID NO:71**, и указанный VH содержит CDR_{H1} , CDR_{H2} и CDR_{H3} последовательности **SEQ ID NO:76**.
39. Способ по любому из пп. 2-31 или 38, отличающийся тем, что указанная ТА-связывающая молекула представляет собой эноблитузумаб, и указанный способ включает введение эноблитузумаба в дозировке,

составляющей от приблизительно 6 мг/кг до приблизительно 18 мг/кг один раз приблизительно каждые 3 недели.

40. Способ по любому из пп. 2-31 или 38-39, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой рак, экспрессирующий B7-H3.
41. Способ по п. 40, отличающийся тем что указанный B7-H3-экспрессирующий рак выбран из группы, состоящей из: рака анального канала, SCAC, рака молочной железы, TNBC, рака головы и шеи, SCCHN, рака легкого, NSCLC, меланомы, увеальной меланомы, рака предстательной железы и mCRPC.
42. Способ по любому из пп. 2-41, отличающийся тем, что указанную ТА-связывающую молекулу вводят путем внутривенной (IV) инфузии.
43. Способ по любому из пп. 1-42, отличающийся тем, что клетки, экспрессирующие LAG-3, присутствуют в биопсии указанного рака до начала указанного лечения.
44. Способ по любому из пп. 1-43, отличающийся тем, что клетки, экспрессирующие PD-1, присутствуют в биопсии указанного рака до начала указанного лечения.
45. Способ по любому из пп. 2-44, отличающийся тем, что экспрессия PD-L1 на поверхности клеток указанного рака до начала указанного лечения составляет менее 1%, что определено с использованием комбинированного положительного показателя (CPS) или показателя пропорции опухоли (TPS).



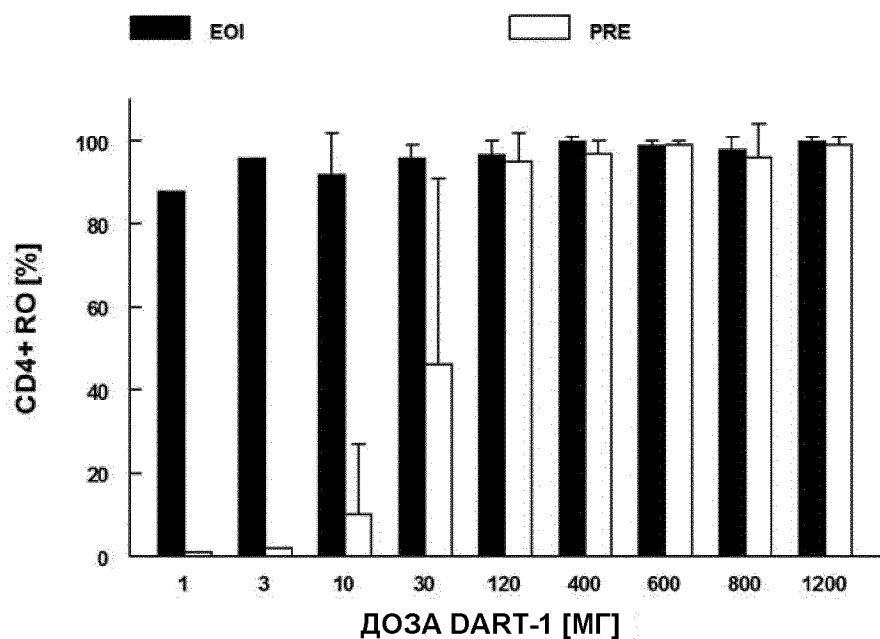
Фигура 1



+ 1 МГ (N=1); ◆ 3 МГ (N=1); □ 10 МГ (N=4); ▲ 30 МГ (N=5);
 ◇ 120 МГ (N=6); ■ 400 МГ (N=9); ○ 600 МГ (N=8)
 ▼ 800 МГ (N=7); ● 1200 МГ (N=4)

