

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202293166 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.12.23

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.05.03

(54) СВЯЗЫВАЮЩИЕ СОБАЧИЙ PD-1 ПОЛИПЕПТИДЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/019,817

(72) Изобретатель:

(32) 2020.05.04

Пандит Раджай, Тиммер Джон К.,  
Экельман Брендан П., Деверо Куинн  
(US)

(33) US

(86) PCT/US2021/030476

(87) WO 2021/225961 2021.11.11

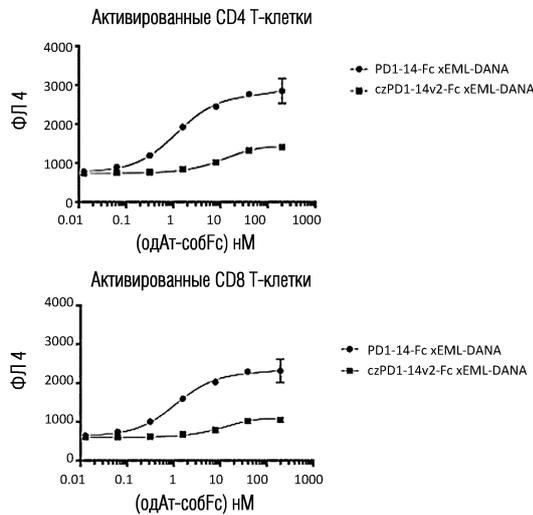
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

ИНХИБРКС, ИНК. (US)

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении предложены VHH-содержащие полипептиды, которые связывают собачий PD-1. В некоторых вариантах осуществления предложены VHH-содержащие полипептиды, которые связывают собачий PD-1 и являются его антагонистами. Также предложены варианты применения VHH-содержащих полипептидов.



202293166 A1

202293166 A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576465EA/030

### СВЯЗЫВАЮЩИЕ СОБАЧИЙ PD-1 ПОЛИПЕПТИДЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

**[0001]** Настоящее изобретение относится к связывающим собачий PD-1 полипептидам и способам применения связывающих собачий PD-1 полипептидов для модуляции биологической активности собачьего PD-1. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, способы лечения рака. В некоторых вариантах осуществления связывающие собачий PD-1 полипептиды представляют собой поливалентные связывающие собачий PD-1 полипептиды.

#### ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0002]** Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты часто включают опухоль-реактивные Т-клетки и НК-клетки, которые подавляются иммунными контрольными точками. Белок программируемой клеточной гибели 1 (PD-1), также известный как CD279, экспрессируется на активированных Т-клетках. PD-1 ингибирует сигнализацию Т-клеточных рецепторов, Т-клеточную пролиферацию и противоопухолевую активность клеток - естественных киллеров (НК) при связывании с PD-L1 (CD274) или PD-L2 (CD273) на соседних клетках в микроокружении опухоли. Антитела, которые связывают PD-1 и уменьшают и/или блокируют связывание PD-L1 или PD-L2 с PD-1, продемонстрировали клиническую пользу при различных типах рака.

**[0003]** Вследствие этого, существует терапевтическая потребность в более сильнодействующих антителах, которые связывают собачий PD-1.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0004]** Настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим по меньшей мере один домен VHH, связывающий собачий PD-1. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит собачью Fc-область. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и CDR3, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен VHH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен VHH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен VHH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен VHH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен VHH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен VHH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен VHH содержит канинизированный вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления каждый домен VHH является канинизированным.

**[0005]** В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит по меньшей мере один домен VHH, содержащий CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 9-13.

**[0006]** В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит два домена VHH. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит три домена VHH. В некоторых вариантах осуществления каждый домен VHH связывает собачий PD-1. В некоторых вариантах осуществления каждый домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; или CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; или CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; или CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления каждый домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и аминокислотную

последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 9-13. В некоторых вариантах осуществления каждый домен VHH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 или 13. В некоторых вариантах осуществления каждый домен VHH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 или 13, или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3, 4 или 5, или канинизированный вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления каждый домен VHH является канинизированным.

**[0007]** В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область собачьего IgGB. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 20. В некоторых таких вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полипептиду, который связывает собачий PD-1, содержащему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17 или 18. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полипептиду, который связывает собачий PD-1, состоящему из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17 или 18.

**[0008]** В различных вариантах осуществления полипептид, предложенный в настоящем документе, образует димер в физиологических условиях. В некоторых таких вариантах осуществления полипептид содержит Fc-область.

**[0009]** В некоторых вариантах осуществления полипептид уменьшает или блокирует связывание PD-L1 с PD-1 *in vitro* и/или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления полипептид уменьшает связывание PD-L1 с PD-1 *in vitro* на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90%. В некоторых вариантах осуществления полипептид блокирует связывание PD-L1 с PD-1 *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления полипептид блокирует связывание PD-L1 с PD-1 *in vitro* с величиной IC<sub>50</sub> менее 100 нМ, менее 75 нМ, менее 50 нМ, менее 40 нМ, менее 30 нМ, менее 20 нМ или менее 10 нМ.

**[0010]** В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет пониженное связывание с компонентами CD16, CD32 и/или CD64 собачьего Fc-рецептора. В некоторых вариантах осуществления связывание полипептидом *in vitro* и/или *in vivo* собачьего CD16, CD32 и/или CD64 снижено относительно связывания полипептидом, содержащим Fc-область IgGB дикого типа. В некоторых вариантах осуществления связывание полипептида с CD16 *in vitro* снижено по меньшей мере в 1,5-раза или по меньшей мере в 2 раза. В некоторых вариантах осуществления связывание полипептида с CD32 или CD64 *in vitro* снижено по меньшей мере в 10000 раз. В некоторых вариантах осуществления полипептид отличается пониженной активацией комплемента и/или пониженным воспалением *in vivo* в сравнении с полипептидом, содержащим Fc-область IgGB дикого типа.

**[0011]** В различных вариантах осуществления полипептид, содержащий по меньшей мере один домен VHH, связывающий собачий PD-1, предложенный в настоящем

документе, является антагонистом биологической активности собачьего PD-1. В некоторых вариантах осуществления полипептид связывает собачий PD-1 с аффинностью ( $K_D$ ), составляющей менее 100 нМ, менее 50 нМ, менее 25 нМ или менее 10 нМ.

**[0012]** В некоторых вариантах осуществления предложены фармацевтические композиции, содержащие полипептид, содержащий по меньшей мере один домен VHH, связывающий собачий PD-1, предложенный в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, содержащий по меньшей мере один домен VHH, связывающий собачий PD-1, предложенный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления предложена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту или вектор. В некоторых вариантах осуществления предложена клетка-хозяин, экспрессирующая полипептид, содержащий по меньшей мере один домен VHH, связывающий собачий PD-1, предложенный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления предложен способ получения полипептида, содержащего по меньшей мере один домен VHH, связывающий собачий PD-1, включающий инкубацию клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии полипептида. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение полипептида.

**[0014]** В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения рака, включающие введение субъекту, страдающему от рака, фармацевтически эффективного количества полипептида, содержащего по меньшей мере один домен VHH, связывающий собачий PD-1, предложенный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лимфому, гемангиосаркому, тучноклеточную карциному, меланому, остеосаркому или рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лимфому высокой степени злокачественности, гистиоцитарную саркому, злокачественный гистиоцитоз, уротелиальную карциному или плоскоклеточную карциному полости рта. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из почечно-клеточной карциномы, немелкоклеточного рака легкого, базально-клеточной карциномы, рака желчевыводящих путей; рака мочевого пузыря; рака кости; рака головного мозга и центральной нервной системы; рака молочной железы; рака брюшины; рака шейки матки; хориокарциномы; рака толстой и прямой кишки; рака соединительной ткани; рака пищеварительной системы; рака эндометрия; рака пищевода; рака глаза; рака головы и шеи; рака желудка; рака желудочно-кишечного тракта; глиобластомы; карциномы печени; гепатомы; интраэпителиального новообразования; рака почки или почечно-клеточного рака; рака гортани; рака печени; рака легкого; мелкоклеточного рака легкого; аденокарциномы легкого; плоскоклеточного рака легкого; миеломы; нейробластомы; рака ротовой полости; рака яичников; рака поджелудочной железы; рака предстательной железы; ретинобластомы; рабдомиосаркомы; рака прямой кишки; рака дыхательной системы; рака слюнной железы; саркомы; рака кожи;

плоскоклеточного рака; рака желудка; рака яичек; рака щитовидной железы; рака матки или эндометрия; рака мочевыделительной системы; рака вульвы; лимфомы; неходжкинской лимфомы; В-клеточной лимфомы; низкоккачественной/фолликулярной неходжкинской лимфомы (НХЛ); мелколимфоцитарной (МЛ) НХЛ; средней степени злокачественности/фолликулярной НХЛ; диффузной НХЛ средней степени злокачественности; иммунобластной НХЛ высокой степени злокачественности; лимфобластной НХЛ высокой степени злокачественности; мелкоклеточной НХЛ с нерасщепленными ядрами высокой степени злокачественности; генерализованной НХЛ; лимфомы из клеток мантийной зоны; лимфомы, связанной со СПИДом; макроглобулинемии Вальденстрема; хронического лимфолейкоза (ХЛЛ); острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ); волосатоклеточного лейкоза и хронического миелобластного лейкоза.

**[0015]** В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака также включает применение дополнительного терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой противораковое средство. В некоторых вариантах осуществления противораковое средство выбрано из химиотерапевтического средства, противоракового биологического средства, радиотерапии, CAR-T-клеточной терапии и онколитического вируса. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой противораковое биологическое средство. В некоторых вариантах осуществления противораковое биологическое средство представляет собой средство, ингибирующее PD-1 и/или PD-L1. В некоторых вариантах осуществления противораковое биологическое средство представляет собой средство, ингибирующее VISTA, gpNMB, B7H3, B7H4, HHLA2, CD73, CTLA4 или TIGIT. В некоторых вариантах осуществления противораковое биологическое средство представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления противораковое биологическое средство представляет собой цитокин. В некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой CAR-T-клеточную терапию. В некоторых вариантах осуществления противораковое средство представляет собой онколитический вирус. В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака, предложенный в настоящем документе, дополнительно включает резекцию опухоли и/или радиотерапию.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

**[0016]** ФИГ. 1А-1В показывают связывание антител, содержащих домен VHH, с клетками 293FS, экспрессирующими собачий PD-1.

**[0017]** ФИГ. 2А-2В показывают связывание собачьего PD-L1 с клетками 293FS, экспрессирующими собачий PD-1, в присутствии возрастающих концентраций антител, содержащих домен VHH, который связывает собачий PD-1.

**[0018]** ФИГ. 3А-3С показывают связывание антител, содержащих дикого типа или мутантную Fc-область собачьего IgGB, с компонентом Fc-рецептора CD16 (ФИГ. 3А), CD32 (ФИГ. 3В) или CD64 (ФИГ. 3С).

**[0019]** ФИГ. 4А-4В показывают активацию CD4 (ФИГ. 4А) и CD8 (ФИГ. 4В) Т-клеток в присутствии возрастающих концентраций антител, содержащих домен V<sub>H</sub>H, связывающий собачий PD-1, и мутантную Fc-область собачьего IgGВ.

**[0020]** ФИГ. 5А-5 показывают средние концентрации в плазме анти-PD-1 одАт после первой и второй внутривенных инфузий одАт собакам. Планки погрешностей показывают стандартное отклонение от среднего значения для трех собак в каждой группе.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0021]** Варианты осуществления, предложенные в настоящем документе, относятся к связывающим собачий PD-1 полипептидам, которые модулируют активность собачьего PD-1, и их применению в различных способах лечения рака.

#### Определения и различные варианты осуществления

**[0022]** Заголовки разделов, используемые в настоящем документе, предназначены лишь для организационных целей и не должны быть истолкованы как ограничивающие описываемый объект изобретения.

**[0023]** Все литературные источники, цитируемые в настоящем документе, включая патентные заявки, патентные публикации и регистрационные номера Genbank, включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы было бы указано, что каждый отдельный литературный источник специально и индивидуально включен посредством ссылки в полном объеме. В случае любого несоответствия или противоречия между материалом, включенным посредством ссылки, и четко описанным содержанием, представленным в настоящем документе, четко описанное содержание имеет преимущественную силу.

**[0024]** Способы и процедуры, описанные или упомянутые в настоящем документе, как правило, хорошо понятны и обычно используются специалистами в данной области с применением традиционной методологии, такой как, например, широко используемые методологии, описанные в Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3-е издание (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al. eds.*, (2003)); серия METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor *eds.* (1995)), Harlow and Lane, *eds.* (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, и ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, *ed.* (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, *ed.*, 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, *ed.*, 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney), *ed.*, 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, *eds.*, 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, *eds.*); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, *eds.*, 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, *eds.*, 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan *et al.*, *eds.*, 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A.

Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); и Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 1993); а также их обновленных версиях.

**[0025]** Если нет иных указаний, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, должны иметь значения, обычно понятные специалистам в данной области. Кроме того, если иное не требуется по контексту или прямо не указано, термины в единственном числе должны включать термины во множественном числе, а термины во множественном числе должны включать термины в единственном числе. В случае любых противоречий в определениях между различными источниками или документами определение, представленное в настоящем документе, будет иметь преимущественную силу.

**[0026]** Как правило, нумерация остатков в тяжелой цепи иммуноглобулина соответствует индексу ЕС, описанному в Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е издание, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).

**[0027]** Понятно, что варианты осуществления изобретения, описанные в настоящем документе, включают «состоящие» и/или «состоящие в основном из» варианты осуществления. При использовании в настоящем документе форма единственного числа терминов включает также форму множественного числа, и конкретная ссылка включает множество ссылок, если нет иных указаний. Использование в настоящем документе термина «или» не должно означать, что альтернативы являются взаимоисключающими.

**[0028]** При использовании в настоящей заявке «или» означает «и/или», если иное прямо не указано или не очевидно для специалистов в данной области. В контексте множественного зависимого пункта формулы изобретения использование «или» относится к более чем одному предыдущему независимому или зависимому пункту формулы изобретения.

**[0029]** Выражения «эталонный образец», «эталонная клетка» или «эталонная ткань» означают образец по меньшей мере с одной известной характеристикой, который можно использовать для сравнения с образцом по меньшей мере с одной неизвестной характеристикой. В некоторых вариантах осуществления эталонный образец можно использовать в качестве положительного или отрицательного индикатора. Эталонный образец можно использовать для установления уровня белка и/или мРНК, который имеет место, например, в здоровой ткани, в отличие от уровня белка и/или мРНК, имеющего место в образце с неизвестными характеристиками. В некоторых вариантах осуществления эталонный образец получен от того же субъекта, но из другой части тела субъекта, отличной от тестируемой. В некоторых вариантах осуществления эталонный образец получен из области ткани, окружающей или прилегающей к раковой опухоли. В некоторых

вариантах осуществления эталонный образец получен не от тестируемого субъекта, а является образцом от субъекта, который, как известно, имеет или не имеет изучаемое заболевание (например, конкретный вид рака или заболевание, связанное с PD-1). В некоторых вариантах осуществления эталонный образец получен от того же субъекта, но в момент времени до того, как у субъекта развился рак. В некоторых вариантах осуществления эталонный образец получен из образца доброкачественной опухоли того же, или другого, субъекта. Когда для сравнения используют отрицательный эталонный образец, уровень экспрессии или количество рассматриваемой молекулы в отрицательном эталонном образце будет указывать на уровень, при котором специалист в данной области поймет, с учетом настоящего изобретения, что молекула отсутствует и/или присутствует на низком уровне. Когда для сравнения используют положительный эталонный образец, уровень экспрессии или количество рассматриваемой молекулы в положительном эталонном образце будет указывать на уровень, при котором специалист в данной области поймет, с учетом настоящего изобретения, что молекула присутствует на определенном уровне.

**[0030]** Термины «польза», «клиническая польза», «восприимчивость» и «терапевтическая восприимчивость», используемые в настоящем документе в контексте пользы или реакции на введение терапевтического средства, могут быть количественно определены путем оценки различных конечных точек, таких как ингибирование, в некоторой степени, прогрессирования заболевания, включая замедление и полную остановку; уменьшение числа эпизодов заболевания и/или симптомов; уменьшение размера очага поражения; ингибирование (то есть уменьшение, замедление или полное прекращение) инфильтрации патологических клеток в соседние периферические органы и/или ткани; ингибирование (то есть уменьшение, замедление или полное прекращение) распространения болезни; облегчение, в некоторой степени, одного или более симптомов, связанных с заболеванием; увеличение продолжительности безрецидивного периода после лечения, например, выживаемость без прогрессирования заболевания; повышение общей выживаемости; более высокая степень реагирования; и/или снижение смертности в определенный момент времени после лечения. Субъект или рак, которые «не реагируют» или «не отвечают», являются такими, которые не соответствуют отмеченным выше требованиям, предъявляемым к «восприимчивым».

**[0031]** Термин «собака» применительно к субъекту включает, но без ограничения, домашних собак.

**[0032]** Термины «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» могут быть использованы взаимозаменяемо, и означают полимер из нуклеотидов. Такие полимеры из нуклеотидов могут содержать природные и/или неприродные нуклеотиды, и включают, но без ограничения, ДНК, РНК и ПНК. «Последовательность нуклеиновой кислоты» означает линейную последовательность нуклеотидов, входящих в состав молекулы нуклеиновой кислоты или полинуклеотида.

**[0033]** Термины «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо для

обозначения полимера из аминокислотных остатков, и не имеют ограничений по минимальной длине. Такие полимеры из аминокислотных остатков могут содержать природные и/или неприродные аминокислотные остатки, и включают, но без ограничения, пептиды, олигопептиды, димеры, тримеры и мультимеры из аминокислотных остатков. Как полноразмерные белки, так и их фрагменты, охвачены данным определением. Термины также охватывают полипептиды, подвергнутые после экспрессии модификациям, таким как гликозилирование, сиалирование, ацетилирование, фосфорилирование и тому подобное. Более того, для целей настоящего изобретения термин «полипептид» означает белок, имеющий модификации, такие как делеции, добавления и замены (как правило, консервативные по характеру), в природной последовательности при условии, что белок сохраняет желаемую активность. Эти модификации могут быть преднамеренными, например, за счет сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например, в результате мутаций в клетках хозяина, продуцирующих белки, или ошибок вследствие ПЦР-амплификации.

**[0034]** Используемый в настоящем документе термин «PD-1» относится к любому природному зрелому PD-1, образующемуся в результате процессинга предшественника PD-1 в клетке. Термин включает PD-1 от любых позвоночных, включая млекопитающих, таких как псовые и кошачьи, если нет иных указаний. Термин также охватывает встречающиеся в природе варианты PD-1, такие как варианты сплайсинга или аллельные варианты. Неограничивающий пример аминокислотной последовательности собачьего PD-1 приведен, например, в GenBank под регистрационным № BA074171.1. Смотри SEQ ID NO: 1.