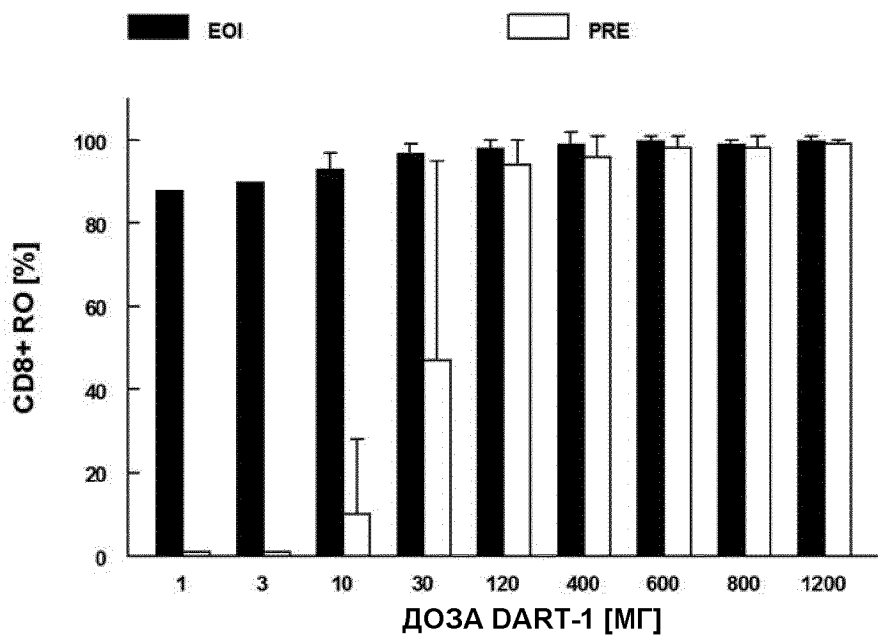
Фигура 2

ЦИКЛ 1, ДЕНЬ 1: ЗАНЯТОСТЬ РЕЦЕПТОРА CD4+ ОТНОСИТЕЛЬНО ДОЗЫ



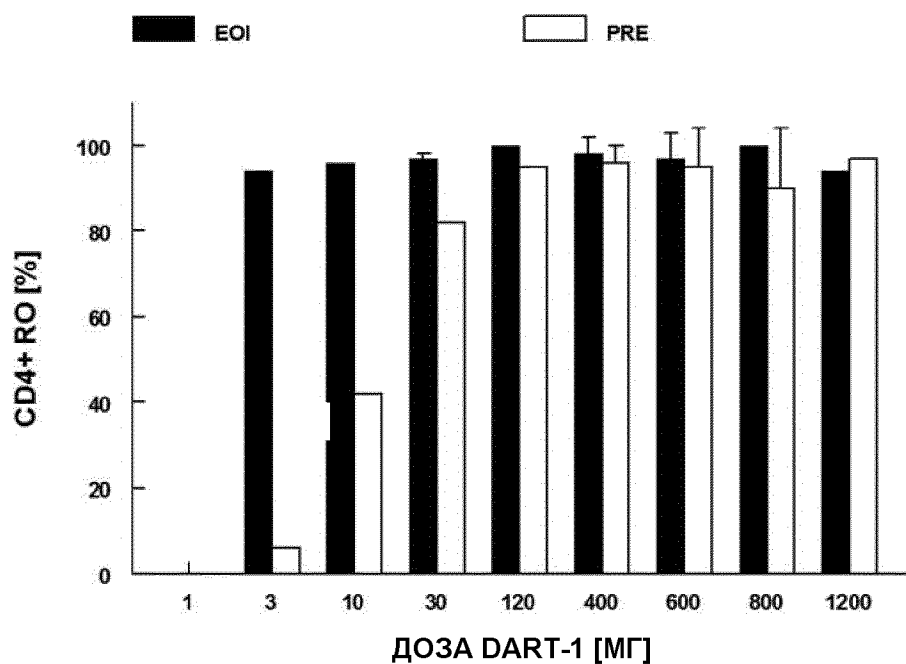
Фигура 3А

ЦИКЛ 1, ДЕНЬ 1: ЗАНЯТОСТЬ РЕЦЕПТОРА CD8+ ОТНОСИТЕЛЬНО ДОЗЫ



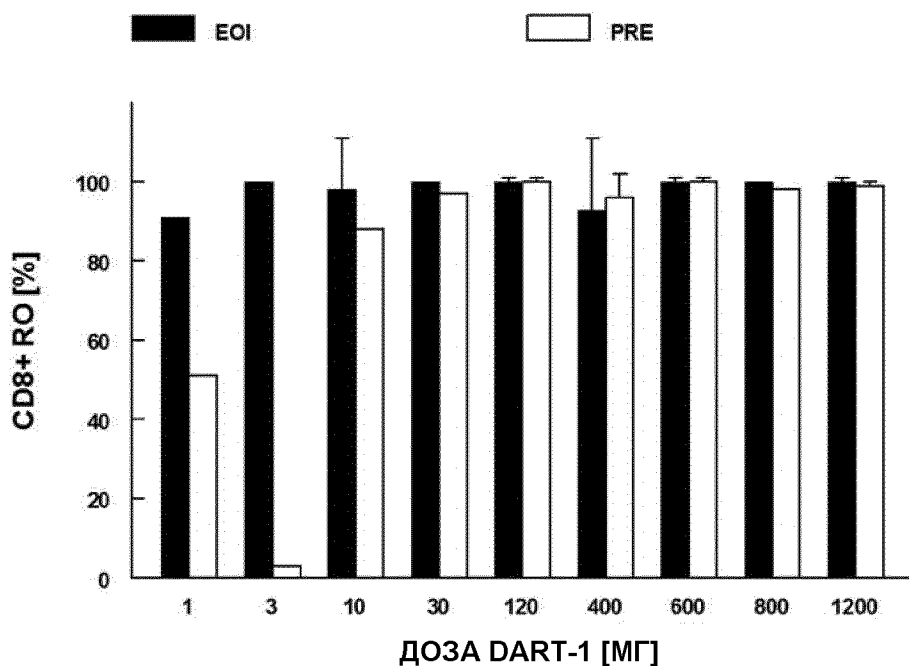
Фигура 3В

ЦИКЛ 2, ДЕНЬ 1: ЗАНЯТОСТЬ РЕЦЕПТОРА CD4+ ОТНОСИТЕЛЬНО ДОЗЫ