**[0035]** Термин «специфически связывает» антиген или эпитоп является термином, хорошо известным в данной области, и способы определения такого специфического связывания также хорошо известны в данной области. Говорят, что молекула проявляет «специфическое связывание» или «предпочтительное связывание», если она вступает в реакцию или связывается чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретной клеткой или веществом, чем с другими клетками или веществами. Одномоментное антитело (одАт), или VHH-содержащий полипептид, «специфически связывается» или «предпочтительно связывается» с мишенью, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, легкостью и/или с большей продолжительностью, чем связывается с другими веществами. Например, полипептид, одАт, или VHH-содержащий полипептид, который специфически или преимущественно связывается с эпитопом PD-1, представляет собой одАт, или VHH-содержащий полипептид, которое связывается с этим эпитопом с большей аффинностью, авидностью, легкостью и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими эпитопами PD-1 или эпитопами не PD-1. При прочтении этого определения также понятно, что, например, одАт, или VHH-содержащий полипептид, которое специфически или предпочтительно связывается с первой мишенью, может, или не может, специфически или предпочтительно связываться со второй мишенью. Следовательно, «специфическое

связывание» или «предпочтительное связывание» не обязательно требует (хотя может включать) исключительного связывания. Как правило, но не обязательно, упомянутое связывание означает предпочтительное связывание. «Специфичность» означает способность связывающего белка избирательно связывать антиген.

**[0036]** Используемый в настоящем документе термин «модулировать» применительно к активности PD-1 означает изменять активность PD-1. В некоторых вариантах осуществления «модулировать» означает уменьшать активность PD-1 в сравнении с активностью PD-1 в отсутствие модулятора.

**[0037]** Используемый в настоящем документе термин «эпитоп» означает сайт на молекуле-мишени (например, антигене, таком как белок, нуклеиновая кислота, углевод или липид), с которым связывается антигенсвязывающая молекула (например, одАт или VHH-содержащий полипептид). Эпитопы часто включают химически активную поверхностную группу молекул, таких как аминокислоты, полипептиды или сахарные боковые цепи, и имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Эпитопы могут быть образованы как из смежных, так и/или расположенных рядом несмежных остатков (например, аминокислот, нуклеотидов, сахаров, липидных фрагментов) молекулы-мишени. Эпитопы, образованные из смежных остатков (например, аминокислот, нуклеотидов, сахаров, липидных фрагментов), обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные в результате третичной укладки, обычно утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп может включать, но без ограничения, по меньшей мере 3, по меньшей мере 5 или 8-10 остатков (например, аминокислот или нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления длина эпитопа составляет менее 20 остатков (например, аминокислот или нуклеотидов), менее 15 остатков или менее 12 остатков. Два антитела могут связывать один и тот же эпитоп в составе антигена, если они демонстрируют конкурентное связывание с антигеном. В некоторых вариантах осуществления эпитоп может быть идентифицирован по определенному минимальному расстоянию до остатка CDR на антигенсвязывающей молекуле. В некоторых вариантах осуществления эпитоп может быть идентифицирован по указанному выше расстоянию и дополнительно ограничен остатками, вовлеченными в связь (например, водородную связь) между остатком антигенсвязывающей молекулы и остатком антигена. Эпитоп также может быть идентифицирован с помощью различных сканирований; например, сканирование аланином или аргинином может указывать на один или более остатков, с которыми может взаимодействовать антигенсвязывающая молекула. Если нет иных указаний, набор остатков в качестве эпитопа не исключает, что другие остатки являются частью эпитопа для конкретной антигенсвязывающей молекулы. Скорее наличие такого набора определяет минимальную серию (или набор вариантов) эпитопов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления набор остатков, идентифицированный как эпитоп, определяет минимальный эпитоп применительно к антигену, а не исключительный список остатков для эпитопа на антигене.

**[0038]** «Нелинейный эпитоп» или «конформационный эпитоп» включает несмежные полипептиды, аминокислоты и/или сахара в антигенном белке, с которыми связывается антигенсвязывающая молекула, специфичная для эпитопа. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из остатков будет несмежным с другими отмеченными остатками эпитопа; однако один или более остатков также могут быть смежными с другими остатками.

**[0039]** «Линейный эпитоп» включает смежные полипептиды, аминокислоты и/или сахара в составе антигенного белка, с которыми связывается антигенсвязывающая молекула, специфичная для эпитопа. Отмечено, что в некоторых вариантах осуществления не каждый из остатков в линейном эпитопе обязательно должен быть непосредственно связан (или вовлечен в связь) с антигенсвязывающей молекулой. В некоторых вариантах осуществления линейные эпитопы могут быть получены в результате иммунизации пептидом, который эффективно состоит из последовательности линейного эпитопа, или из структурных участков белка, которые относительно изолированы от остальной части белка, так, что антигенсвязывающая молекула может взаимодействовать (по меньшей мере в первую очередь) только с этим участком последовательности.

**[0040]** Термины «антитело» и «антигенсвязывающая молекула» используются взаимозаменяемо в самом широком смысле и охватывают различные полипептиды, которые содержат антителоподобные антигенсвязывающие домены, включая, но без ограничения, обычные антитела (как правило, содержащие по меньшей мере одну тяжелую цепь и по меньшей мере одну легкую цепь), однодоменные антитела (одАт, содержащие только одну цепь, которая обычно аналогична тяжелой цепи), VHH-содержащие полипептиды (полипептиды, содержащие по меньшей мере один переменный домен антитела только с тяжелой цепью, или VHH), а также фрагменты любого из вышеперечисленных, при условии, что они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит домен димеризации. Такие домены димеризации включают, но не ограничиваются ими, константные домены тяжелой цепи (содержащие СН1, шарнир, СН2 и СН3, где СН1 обычно спаривается с константным доменом легкой цепи, CL, в то время как шарнир опосредует димеризацию) и Fc-области (содержащие шарнир, СН2 и СН3, где шарнир опосредует димеризацию).

**[0041]** Термин «антитело» также охватывает, но не ограничивается ими, химерные антитела, гуманизированные антитела, канинизированные антитела, фелинизированные антитела и антитела различных видов, таких как верблюдовые (включая лам), акула, мышь, человек, яванский макак и так далее.

**[0042]** В настоящем документе термины «однодоменное антитело» и «одАт» используются взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего такой домен, как пара переменных доменов тяжелых цепей (или VHH), без легкой цепи.

**[0043]** Используемый в настоящем документе термин «VHH», или «домен VHH», или «антигенсвязывающий домен VHH», означает антигенсвязывающий фрагмент однодоменного антитела, такого как антитело верблюда или антитело акулы. В некоторых

вариантах осуществления VHH содержит три области CDR и четыре каркасные области, обозначенные FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В некоторых вариантах осуществления VHH может быть укорочен на N-конце или C-конце, так что он содержит только частичные FR1 и/или FR4, или лишен одной или обеих этих каркасных областей, при условии, что VHH в значительной степени сохраняет способность к связыванию антигена и специфичность.

**[0044]** Термин «VHH-содержащий полипептид» означает полипептид, который содержит по меньшей мере один домен VHH. В некоторых вариантах осуществления полипептид VHH содержит два, три или четыре, или более доменов VHH, где все домены VHH могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления VHH-содержащий полипептид содержит Fc-область. В некоторых таких вариантах осуществления полипептид VHH может образовывать димер. Неограничивающие структуры VHH-содержащих полипептидов включают VHH<sub>1</sub>-Fc, VHH<sub>1</sub>-VHH<sub>2</sub>-Fc и VHH<sub>1</sub>-VHH<sub>2</sub>-VHH<sub>3</sub>-Fc, где VHH<sub>1</sub>, VHH<sub>2</sub> и VHH<sub>3</sub> могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления таких структур один VHH может быть соединен с другим VHH линкером, или один VHH может быть соединен с Fc-областью линкером. В некоторых таких вариантах осуществления линкер содержит 1-20 аминокислот, предпочтительно 1-20 аминокислот, преимущественно состоящих из глицина и, не обязательно, серина. В некоторых вариантах осуществления, когда VHH-содержащий полипептид содержит Fc-область, он образует димер. Таким образом, структура VHH<sub>1</sub>-VHH<sub>2</sub>-Fc, если она образует димер, считается четырехвалентной (то есть, димер имеет четыре домена VHH). Аналогично, структура VHH<sub>1</sub>-VHH<sub>2</sub>-VHH<sub>3</sub>-Fc, если она образует димер, считается шестивалентной (то есть, димер имеет шесть доменов VHH).

**[0045]** Термин «моноклональное антитело» означает антитело (включая одАт или VHH-содержащий полипептид) из практически однородной популяции антител, то есть, отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью и направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты антигена. Таким образом, образец моноклональных антител может связываться с одним и тем же эпитопом на антигене. Определение «моноклональное» указывает на то, что антитело получено из практически однородной популяции антител, и его не следует толковать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела могут быть получены методом гибридом, впервые описанным Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495, или могут быть получены методами рекомбинантных ДНК, такими как описанные в патенте США № 4816567. Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек, созданных с использованием способов, описанных, например, в McCafferty *et al.*, 1990, Nature 348:552-554.

**[0046]** Термин «CDR» означает определяющую комплементарность область, определяемую специалистом в данной области по меньшей мере одним способом идентификации. В некоторых вариантах осуществления CDR могут быть определены в соответствии с любой из систем нумерации Chothia, системой нумерации Kabat, сочетанием систем Kabat и Chothia, определением AbM и/или определением контакта. VHH содержит три области CDR, обозначенные CDR1, CDR2 и CDR3.

**[0047]** Используемый в настоящем документе термин «константная область тяжелой цепи» означает область, содержащую по меньшей мере три константных домена тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3). Некоторые константные области тяжелой цепи также содержат шарнир между доменами CH1 и CH2 и/или домен CH4. Безусловно, делеции и изменения внутри доменов, не изменяющие функцию, охвачены термином «константная область тяжелой цепи», если нет иных указаний. Некоторые изоотипы антител собак могут быть дополнительно подразделены на подклассы. Например, собачьи антитела IgG включают, но не ограничиваются ими, антитела IgGA, IgGB, IgGC и IgGD.

**[0048]** Используемый в настоящем документе термин «Fc-область» означает фрагмент константной области тяжелой цепи, содержащий CH2 и CH3. В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит шарнир, CH2 и CH3. В различных вариантах осуществления, когда Fc-область содержит шарнир, шарнир опосредует димеризацию между двумя Fc-содержащими полипептидами. Fc-область может относиться к любому изоотипу константной области тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область собачьего IgGA, IgGB, IgGC или IgGD. В некоторых вариантах осуществления Fc-область представляет собой Fc-область собачьего IgGB.

**[0049]** Используемый в настоящем документе термин «акцепторная собачья каркасная область» означает каркасную область, содержащую аминокислотную последовательность каркасной области переменного домена тяжелой цепи (VH) из каркасной области собачьего иммуноглобулина, как описано в настоящем документе. Акцепторная собачья каркасная область из каркасной области собачьего иммуноглобулина или консенсусной собачьей каркасной области может иметь ту же аминокислотную последовательность или может иметь изменения аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления число аминокислотных изменений составляет менее 10 или менее 9, или менее 8, или менее 7, или менее 6, или менее 5, или менее 4, или менее 3, по всей длине собачьей каркасной области в одном антигенсвязывающем домене, таком как VHH.

**[0050]** «Аффинность» означает силу общей суммы нековалентных взаимодействий между одним связывающим сайтом молекулы (например, антитела или VHH-содержащего полипептида) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Аффинность или кажущаяся аффинность молекулы X к ее партнеру Y, как правило, может быть представлена константой диссоциации ( $K_D$ ) или  $K_{D-кажущейся}$ , соответственно. Аффинность может быть измерена обычными методами, известными в данной области (такими как, например,

ELISA  $K_D$ , KinExA, проточная цитометрия и/или устройства поверхностного плазмонного резонанса), включая описанные в настоящем документе. Такие методы включают, но не ограничиваются ими, методы с применением BIAcore<sup>®</sup>, Octet<sup>®</sup> или проточной цитометрии.

**[0051]** Используемый в настоящем документе термин « $K_D$ » означает равновесную константу диссоциации при взаимодействии антигенсвязывающей молекулы с антигеном. Используемый в настоящем документе термин « $K_D$ » включает  $K_D$  и  $K_{D\text{-кажущаяся}}$ . Используемый в настоящем документе термин  $K_{D\text{-кажущаяся}}$  означает концентрацию антигенсвязывающей молекулы или антигена, при которой 50% антигенсвязывающей молекулы или антигена связано с антигеном или антигенсвязывающей молекулой, соответственно.

**[0052]** В некоторых вариантах осуществления  $K_D$  антигенсвязывающей молекулы измеряют методом проточной цитометрии, используя антиген-экспрессирующую линию клеток и подставляя среднее значение флуоресценции при каждой концентрации антитела в нелинейное уравнение односайтового связывания (Prism Software graphpad). В некоторых таких вариантах осуществления  $K_D$  представляет собой  $K_{D\text{-кажущаяся}}$ .

**[0053]** Термин «биологическая активность» относится к любому одному или более биологическим свойствам молекулы (либо имеющимся естественным образом *in vivo*, либо предоставленным или активированным рекомбинантными методами). Биологические свойства включают, но без ограничения, связывание лиганда, индукцию или усиление клеточной пролиферации (например, Т-клеточной пролиферации), а также индукцию или повышение экспрессии цитокинов.

**[0054]** Используемый в настоящем документе термин «активность PD-1», или «биологическая активность PD-1», включает любой биологический эффект или по меньшей мере одну из биологически важных функций белка PD-1. В некоторых вариантах осуществления активность PD-1 включает способность PD-1 взаимодействовать или связываться с лигандом 1 PD-1 (PD-1L) или лигандом 2 PD-1 (PD-2L). Кроме того, неограничивающие примеры активности PD-1 включают уменьшение сигнализации Т-клеточного рецептора (TCR), уменьшение пролиферации CD4<sup>+</sup> и/или CD8<sup>+</sup> Т-клеток, снижение экспрессии и/или активности СК2 в Т-клетках и повышение экспрессии убиквитин-лигазы E3 семейства CBL в Т-клетках.

**[0055]** «Агонистическое» или «активирующее» антитело (такое как одАт или VHH-содержащий полипептид) представляет собой антитело, которое повышает и/или запускает биологическую активность антигена-мишени. В некоторых вариантах осуществления агонистическое антитело связывает антиген и повышает его биологическую активность на по меньшей мере примерно 20%, 40%, 60%, 80%, 85% или более.

**[0056]** «Антагонистическое», «блокирующее» или «нейтрализующее» антитело представляет собой антитело, которое уменьшает и/или устраняет биологическую активность антигена-мишени. В некоторых вариантах осуществления нейтрализующее антитело связывает антиген и уменьшает его биологическую активность на по меньшей мере примерно 20%, 40%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более.

**[0057]** VHH-содержащий полипептид «с созревшей аффинностью» означает VHH-содержащий полипептид с одним или более изменениями в одной или более областях CDR в сравнении с исходным VHH-содержащим полипептидом, не имеющим таких изменений, причем такие изменения приводят к улучшению аффинности VHH-содержащего полипептида к антигену.

**[0058]** Используемый в настоящем документе термин «канинизированный VHH» означает VHH, в котором одна или более каркасных областей были в значительной степени заменены собачьими каркасными областями. В некоторых случаях некоторые остатки каркасной области (FR) собачьего иммуноглобулина заменены соответствующими не собачьими остатками. Кроме того, канинизированный VHH может содержать остатки, которые не встречаются ни в исходном VHH, ни в каркасных последовательностях собак, но включены для дальнейшего уточнения и оптимизации характеристик VHH или VHH-содержащего полипептида. В некоторых вариантах осуществления канинизированный VHH-содержащий полипептид содержит собачью Fc-область или собачью константную область тяжелой цепи. Понятно, что канинизированная последовательность может быть идентифицирована по ее первичной последовательности и не обязательно отражает процесс, с помощью которого было создано антитело.

**[0059]** «Эффектор-положительная Fc-область» обладает «эффекторной функцией» Fc-области с нативной последовательностью. Примеры «эффекторных функций» включают связывание Fc-рецептора; связывание C1q и зависимую от комплемента цитотоксичность (CDC); связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора), активацию B-клеток и так далее. Такие эффекторные функции обычно требуют объединения Fc-области со связывающим доменом (например, варибельным доменом антитела) и могут быть оценены с помощью различных анализов.

**[0060]** «Fc-область с нативной последовательностью» содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, встречающейся в природе. Собачьи Fc-области с нативной последовательностью включают Fc-область собачьего IgGA с нативной последовательностью; Fc-область собачьего IgGB с нативной последовательностью; Fc-область собачьего IgGC с нативной последовательностью и Fc-область собачьего IgGD с нативной последовательностью, а также их встречающиеся в природе варианты.

**[0061]** «Вариантная Fc-область» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности Fc-области с нативной последовательностью за счет по меньшей мере одной аминокислотной модификации. В некоторых вариантах осуществления «вариантная Fc-область» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности Fc-области с нативной последовательностью по меньшей мере одной аминокислотной модификацией, но при этом сохраняет по меньшей мере одну эффекторную функцию Fc-области с нативной последовательностью. В

некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену в сравнении с Fc-областью с нативной последовательностью или Fc-областью исходного полипептида, например, от примерно одной до примерно десяти аминокислотных замен, и предпочтительно от примерно одной до примерно пяти аминокислотных замен в сравнении с Fc-областью с нативной последовательностью или Fc-областью исходного полипептида. В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область, описанная в настоящем документе, будет иметь по меньшей мере примерно 80% идентичность последовательности с Fc-областью с нативной последовательностью и/или с Fc-областью исходного полипептида, по меньшей мере примерно 90% идентичность последовательности с ними, по меньшей мере примерно 95% идентичность последовательности, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98% или по меньшей мере примерно 99% идентичность последовательности с ними.

**[0062]** «Fc-рецептор» или «FcR» означает рецептор, который связывается с Fc-областью антитела. В некоторых вариантах осуществления FcγR представляет собой нативный собачий FcR. В некоторых вариантах осуществления FcR представляет собой рецептор, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор), и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, в том числе аллельные варианты и формы альтернативного сплайсинга этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют сходные аминокислотные последовательности, различающиеся, прежде всего, их цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит активирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит ингибирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITIM) в своем цитоплазматическом домене. (Смотри, например, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Обзор FcR приведен, например, в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); и de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Другие FcR, в том числе те, которые будут идентифицированы в будущем, в настоящем документе охвачены термином «FcR». Например, термин «Fc-рецептор», или «FcR», также включает неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) и Kim *et al.*, *J. Immunol.*, 24:249 (1994)) и регуляцию гомеостаза иммуноглобулинов. Способы измерения связывания с FcRn известны (смотри, например, Ghetie and Ward, *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton *et al.*).

**[0063]** Термин «практически аналогичные», или «практически такие же», используемый в настоящем документе, означает достаточно высокую степень сходства между двумя или более числовыми значениями, так что специалист в данной области может считать разницу между двумя или более значениями небольшой или не имеющей

биологической и/или статистической значимости в контексте биологической характеристики, измеряемой указанным значением. В некоторых вариантах осуществления два или более практически аналогичных значения отличаются не более чем на одно из следующих значений: 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или 50%.

**[0064]** Полипептидный «вариант» означает биологически активный полипептид, имеющий по меньшей мере примерно 80% идентичность аминокислотной последовательности с полипептидом с нативной последовательностью после выравнивания последовательностей и внесения пробелов, при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей, и без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательностей. Такие варианты включают, например, полипептиды, в которых один или более аминокислотных остатков добавлены или удалены на N- или C-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления вариант будет иметь по меньшей мере примерно 80% идентичность аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления вариант будет иметь по меньшей мере примерно 90% идентичность аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления вариант будет иметь по меньшей мере примерно 95% идентичность аминокислотной последовательности с полипептидом с нативной последовательностью.