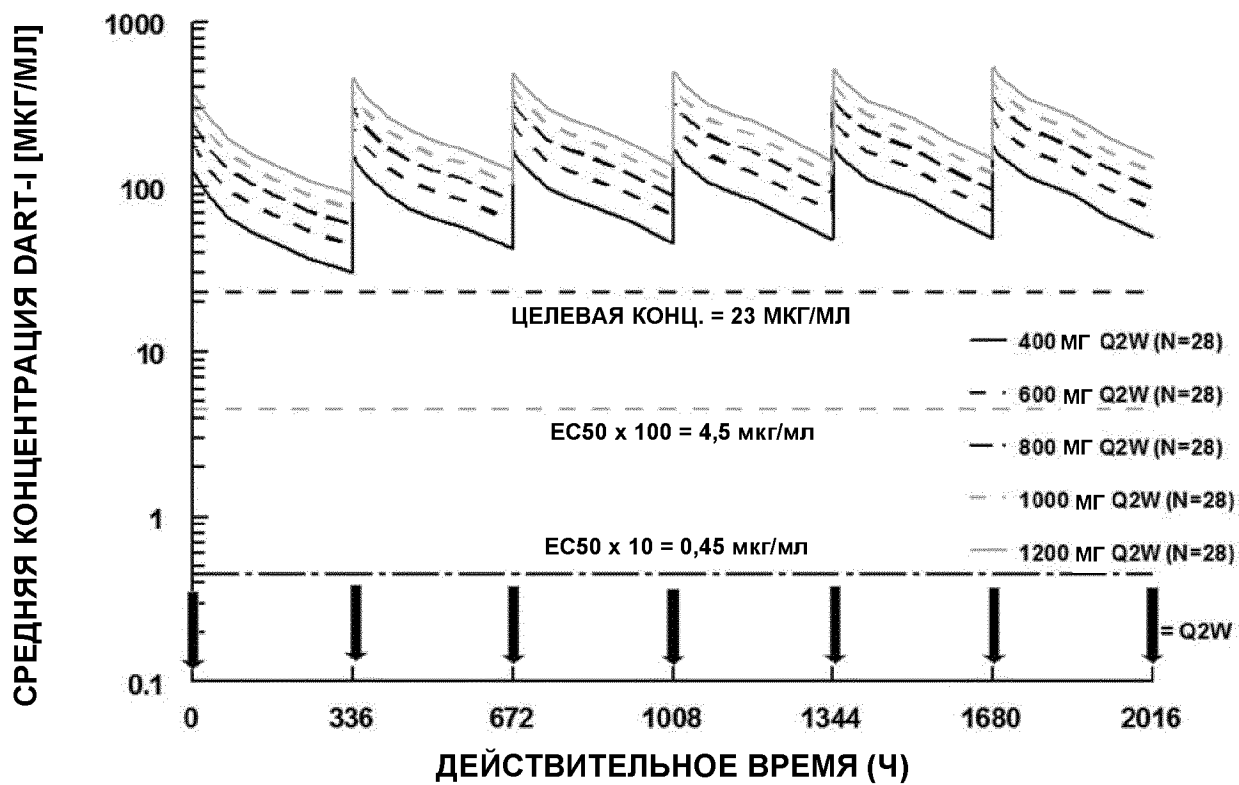
Фигура 3С

ЦИКЛ 2, ДЕНЬ 1: ЗАНЯТОСТЬ РЕЦЕПТОРА CD8+ ОТНОСИТЕЛЬНО ДОЗЫ



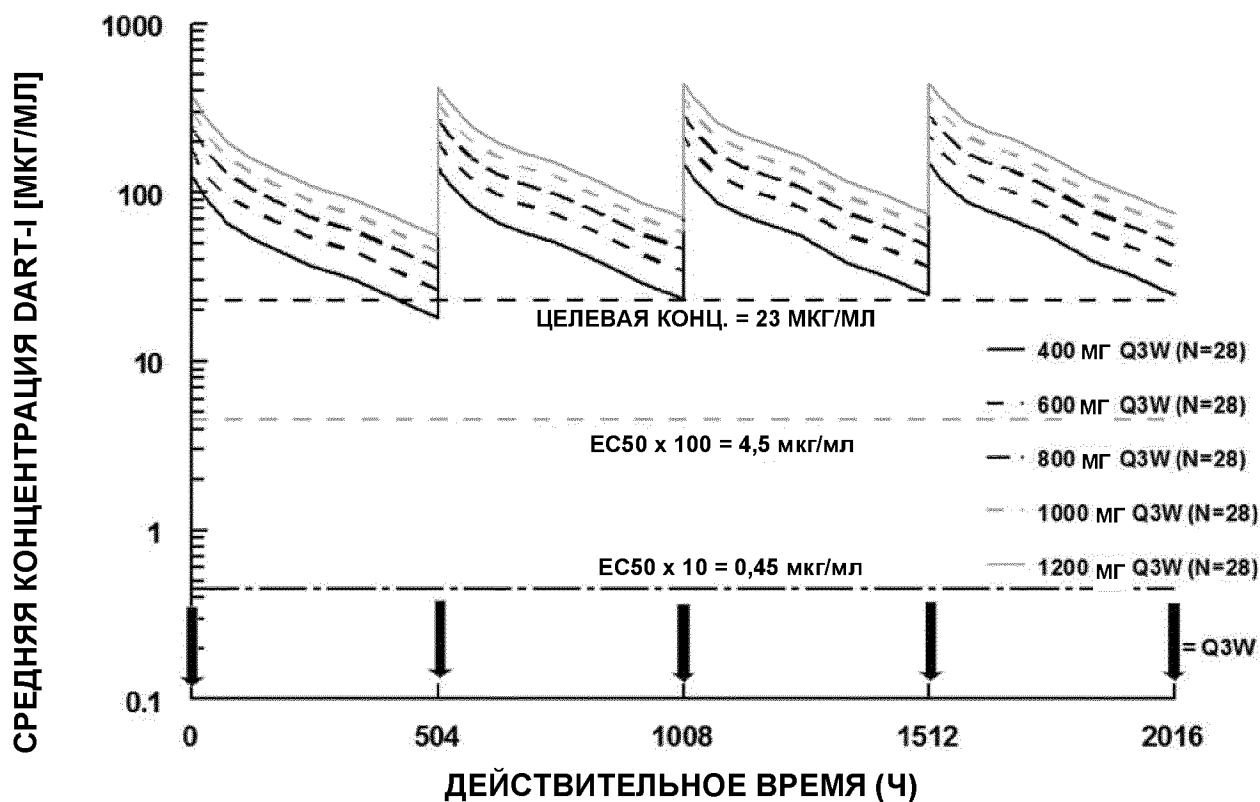
Фигура 3D

МОДЕЛИРОВАНИЕ ФК ПРИ ДОЗИРОВАНИИ РАЗ В ДВЕ НЕДЕЛИ (Q2W)



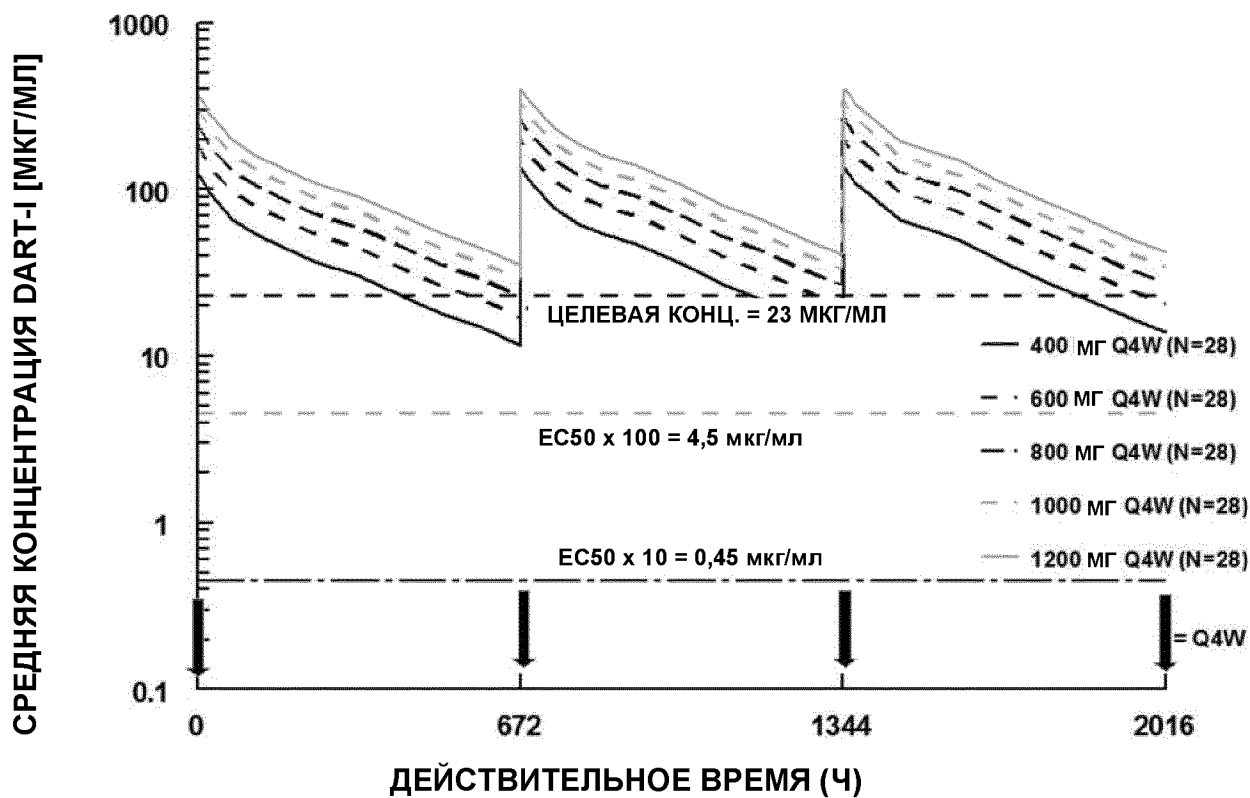
Фигура 4А

МОДЕЛИРОВАНИЕ ФК ПРИ ДОЗИРОВАНИИ РАЗ В ТРИ НЕДЕЛИ (Q3W)