**[0065]** В настоящем документе «процентную (%) идентичность аминокислотной последовательности» и «гомологию» применительно к последовательности пептида, полипептида или антитела определяют как процентную долю аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны с аминокислотными остатками в конкретной пептидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и внесения пробелов, при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей, и без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процентной идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, известными специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN™ (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определять соответствующие параметры для определения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

**[0066]** Аминокислотная замена может включать, но без ограничения, замену одной аминокислоты в полипептиде другой аминокислотой. Примеры замен приведены в Таблице 1. Аминокислотные замены могут быть внесены в интересующее антитело, и продукты могут быть подвергнуты скринингу на желаемую активность, например, сохранение/улучшение связывания антигена, снижение иммуногенности или улучшение ADCC или CDC.

**Таблица 1**

Исходный остаток	Иллюстративные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин

**[0067]** Аминокислоты могут быть сгруппированы в соответствии с общими свойствами боковой цепи:

- (1) гидрофобные: Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

**[0068]** Неконсервативные замены представляют собой замену представителя одного из этих классов на представителя другого класса.

**[0069]** Термин «вектор» используют для описания полинуклеотида, который можно сконструировать так, чтобы он содержал клонированный полинуклеотид или полинуклеотиды, которые могут быть размножены в клетке-хозяине. Вектор может содержать один или более из следующих элементов: точку начала репликации, одну или более регуляторных последовательностей (таких как, например, промоторы и/или

энхансеры), которые регулируют экспрессию интересующего полипептида, и/или один или более генов селективных маркеров (таких как, например, гены устойчивости к антибиотикам и гены, которые можно использовать в колориметрических анализах, например, ген  $\beta$ -галактозидазы). Термин «экспрессионный вектор» означает вектор, который используют для экспрессии интересующего полипептида в клетке-хозяине.

**[0070]** Используемый в настоящем документе термин «клетка-хозяин» означает клетку, которая может быть, или была, реципиентом вектора или выделенного полинуклеотида. Клетки-хозяева могут представлять собой прокариотические клетки или эукариотические клетки. Примеры эукариотических клеток включают клетки млекопитающих, такие как клетки приматов или животных, не являющихся приматами; грибковые клетки, такие как дрожжи; растительные клетки и клетки насекомых. Неограничивающие примеры клеток млекопитающих включают, но без ограничения, клетки NSO, клетки PER.C6<sup>®</sup> (Stucell), клетки 293, такие как 293FS, и клетки CHO, а также дополнительные производные клетки, такие как 293-6E, CHO-DG44, CHO-K1, CHO-S и CHO-DS. Клетки-хозяева включают потомство одной клетки-хозяина, и это потомство не обязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или комплементарности геномной ДНК) исходной родительской клетке вследствие естественной, случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные *in vivo* полинуклеотидом(ами), предложенным в настоящем документе.

**[0071]** Используемый в настоящем документе термин «выделенная» относится к молекуле, которая была отделена по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми она обычно встречается в природе или продуцируется. Например, полипептид называют «выделенным», когда он отделен по меньшей мере от некоторых компонентов клетки, в которой он был продуцирован. Когда полипептид секретируется клеткой после экспрессии, физическое отделение супернатанта, содержащего полипептид, от клетки, которая его продуцирует, считают «выделением» полипептида. Аналогично, полинуклеотид называют «выделенным», если он не является частью более крупного полинуклеотида (например, геномной ДНК или митохондриальной ДНК в случае полинуклеотида ДНК), в котором он обычно встречается в природе, или отделен по меньшей мере от некоторых компонентов клетки, в которой он был продуцирован, например, в случае полинуклеотида РНК. Таким образом, полинуклеотид ДНК, который содержится в векторе внутри клетки-хозяина, можно называть «выделенным».

**[0072]** В настоящем документе термин «субъект» используют для обозначения животного; например, млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения млекопитающих, включая, но не ограничиваясь ими, людей, грызунов, обезьян, кошачьих, псовых, лошадей, крупного рогатого скота, свиней, овец, коз, млекопитающих лабораторных животных, млекопитающих сельскохозяйственных животных, млекопитающих спортивных животных и млекопитающих домашних животных. В некоторых примерах «субъект» нуждается в лечении заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления субъект, получающий лечение, был

идентифицирован как имеющий заболевание, подходящее для лечения, или имеющий обоснованный риск развития заболевания.

**[0073]** Используемый в настоящем документе термин «заболевание», или «нарушение», означает состояние, при котором необходимо и/или желательно лечение.

**[0074]** В настоящем документе термины «опухольная клетка», «раковая клетка», «рак», «опухоль» и/или «новообразование», если нет иных указаний, используются взаимозаменяемо и относятся к клетке (или клеткам), проявляющей неконтролируемый рост и/или аномальное увеличение выживаемости и/или ингибирование апоптоза, что препятствует нормальному функционированию органов и систем организма. Данное определение охватывает доброкачественные и злокачественные опухоли, полипы, гиперплазию, а также латентные опухоли или микрометастазы.

**[0075]** Термины «рак» и «опухоль» охватывают солидные и гематологические/лимфатические формы рака, а также включают злокачественный, предраковый и доброкачественный рост, такой как дисплазия. Типичные виды рака включают, но не ограничиваются ими: лимфому, гемангиосаркому, тучноклеточную карциному, меланому, остеосаркому, рак молочной железы, почечно-клеточную карциному и немелкоклеточный рак легкого, лимфому высокой степени злокачественности, гистиоцитарную саркому, злокачественный гистиоцитоз, уротелиальную карциному, плоскоклеточный рак полости рта; базально-клеточную карциному; рак желчевыводящих путей; рак мочевого пузыря; рак кости; рак головного мозга и центральной нервной системы; рак молочной железы; рак брюшины; рак шейки матки; хориокарциному; рак толстой и прямой кишки; рак соединительной ткани; рак пищеварительной системы; рак эндометрия; рак пищевода; рак глаза; рак головы и шеи; рак желудка (включая рак желудочно-кишечного тракта); глиобластому; карциному печени; гепатому; интраэпителиальное новообразование; рак почки или почечно-клеточный рак; рак гортани; лейкемию; рак печени; рак легкого (например, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточный рак легкого); миелому; нейробластому; рак полости рта (губы, языка, ротовой полости и глотки); рак яичников; рак поджелудочной железы; рак предстательной железы; ретинобластому; рабдомиосаркому; рак прямой кишки; рак дыхательной системы; рак слюнной железы; саркому; рак кожи; плоскоклеточный рак; рак желудка; рак яичек; рак щитовидной железы; рак матки или эндометрия; рак мочевыделительной системы; рак вульвы; лимфому, включая лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, а также В-клеточную лимфому (включая низкоклеточную/фолликулярную неходжкинскую лимфому (НХЛ); мелколимфоцитарную (МЛ) НХЛ; средней степени злокачественности/фолликулярную НХЛ; диффузную НХЛ средней степени злокачественности; иммунобластную НХЛ высокой степени злокачественности; лимфобластную НХЛ высокой степени злокачественности; мелкоклеточную НХЛ с нерасщепленными ядрами высокой степени злокачественности; генерализованную НХЛ; лимфому из клеток мантийной зоны; лимфому, связанную со СПИДом; макроглобулинемию Вальденстрема; хронический

лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ); острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ); волосатоклеточный лейкоз, хронический миелобластный лейкоз, а также другие карциномы и саркомы, посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание (ПТЛЗ), а также аномальную пролиферацию сосудов, связанную с факоматозами, отеком (например, связанным с опухолями головного мозга) и синдром Мейгса.

**[0076]** Используемый в настоящем документе термин «неопухолевая клетка» относится к нормальным клеткам или ткани. Примеры неопухолевых клеток включают, но не ограничиваются ими: Т-клетки, В-клетки, клетки - естественные киллеры (НК), Т-клетки - естественные киллеры (НКТ), дендритные клетки, моноциты, макрофаги, эпителиальные клетки, фибробласты, гепатоциты, интерстициальные клетки почек, подобные фибробластам синовиоциты, остеобласты и клетки, расположенные в молочной железе, скелетных мышцах, поджелудочной железе, желудке, яичниках, тонком кишечнике, плаценте, матке, яичках, почках, легких, сердце, головном мозге, печени, предстательной железе, толстой кишке, лимфоидных органах, костях, а также мезенхимальные стволовые клетки костного происхождения. Используемый в настоящем документе термин «клетка или ткань, расположенная на периферии» относится к неопухолевым клеткам, не расположенным рядом с опухолевыми клетками и/или в микроокружении опухоли.

**[0077]** Используемый в настоящем документе термин «клетки или ткань в микроокружении опухоли» относится к клеткам, молекулам, внеклеточному матриксу и/или кровеносным сосудам, которые окружают и/или питают опухолевые клетки. Примеры клеток или тканей в микроокружении опухоли включают, но не ограничиваются ими: сосудистую сеть опухоли; опухоль-инфильтрирующие лимфоциты; ретикулярные клетки фибробластов; эндотелиальные клетки-предшественники (ЭКП); ассоциированные с раком фибробласты; перициты; другие стромальные клетки; компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ); дендритные клетки; антигенпредставляющие клетки; Т-клетки; регуляторные Т-клетки (клетки Treg); макрофаги; нейтрофилы; миелоидные супрессорные клетки (МСК) и другие иммунные клетки, расположенные вблизи опухоли. Способы идентификации опухолевых клеток и/или клеток/тканей, расположенных в микроокружении опухоли, хорошо известны в данной области, как описано ниже в настоящем документе.

**[0078]** В некоторых вариантах осуществления термины «увеличение» или «уменьшение» относятся к статистически значимому увеличению или уменьшению, соответственно. Как будет понятно специалисту в данной области, «модулирование» может также включать изменение (которое может быть либо увеличением, либо уменьшением) аффинности, авидности, специфичности и/или избирательности мишени или антигена в отношении одного или более из его лигандов, партнеров по связыванию, партнеров по ассоциации в гомомультимерную или гетеромультимерную форму, или субстратов; изменение (которое может быть либо увеличением, либо уменьшением) чувствительности мишени или антигена к одному или более условиям в среде или окружающей среде, в которой присутствует мишень или антиген (например, pH, ионной силе, присутствию

кофакторов и так далее), и/или клеточной пролиферации или продуцирования цитокинов в сравнении с теми же условиями, но в отсутствие тестируемого средства. Это можно определять любым подходящим способом и/или с помощью любого подходящего анализа, известного как таковой или описанного в настоящем документе, в зависимости от задействованной мишени.

**[0079]** Используемый в настоящем документе термин «иммунный ответ» охватывает клеточные и/или гуморальные иммунные ответы, достаточные для ингибирования или предотвращения возникновения, либо для ослабления симптомов, заболевания (например, рака или метастазирования рака). «Иммунный ответ» может охватывать аспекты как врожденной, так и адаптивной, иммунной системы.

**[0080]** Используемый в настоящем документе термин «лечение» означает подход для получения полезных или желаемых клинических результатов. Используемый в настоящем документе термин «лечение» охватывает любое введение или применение терапевтического средства для лечения заболевания у млекопитающего. Для целей настоящего изобретения полезные или желаемые клинические результаты включают, но без ограничения, любое одно или более из: облегчения одного или более симптомов, уменьшения степени тяжести заболевания, предотвращения или задержки распространения (например, метастазирования, например метастазирования в легкое или лимфатический узел) заболевания, предотвращения или замедления рецидива заболевания, отсрочки или замедления прогрессирования заболевания, облегчения болезненного состояния, ингибирования заболевания или прогрессирования заболевания, ингибирования или замедления заболевания или его прогрессирования, приостановки его развития и ремиссии (частичной или полной). Термин «лечение» также охватывает уменьшение патологических последствий пролиферативного заболевания. Предложенные в настоящем документе способы предусматривают любой один или более из этих аспектов лечения. В соответствии с вышеизложенным термин «лечение» не подразумевает стопроцентное устранение всех аспектов заболевания.

**[0081]** «Облегчение» означает уменьшение или ослабление одного или более симптомов в сравнении с отсутствием введения терапевтического средства. «Облегчение» также включает сокращение или уменьшение продолжительности симптома.

**[0082]** В настоящем документе термин «противораковое средство» используют в его самом широком смысле для обозначения средств, используемых для лечения одного или более видов рака. Типичные классы таких средств включают, но не ограничиваются ими, химиотерапевтические средства, противораковые биологические средства (такие как цитокины, слитые белки из рецепторного внеклеточного домена и Fc, а также антитела), радиотерапию, CAR-T-клеточную терапию, терапевтические олигонуклеотиды (такие как антисмысловые олигонуклеотиды и киРНК) и онколитические вирусы.

**[0083]** Термин «биологический образец» означает некоторое количество вещества из живого или ранее живого существа. Такие вещества включают, но не ограничиваются ими, кровь (например, цельную кровь), плазму, сыворотку, мочу, амниотическую жидкость,

синовиальную жидкость, эндотелиальные клетки, лейкоциты, моноциты, другие клетки, органы, ткани, костный мозг, лимфатические узлы и селезенку.

**[0084]** Термин «контроль» или «эталон» относится к композиции, которая, как известно, не содержит аналит («отрицательный контроль») или содержит аналит («положительный контроль»). Положительный контроль может содержать аналит в известной концентрации.

**[0085]** Термины «ингибирование» или «ингибировать» означают уменьшение или отмену любой фенотипической характеристики, либо уменьшение или отмену частоты, степени или вероятности этой характеристики. «Уменьшать» или «ингибировать» означает уменьшать, сокращать или приостанавливать активность, функцию и/или количество в сравнении с эталоном. В некоторых вариантах осуществления под «уменьшением» или «ингибированием» подразумевается способность вызывать общее снижение на 10% или более. В некоторых вариантах осуществления под «уменьшением» или «ингибированием» подразумевается способность вызывать общее снижение на 50% или более. В некоторых вариантах осуществления под «уменьшением» или «ингибированием» подразумевается способность вызывать общее снижение на 75%, 85%, 90%, 95% или более. В некоторых вариантах осуществления уменьшение или ингибирование на величину, указанную выше, происходит в течение определенного периода времени относительно контроля в течение того же периода времени.

**[0086]** Используемый в настоящем документе термин «задержка развития заболевания» означает отсрочку, препятствование, замедление, задержку, стабилизацию, подавление и/или отдаление развития заболевания (такого как рак). Эта задержка может иметь разную продолжительность в зависимости от истории заболевания и/или субъекта, которого лечат. Как очевидно специалисту в данной области, достаточная или значительная задержка может, по сути, включать предотвращение в том смысле, что у субъекта не развивается заболевание. Например, поздняя стадия рака, такая как развитие метастазов, может быть отсрочена.

**[0087]** Используемый в настоящем документе термин «предотвращение» включает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого еще не было диагностировано заболевание. Если нет иных указаний, термины «снижать», «ингибировать» или «предотвращать» не означают и не требуют полного предотвращения в течение всего времени, а лишь в течение измеряемого периода времени.

**[0088]** «Терапевтически эффективное количество» вещества/молекулы, агониста или антагониста может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и масса тела субъекта, а также способность вещества/молекулы, агониста или антагониста вызывать у субъекта желаемую реакцию. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое количество, при котором терапевтически полезные эффекты перевешивают любые токсические или вредные эффекты вещества/молекулы, агониста или антагониста. Терапевтически эффективное

количество может быть доставлено за одно или более введений. «Терапевтически эффективное количество» означает количество, эффективное в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического и/или профилактического результата.

**[0089]** Термины «фармацевтический препарат» и «фармацевтическая композиция» относятся к препарату, находящемуся в такой форме, которая обеспечивает биологическую активность активного ингредиента (ингредиентов), и не содержащему дополнительные компоненты, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет введен препарат. Такие препараты могут быть стерильными.

**[0090]** Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему материалу, вспомогательному веществу препарата или носителю, общепринятому в данной области для применения с терапевтическим средством, вместе с которым они составляют «фармацевтическую композицию» для введения субъекту. Фармацевтически приемлемый носитель нетоксичен для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и совместим с другими ингредиентами препарата. Фармацевтически приемлемый носитель подходит для используемого препарата.

**[0091]** Введение «в сочетании с» одним или более другими терапевтическими средствами включает одновременное (параллельное) и последовательное введение в любом порядке.

**[0092]** В настоящем документе термин «одновременно» используют для обозначения введения двух или более терапевтических средств, когда введения, по меньшей мере частично, перекрываются во времени, или когда введение одного терапевтического средства происходит в течение короткого периода времени после введения другого терапевтического средства, или когда терапевтические эффекты обоих средств перекрываются в течение по меньшей мере периода времени.

**[0093]** В настоящем документе термин «последовательно» используют для обозначения введения двух или более терапевтических средств, когда введения не перекрываются во времени, или когда терапевтические эффекты средств не перекрываются.

**[0094]** Используемый в настоящем документе термин «в сочетании с» относится к применению одного терапевтического воздействия в дополнение к другому терапевтическому воздействию. Таким образом, «в сочетании с» означает применение одного терапевтического воздействия до, во время или после применения другого терапевтического воздействия для субъекта.

**[0095]** Термин «вкладыш в упаковку» используют для обозначения инструкций, обычно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических препаратов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях, и/или предупреждений относительно использования таких терапевтических препаратов.

[0096] «Изделие» представляет собой любое изделие (например, упаковку или контейнер) или набор, содержащий по меньшей мере один реагент, например, лекарственное средство для лечения заболевания или нарушения (например, рака), или зонд для специфического обнаружения биомаркера, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления производство или набор рекламируют, распространяют или продают как единое целое для применения способов, описанных в настоящем документе.

[0097] Термины «метка» и «детектируемая метка» означают фрагмент, присоединенный, например, к антителу или антигену, чтобы реакция (например, связывания) между членами пары специфического связывания могла быть обнаружена. Меченый член пары специфического связывания называют «детектируемо меченым». Таким образом, термин «меченый связывающий белок» относится к белку с включенной меткой, которая обеспечивает идентификацию связывающего белка. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой детектируемый маркер, который может генерировать сигнал, поддающийся обнаружению с помощью визуальных или инструментальных средств, примером является включение меченой радиоактивной меткой аминокислоты или присоединение к полипептиду фрагментов биотина, которые могут быть обнаружены с помощью меченого авидина (примером является стрептавидин, имеющий флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которую можно обнаружить оптическими или колориметрическими методами). Примеры меток для полипептидов включают, но не ограничиваются ими, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$  или  $^{153}\text{Sm}$ ); хромогены, флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, люминофоры на основе комплексов лантанидов), ферментативные метки (например, пероксидазу хрена, люциферазу, щелочную фосфатазу); хемилюминесцентные маркеры; биотинильные группы; заранее определенные полипептидные эпитопы, узнаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновых застежек, сайты связывания вторичных антител, домены связывания металлов, метки эпитопов); а также магнитные средства, такие как хелаты гадолия. Репрезентативные примеры меток, обычно используемых для иммунологических анализов, включают фрагменты, которые продуцируют свет, например, соединения акридиния, и фрагменты, которые продуцируют флуоресценцию, например, флуоресцеин. В этом отношении сам фрагмент может не быть помечен детектируемым образом, но может становиться детектируемым при реакции с еще одним фрагментом.