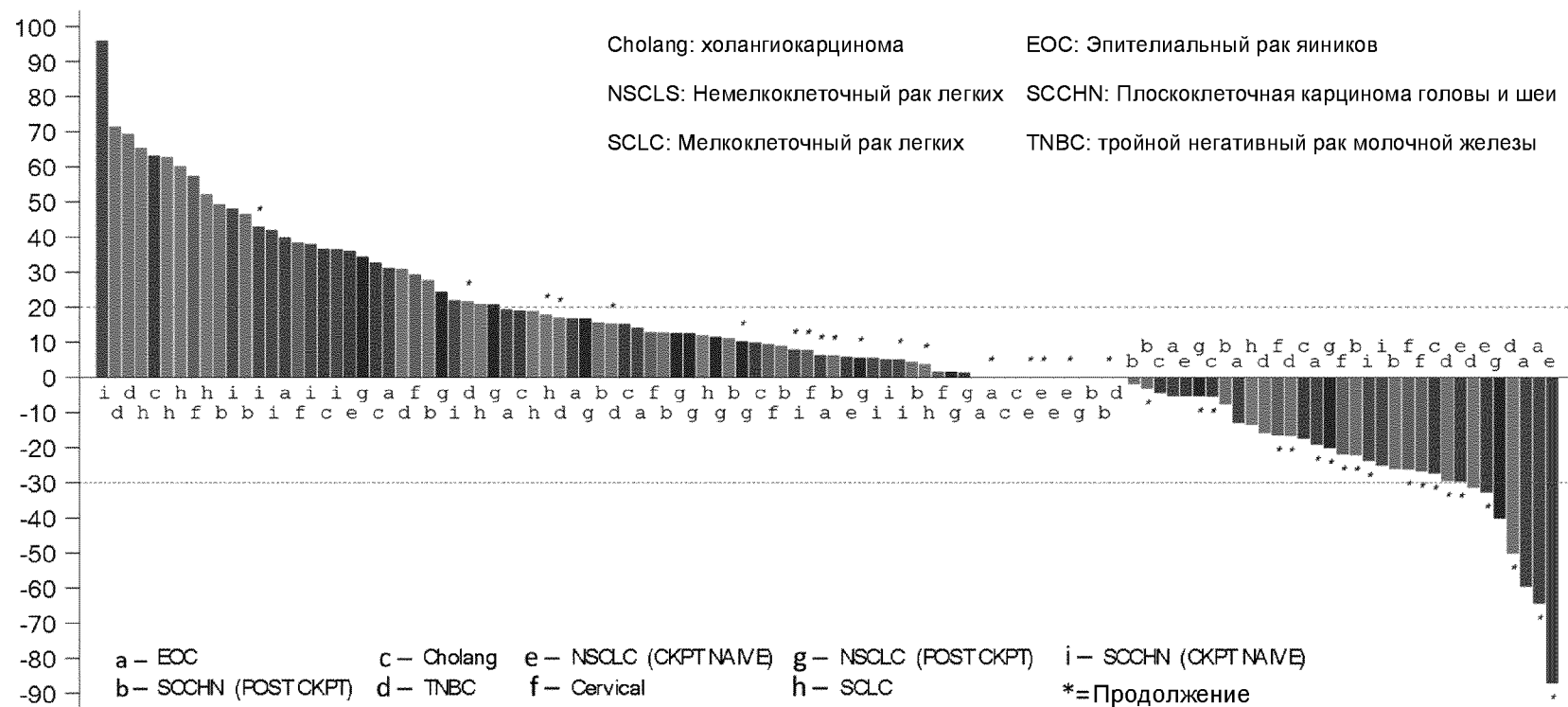


Фигура 4В

МОДЕЛИРОВАНИЕ ФК ПРИ ДОЗИРОВАНИИ РАЗ В ЧЕТЫРЕ НЕДЕЛИ (Q4W)