#### **Иллюстративные PD-1-связывающие полипептиды**

[0098] В настоящем документе предложены антагонистические связывающие собачий PD-1 полипептиды. В различных вариантах осуществления антагонистические PD-1-связывающие полипептиды содержат по меньшей мере один домен VHH, связывающий собачий PD-1. В некоторых вариантах осуществления антагонистический PD-1-связывающий полипептид, предложенный в настоящем документе, содержит один, два, три, четыре, пять или шесть доменов VHH, которые связывают собачий PD-1. В некоторых

вариантах осуществления антагонистический связывающий собачий PD-1 полипептид, предложенный в настоящем документе, содержит один, два, три или четыре домена VHH, которые связывают собачий PD-1. Такие связывающие собачий PD-1 полипептиды могут содержать один или более дополнительных доменов VHH, которые связывают один или более белков-мишеней, отличных от собачьего PD-1.

**[0099]** В некоторых вариантах осуществления антагонистический связывающий собачий PD-1 полипептид содержит (i) по меньшей мере один домен VHH, связывающий собачий PD-1, и (ii) Fc-область. В некоторых вариантах осуществления антагонистический связывающий собачий PD-1 полипептид, предложенный в настоящем документе, содержит (i) один, два, три или четыре домена VHH, которые связывают собачий PD-1, и (ii) Fc-область. В некоторых вариантах осуществления Fc-область опосредует димеризацию связывающего собачий PD-1 полипептида в физиологических условиях, так, что образуется димер, в котором удвоено число сайтов, связывающих собачий PD-1. Например, связывающий собачий PD-1 полипептид, содержащий Fc-область и три домена VHH, которые связывают собачий PD-1, является трехвалентным мономером, однако в физиологических условиях Fc-область может опосредовать димеризацию, в результате чего в таких условиях связывающий собачий PD-1 полипептид существует в виде шестивалентного димера.

**[0100]** В различных вариантах осуществления домен VHH, связывающий собачий PD-1, содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления домен VHH является канинизированным.

**[0101]** В некоторых вариантах осуществления домен VHH, связывающий собачий PD-1, может быть канинизированным. Канинизированные антитела (такие как VHH-содержащие полипептиды) полезны в качестве терапевтических молекул, поскольку канинизированные антитела уменьшают или устраняют иммунный ответ у собак на не собачьи антитела, что может приводить к иммунному ответу на терапевтическое антитело и снижать эффективность терапевтического средства. Как правило, канинизированное антитело содержит один или более переменных доменов, в которых области CDR (или их части) происходят из последовательностей не собачьего антитела, и области FR (или их части) происходят из последовательностей собачьего антитела. Канинизированное антитело, необязательно, также будет содержать по меньшей мере часть собачьей константной области. В некоторых вариантах осуществления некоторые остатки FR в канинизированном антителе заменены соответствующими остатками из не собачьего антитела (например, антитела, из которого получены остатки CDR), например, с целью восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

**[0102]** Собачьи каркасные области, которые можно использовать для канинизации, включают, но не ограничиваются ими: каркасные области, выбранные с использованием метода «наилучшего соответствия» (смотри, например, Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.*

151:2296); каркасные области, происходящие из консенсусной последовательности собачьих антител с конкретной подгруппой переменных областей тяжелой цепи (смотри, например, Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; и Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151:2623); созревшие (соматически мутированные) собачьи каркасные области или собачьи каркасные области зародышевой линии (смотри, например, Almagro and Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633); а также каркасные области, полученные в результате скрининга библиотек FR (смотри, например, Vaca *et al.*, (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684 и Rosok *et al.*, (1996) *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618). Как правило, области FR в VHH заменяют собачьими областями FR для получения канинизированного VHH. В некоторых вариантах осуществления некоторые остатки FR собачьей FR заменяют с целью улучшения одного или более свойств канинизированного VHH. Домены VHH с такими замененными остатками в настоящем документе все-еще называют «канинизированными».

**[0103]** В некоторых вариантах осуществления домен VHH, связывающий собачий PD-1, содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

**[0104]** В некоторых вариантах осуществления связывающий собачий PD-1 полипептид содержит по меньшей мере один домен VHH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 или 13. В некоторых вариантах осуществления PD-1-связывающий полипептид содержит один, два, три или четыре домена VHH, содержащих независимо выбранную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 или 13.

**[0105]** В некоторых вариантах осуществления связывающий собачий PD-1 полипептид содержит два или три домена VHH, которые связывают собачий PD-1; и Fc-область. В некоторых таких вариантах осуществления каждый домен VHH содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления каждый домен VHH независимо содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 или 13.

**[0106]** В различных вариантах осуществления Fc-область, включенная в связывающий собачий PD-1 полипептид, представляет собой собачью Fc-область или получена из собачьей Fc-области.

**[0107]** В некоторых вариантах осуществления Fc-область, включенная в связывающий собачий PD-1 полипептид, происходит из собачьей Fc-области и имеет три аминокислотные делеции в нижней части шарнира, соответствующие E233, M234 и L235 IgGB по системе нумерации Kabat, в настоящем документе ее называют «xEML». В некоторых вариантах осуществления Fc-область, включенная в связывающий собачий PD-1 полипептид, происходит из собачьей Fc-области и имеет две замены, D265A и N297A, по системе нумерации Kabat, в настоящем документе ее называют «DANA». В некоторых

вариантах осуществления Fc-область, включенная в связывающий собачий PD-1 полипептид, происходит из собачьей Fc-области и имеет как делецию трех аминокислот хEML, так и замены DANA, в настоящем документе ее называют «хEML-DANA». Полипептиды хEML-DANA Fc-области не связывают Fc $\gamma$ R и, вследствие этого, их называют полипептидами «с молчащей эффекторной функцией» или «с нулевой эффекторной функцией», однако в некоторых вариантах осуществления хEML-DANA Fc-области связывают FcRn и, вследствие этого, такие варианты осуществления имеют транцитоз, связанный с рециркуляцией, опосредованной FcRn, и увеличенный период полувыведения в сравнении с полипептидами, не содержащими Fc-область, которая связывает FcRn.

**[0108]** Неограничивающие примеры Fc-областей, которые могут быть использованы в связывающем собачий PD-1 полипептиде, включают Fc-области, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 19 и 20.

**[0109]** В некоторых вариантах осуществления связывающий собачий PD-1 полипептид содержит один домен VHH и Fc-область, где домен VHH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 или 13, и Fc-область слита с C-концом домена VHH. В некоторых вариантах осуществления связывающий собачий PD-1 полипептид, который содержит один домен VHH и Fc-область, содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17 или 18.

#### **Иллюстративные активности PD-1-связывающих полипептидов**

**[0110]** В различных вариантах осуществления связывающие собачий PD-1 полипептиды, предложенные в настоящем документе, являются антагонистами активности собачьего PD-1. В некоторых вариантах осуществления антагонистическую активность можно определять с использованием способов, описанных в разделе «Примеры» настоящего документа, например, с использованием клеток 293, 293FS или CHO, экспрессирующих собачий PD-1.

**[0111]** В некоторых вариантах осуществления связывающие собачий PD-1 полипептиды, предложенные в настоящем документе, уменьшают и/или блокируют связывание собачьего PD-L1 с собачьим PD-1 *in vitro* и/или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления связывающий собачий PD-1 полипептид, предложенный в настоящем документе, уменьшает связывание собачьего PD-L1 с собачьим PD-1 *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления PD-1-связывающий полипептид уменьшает связывание собачьего PD-L1 с собачьим PD-1 на по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80% или по меньшей мере 90%. Уменьшение связывания собачьего PD-L1 с собачьим PD-1 можно определять любым способом, известным в данной области, таким как, например, способы, описанные в разделе «Примеры» настоящего документа. Неограничивающий иллюстративный анализ, описанный в настоящем документе, включает инкубацию связывающего собачий PD-1 полипептида в течение 1 часа при комнатной температуре в буфере PBS с 3-4 нМ слитого белка собачьего PD-L1-hFc (Sino Biological) и не трансфицированными клетками 293FS или трансфицированными клетками 293FS, экспрессирующими полноразмерный собачий PD-1

(SEQ ID NO: 1). Флуоресцентное анти-Fc специфическое вторичное антитело используют для обнаружения связывающего собачий PD-1 полипептида, связанного с PD-1, методом проточной цитометрии на анализаторе Intellicyte iQue. Строят график средней интенсивности флуоресценции для каждой протестированной концентрации связывающего собачий PD-1 полипептида.

### **Экспрессия и продуцирование полипептида**

[0112] Предложены молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие полинуклеотиды, которые кодируют связывающий собачий PD-1 полипептид. Так, в различных вариантах осуществления предложены молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют домен VHH, связывающий собачий PD-1 и содержащий CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления предложены молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют связывающий собачий PD-1 полипептид, содержащий по меньшей мере один, например один, два, три или четыре домена VHH. В различных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты дополнительно кодирует Fc-область, такую как Fc-область с SEQ ID NO: 19 или 20. В некоторых вариантах осуществления предложена молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует связывающий собачий PD-1 полипептид, содержащий по меньшей мере один домен VHH и Fc-область, где домен VHH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 10, 11, 12 или 13, и Fc-область слита с С-концом домена VHH. В некоторых вариантах осуществления предложена молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует связывающий собачий PD-1 полипептид, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17 или 18. В любом из вышеуказанных вариантов осуществления молекула нуклеиновой кислоты также может кодировать лидерную последовательность, которая управляет секрецией связывающего собачий PD-1 полипептида, при этом лидерная последовательность, как правило, отщепляется, так что она отсутствует в секретированном полипептиде. Лидерная последовательность может представлять собой естественную лидерную последовательность тяжелой цепи (или VHH) или может представлять собой другую гетерологичную лидерную последовательность.

[0113] Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть сконструированы с использованием технологий рекомбинантных ДНК, общепринятых в данной области. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты представляет собой экспрессионный вектор, подходящий для экспрессии в выбранной клетке-хозяине.