Фигура 4С

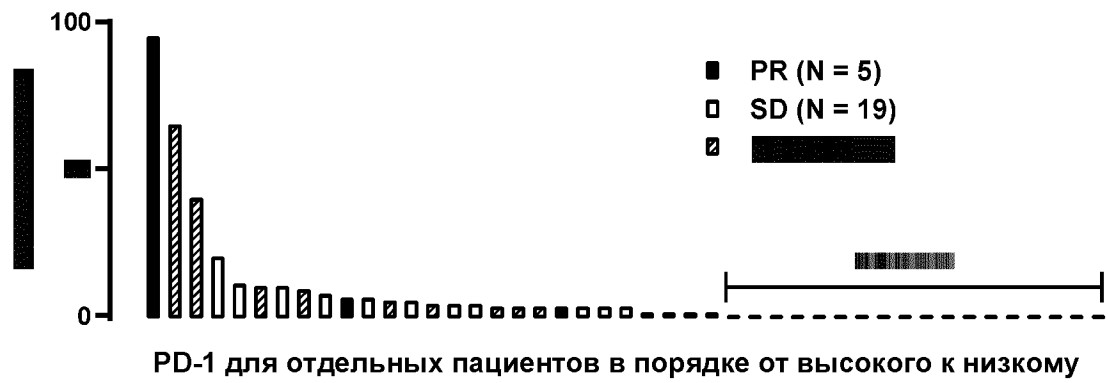


Фигура 5

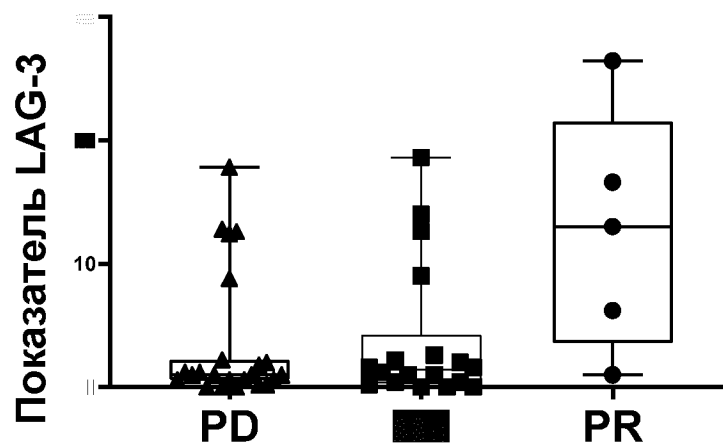
9/18



Фигура 6А

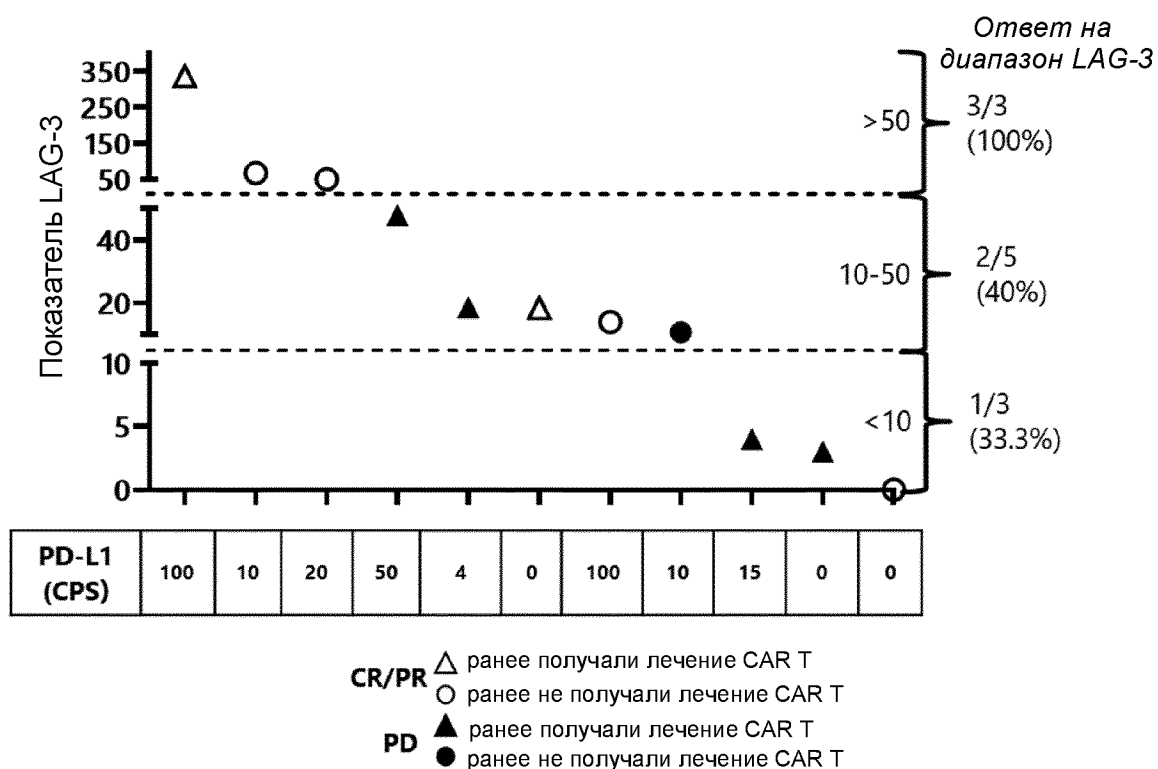


Фигура 6В

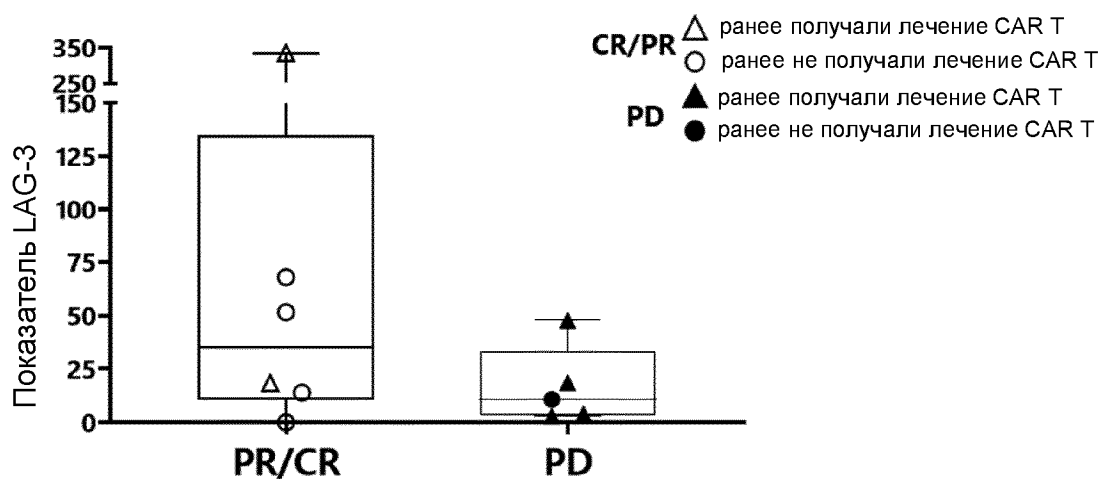


Фигура 6С

10/18

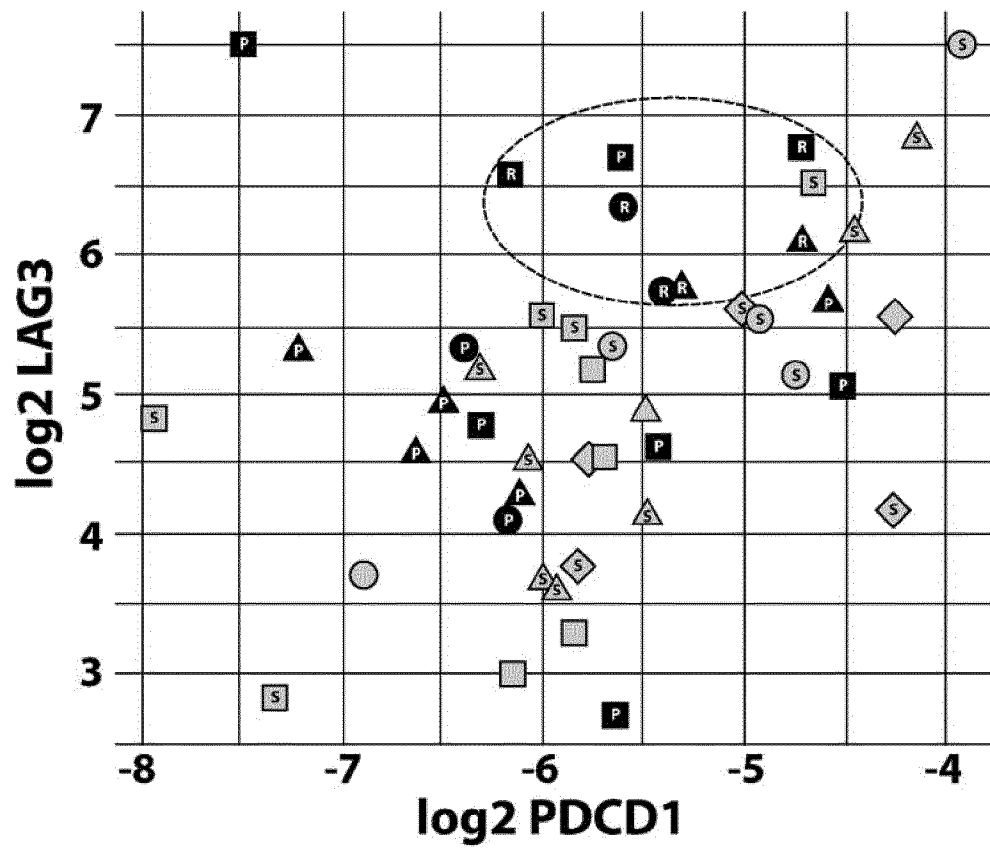


Фигура 6D

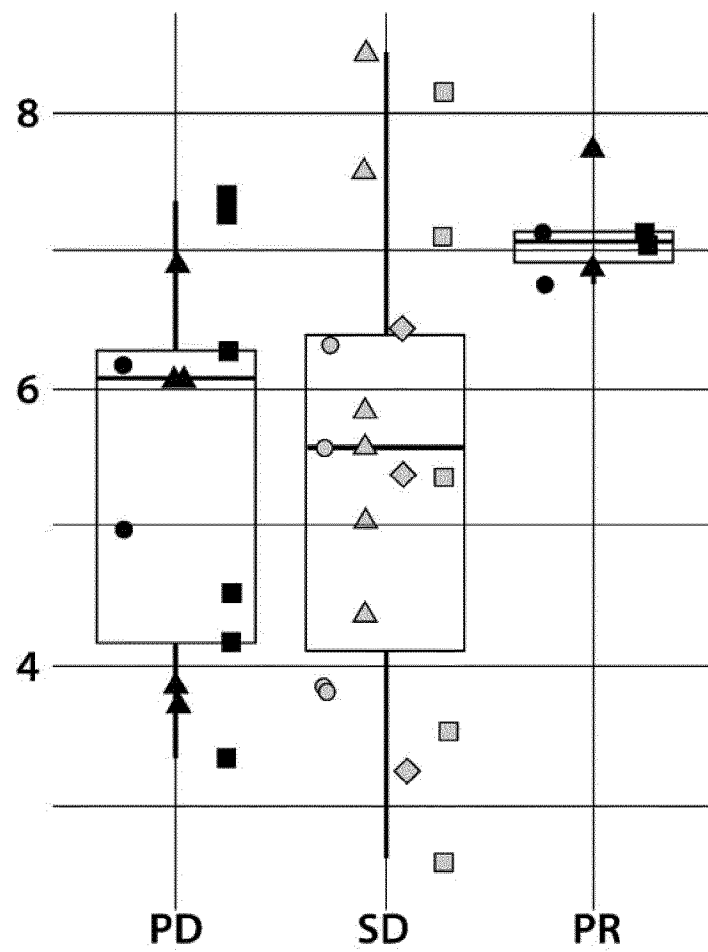


Фигура 6E

Экспрессия LAG3 vs PDCD1

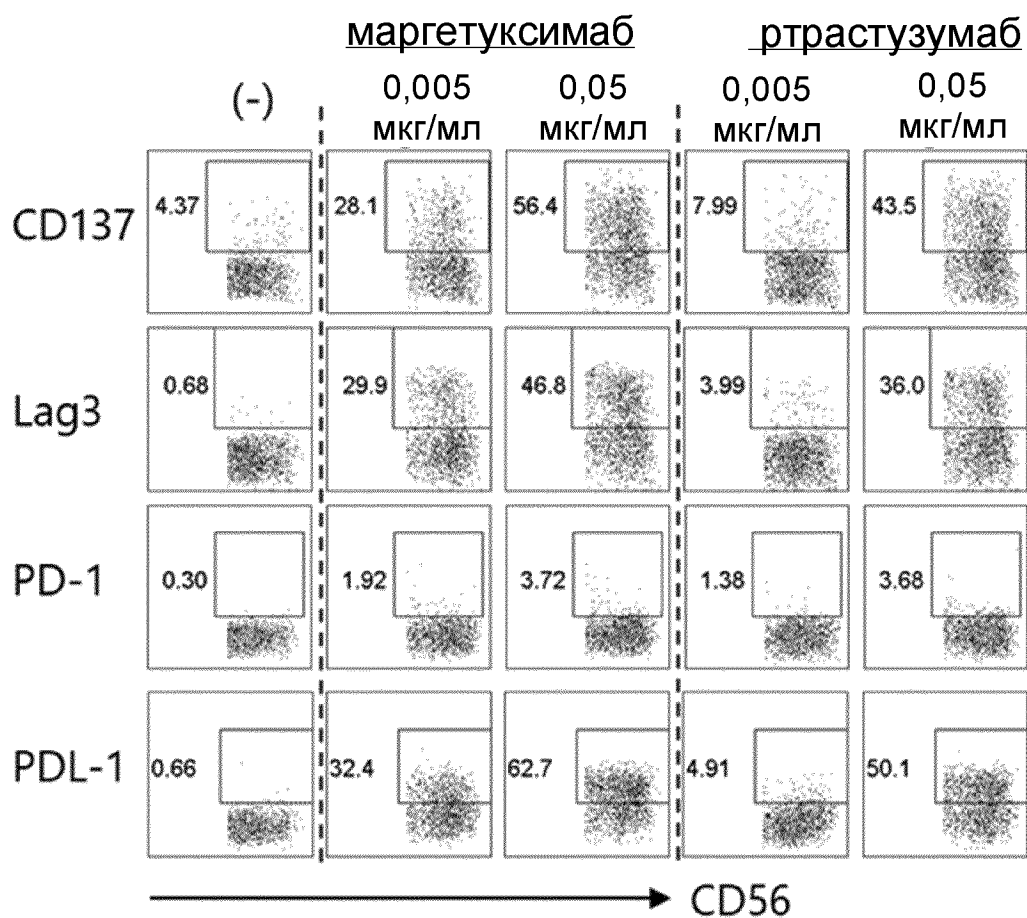


Фигура 7

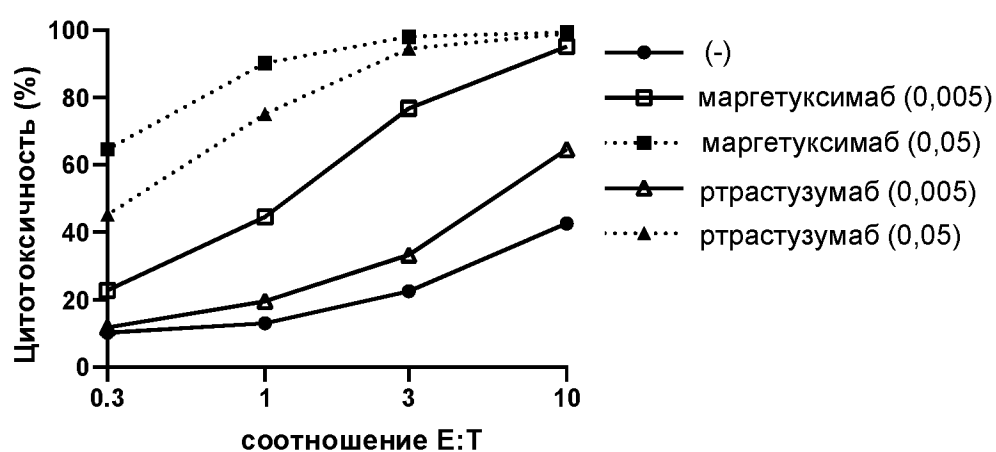


Фигура 8

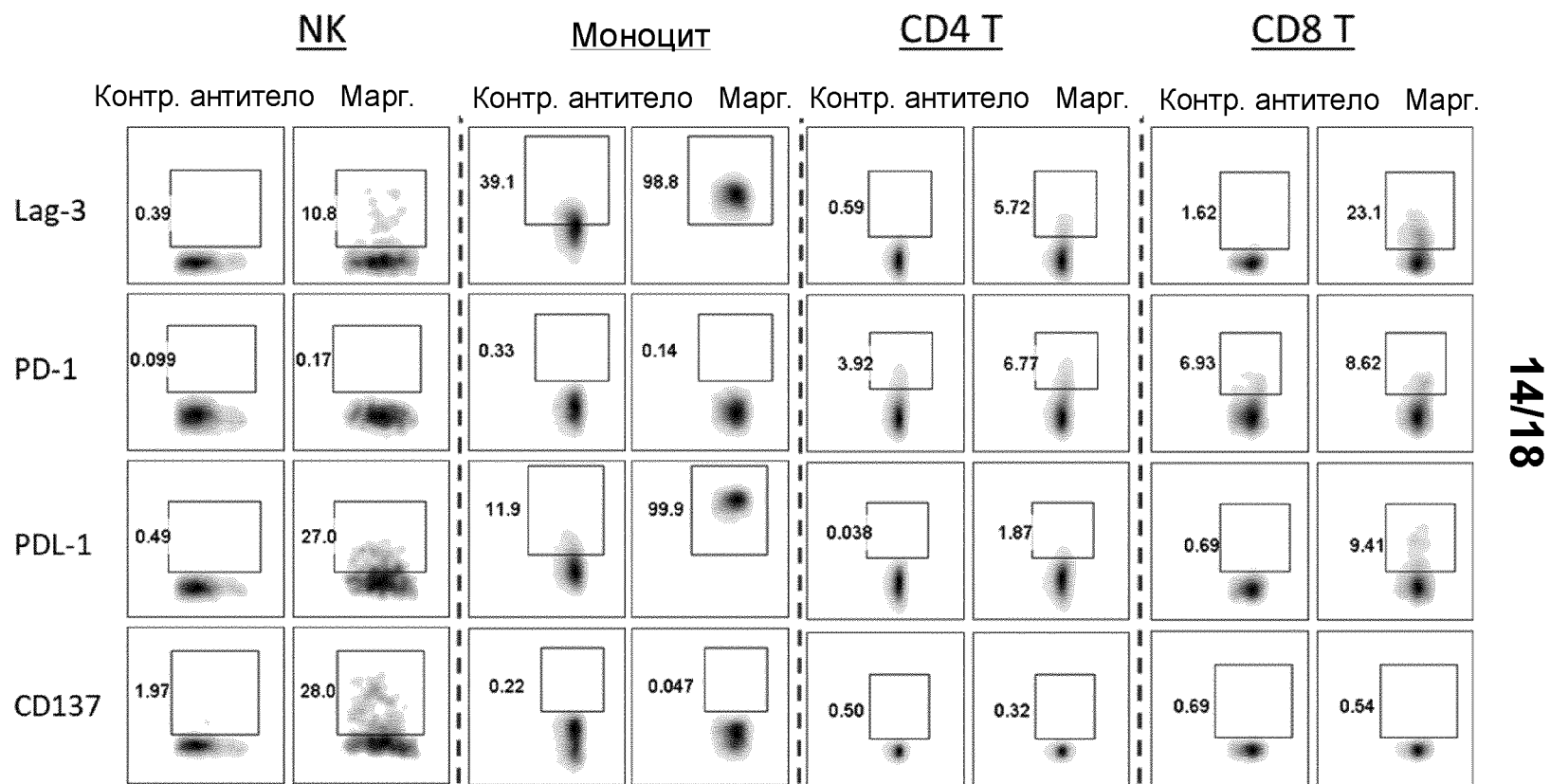
13/18



Фигура 9

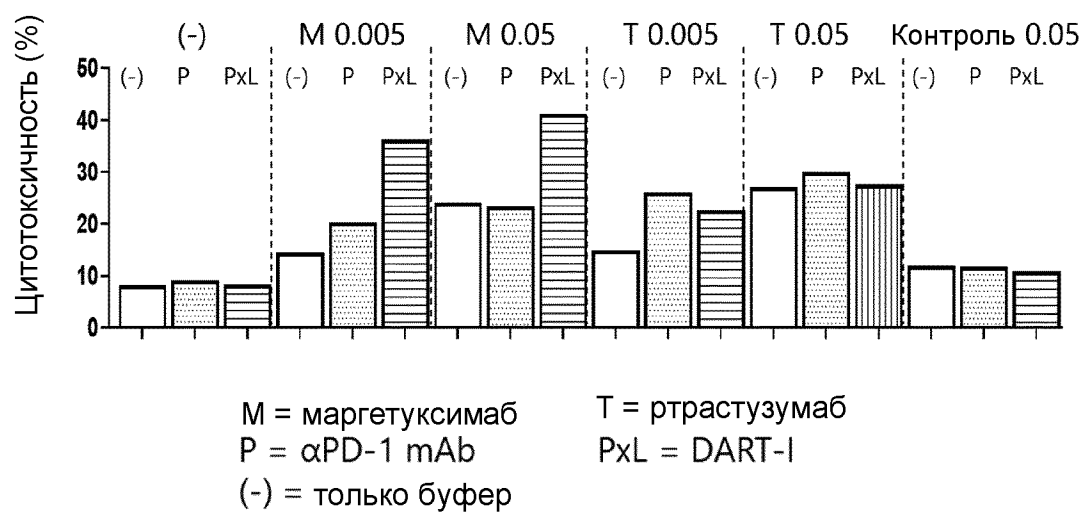


Фигура 10

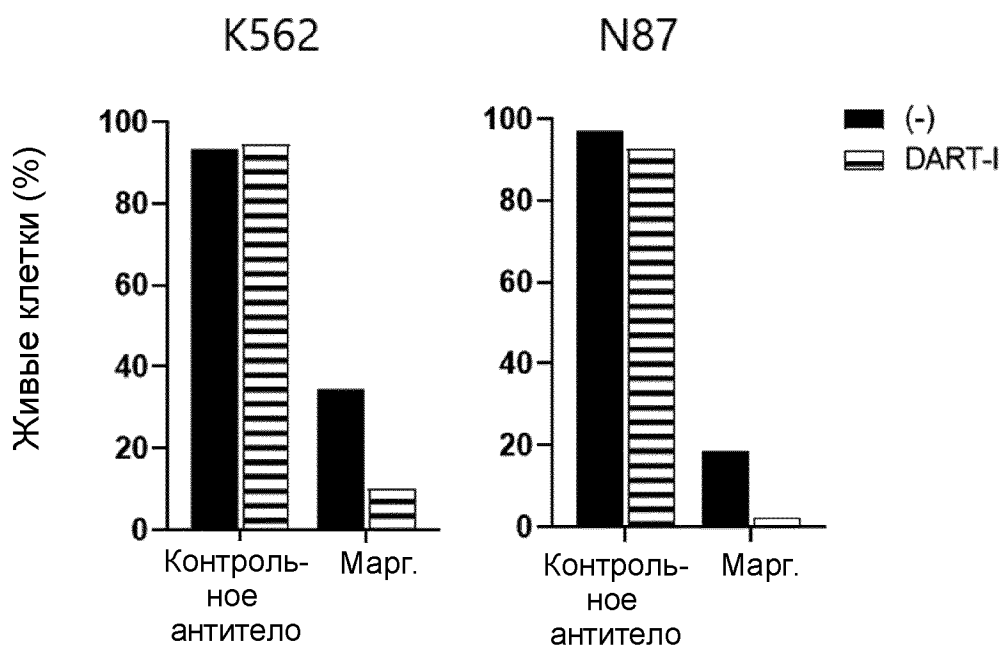


Фигура 11

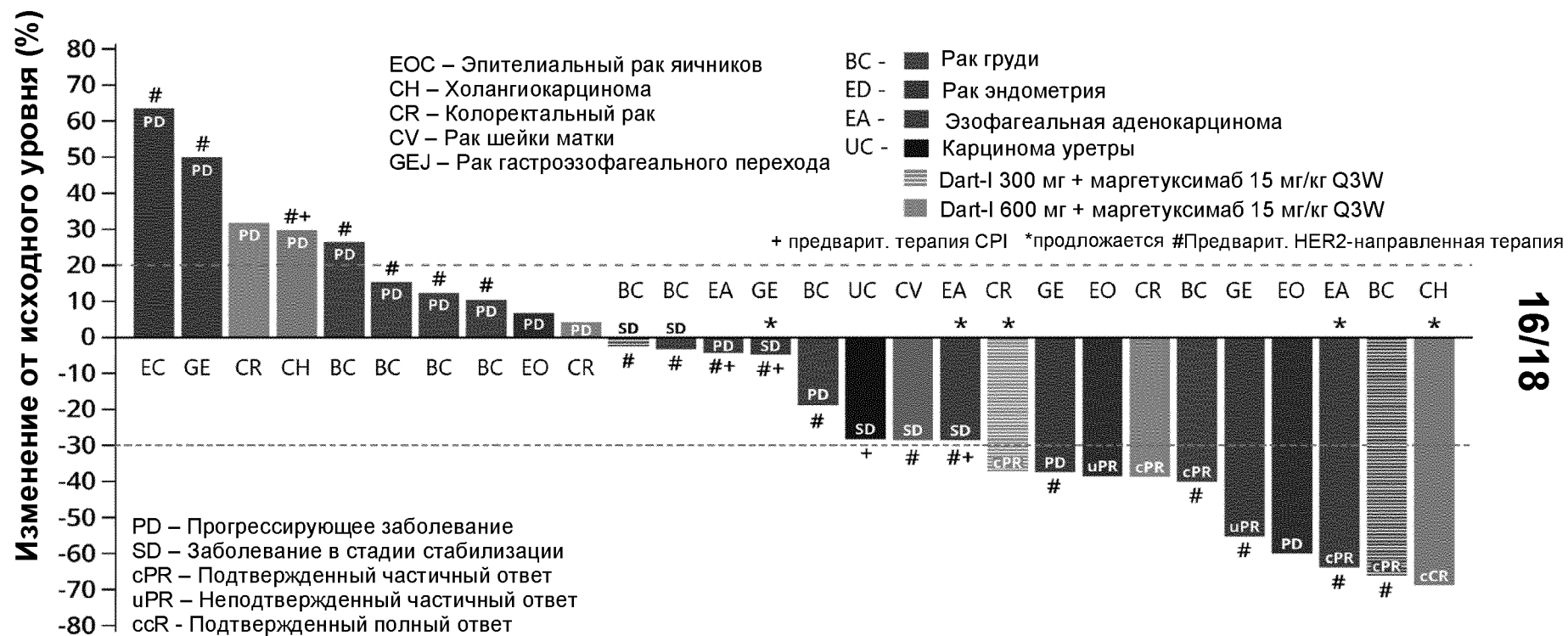
15/18



Фигура 12

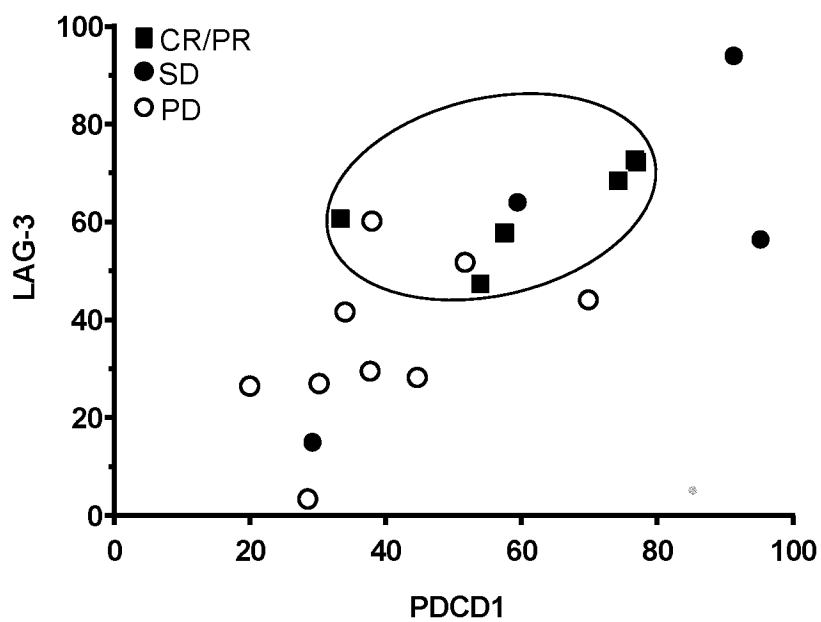


Фигура 13

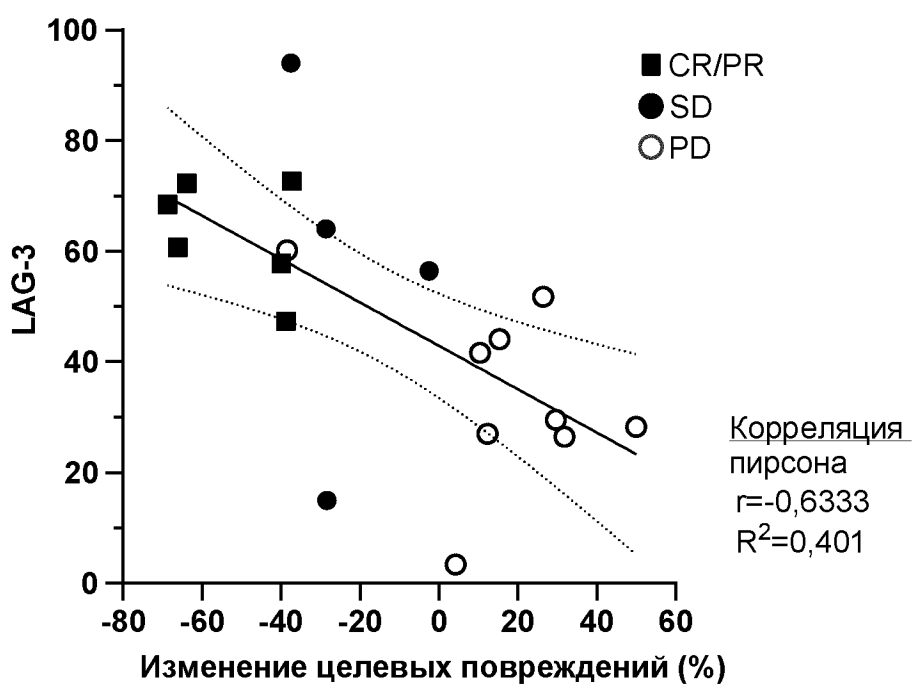


Фигура 14

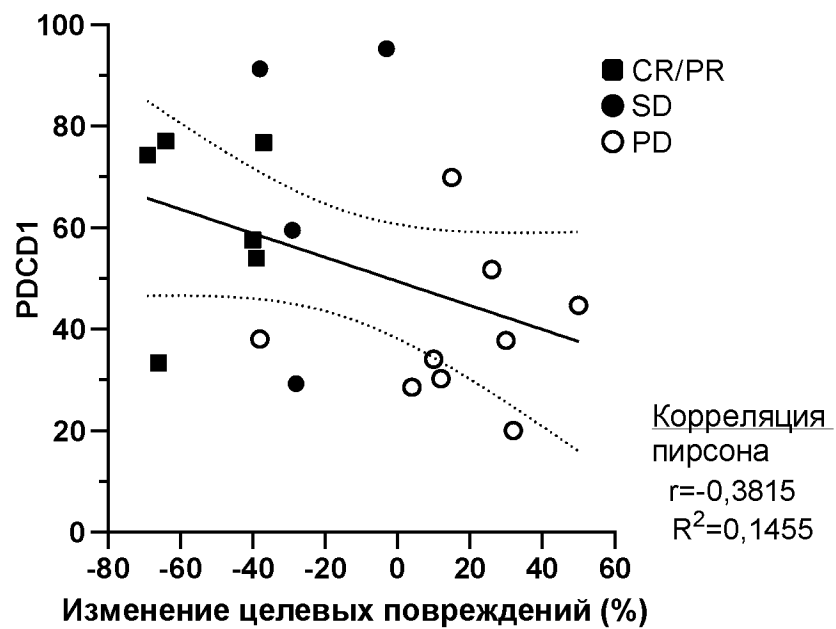
17/18



Фигура 15А



Фигура 15В



Фигура 15С