[0114] Предложены векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, которые кодируют связывающие собачий PD-1 полипептиды, описанные в настоящем документе. Такие векторы включают, но без ограничения, ДНК-содержащие векторы, фаговые векторы, вирусные векторы, ретровирусные векторы и так далее. В некоторых вариантах осуществления выбран вектор, который оптимизирован для экспрессии полипептидов в клетках желаемого типа, например, клетках 293, 293FS или CHO, или полученных из CHO

клетках, или в клетках NSO. Примеры таких векторов приведены, например, в Running Deer *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 20:880-889 (2004).

**[0115]** В некоторых вариантах осуществления связывающий собачий PD-1 полипептид можно экспрессировать в прокариотических клетках, таких как бактериальные клетки; или в эукариотических клетках, таких как грибковые клетки (например, дрожжи), растительные клетки, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Такую экспрессию можно осуществлять, например, способами, известными в данной области. Примеры эукариотических клеток, которые можно использовать для экспрессии полипептидов, включают, но без ограничения, клетки COS, включая клетки COS 7; клетки 293, включая клетки 293FS и 293-6E; клетки CHO, включая клетки CHO-S, DG44, клетки Lec13 CHO и клетки FUT8 CHO, клетки PER.C6<sup>®</sup> (Crucell) и клетки NSO. В некоторых вариантах осуществления PD-1-связывающие полипептиды можно экспрессировать в дрожжах. Смотри, например, патентную публикацию США № US 2006/0270045 A1. В некоторых вариантах осуществления конкретную эукариотическую клетку-хозяина выбирают на основании ее способности осуществлять нужные посттрансляционные модификации полипептида. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки CHO продуцируют полипептиды, имеющие более высокий уровень сialiрования, чем те же полипептиды, продуцируемые в клетках 293.

**[0116]** Введение одной или более нуклеиновых кислот (таких как векторы) в нужную клетку-хозяина можно выполнять любым способом, включая, но без ограничения, трансфекцию с фосфатом кальция, опосредуемую DEAE-декстраном трансфекцию, опосредуемую катионными липидами трансфекцию, электропорацию, трансдукцию, инфекцию и так далее. Неограничивающие примеры способов приведены, например, в Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3-е издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Нуклеиновые кислоты могут быть временно или стабильно трансфицированы в нужные клетки-хозяева любым подходящим способом.

**[0117]** Также предложены клетки-хозяева, содержащие любые из нуклеиновых кислот или векторов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления предложена клетка-хозяин, которая экспрессирует связывающий собачий PD-1 полипептид, описанный в настоящем документе. Связывающие собачий PD-1 полипептиды, экспрессируемые в клетках-хозяевах, можно очищать любым подходящим способом. Такие способы включают, но без ограничения, использование аффинных матриц или хроматографии гидрофобного взаимодействия. Подходящие аффинные лиганды включают ROR1 ECD и средства, которые связывают Fc-области. Например, можно использовать аффинную колонку с белком А, белком G, белком А/G или антителом для связывания Fc-области и для очистки PD-1-связывающего полипептида, который содержит Fc-область. Хроматография аффинного взаимодействия, например, с бутильной или фенильной колонкой, может быть подходящей для очистки некоторых полипептидов, таких как антитела. Ионообменная хроматография (например, анионообменная хроматография и/или катионообменная хроматография) также может быть подходящей для очистки

некоторых полипептидов, таких как антитела. Смешанная хроматография (например, обращенно-фазовая/анионообменная, обращенно-фазовая/катионообменная, гидрофильного взаимодействия/анионообменная, гидрофильного взаимодействия/катионообменная и так далее) также может быть подходящей для очистки некоторых полипептидов, таких как антитела. В данной области известно множество способов очистки полипептидов.

[0118] В некоторых вариантах осуществления связывающий собачий PD-1 полипептид продуцируется в бесклеточной системе. Неограничивающие примеры бесклеточных систем приведены, например, в Sitaraman *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004); Endo *et al.*, *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003).

[0119] В некоторых вариантах осуществления предложены связывающие собачий PD-1 полипептиды, полученные способами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления связывающий собачий PD-1 полипептид получен в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления связывающий собачий PD-1 полипептид получен в бесклеточной системе. В некоторых вариантах осуществления связывающий собачий PD-1 полипептид является очищенным. В некоторых вариантах осуществления предложена среда для культивирования клеток, содержащая связывающий собачий PD-1 полипептид.

[0120] В некоторых вариантах осуществления предложены композиции, содержащие антитела, полученные способами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит связывающий собачий PD-1 полипептид, полученный в клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит связывающий собачий PD-1 полипептид, полученный в бесклеточной системе. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит очищенный связывающий собачий PD-1 полипептид.

#### **Иллюстративные способы лечения заболеваний с использованием PD-1-связывающих полипептидов**

[0121] В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения заболевания у субъекта, включающие введение связывающего собачий PD-1 полипептида. Такие заболевания включают любое заболевание, которое может быть ослаблено в результате снижения активности PD-1 в Т-клетках и/или повышения активности Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения рака у субъекта. Способ включает введение субъекту эффективного количества полипептида, связывающего собачий PD-1, предложенного в настоящем документе. Такие способы лечения можно применять к млекопитающим, включая собак. Неограничивающие примеры рака, который можно лечить связывающими собачий PD-1 полипептидами, предложенными в настоящем документе, включают лимфому, гемангиосаркому, тучноклеточную карциному, меланому, остеосаркому, рак молочной железы, почечно-клеточную карциному и немелкоклеточный рак легкого, лимфому высокой степени злокачественности, гистиоцитарную саркому, злокачественный гистиоцитоз,

уротелиальную карциному, плоскоклеточный рак полости рта; базально-клеточную карциному; рак желчевыводящих путей; рак мочевого пузыря; рак кости; рак головного мозга и центральной нервной системы; рак молочной железы; рак брюшины; рак шейки матки; хориокарциному; рак толстой и прямой кишки; рак соединительной ткани; рак пищеварительной системы; рак эндометрия; рак пищевода; рак глаза; рак головы и шеи; рак желудка; глиобластому; карциному печени; гепатому; интраэпителиальное новообразование; рак почки или почечно-клеточный рак; рак гортани; лейкемию; рак печени; рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточный рак легкого; миелому; нейробластому; рак полости рта; рак яичников; рак поджелудочной железы; рак предстательной железы; ретинобластому; рабдомиосаркому; рак прямой кишки; рак дыхательной системы; рак слюнной железы; саркому; рак кожи; плоскоклеточный рак; рак желудка; рак яичек; рак щитовидной железы; рак матки или эндометрия; рак мочевыделительной системы и рак вульвы; лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, В-клеточную лимфому, низкоклеточную/фолликулярную неходжкинскую лимфому (НХЛ); мелколимфоцитарную (МЛ) НХЛ; средней степени злокачественности/фолликулярную НХЛ; диффузную НХЛ средней степени злокачественности; иммунобластную НХЛ высокой степени злокачественности; лимфобластную НХЛ высокой степени злокачественности; мелкоклеточную НХЛ с нерасщепленными ядрами высокой степени злокачественности; генерализованную НХЛ; лимфому из клеток мантийной зоны; лимфому, связанную со СПИДом; макроглобулинемию Вальденстрема; хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ); острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ); волосатоклеточный лейкоз и хронический миелобластный лейкоз.

**[0122]** Связывающие собачий PD-1 полипептиды можно вводить субъектам по мере необходимости. Определять частоту введения может специалист в данной области, такой как лечащий ветеринар, на основании состояния, подлежащего лечению, возраста субъекта, которого лечат, тяжести состояния, подвергаемого лечению, общего состояния здоровья субъекта, которого лечат, и тому подобного. В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу связывающего собачий PD-1 полипептида вводят субъекту один или более раз. В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу связывающего собачий PD-1 полипептида вводят субъекту ежедневно, два раза в неделю, еженедельно, каждые две недели, один раз в месяц и так далее. Эффективную дозу связывающего собачий PD-1 полипептида вводят субъекту по меньшей мере один раз. В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу полипептидов, связывающих собачий PD-1, можно вводить несколько раз, в том числе несколько раз в течение срока менее месяца, по меньшей мере шести месяцев или по меньшей мере года.

**[0123]** В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции вводят в количестве, эффективном для лечения (включая профилактику) рака. Терапевтически эффективное количество, как правило, зависит от массы тела субъекта, получающего лечение, его или ее физического состояния или состояния здоровья, тяжести

состояния, подлежащего лечению, или возраста субъекта, получающего лечение. Как правило, антитела можно вводить в диапазоне количеств от примерно 0,05 мг/кг массы тела до примерно 100 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в диапазоне количеств от примерно 10 мкг/кг массы тела до примерно 100 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в диапазоне количеств от примерно 50 мкг/кг массы тела до примерно 5 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в диапазоне количеств от примерно 100 мкг/кг массы тела до примерно 10 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в диапазоне количеств от примерно 100 мкг/кг массы тела до примерно 20 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в диапазоне количеств от примерно 0,5 мг/кг массы тела до примерно 20 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в диапазоне количеств от примерно 0,5 мг/кг массы тела до примерно 10 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в диапазоне количеств от примерно 0,05 мг/кг массы тела до примерно 20 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в диапазоне количеств от примерно 0,05 мг/кг массы тела до примерно 10 мг/кг массы тела на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитела можно вводить в диапазоне количеств от примерно 5 мг/кг массы тела или ниже, например, менее 4, менее 3, менее 2 или менее 1 мг/кг антитела.

[0124] В некоторых вариантах осуществления связывающие собачий PD-1 полипептиды можно вводить *in vivo* различными путями введения, включая, но без ограничения, внутривенный, внутриаартериальный, парентеральный, внутрибрюшинный или подкожный. Соответствующий препарат и путь введения могут быть выбраны в соответствии с предполагаемым применением.

[0125] В некоторых вариантах осуществления терапевтическое воздействие с использованием связывающего собачий PD-1 полипептида достигается за счет увеличения пролиферации и/или активации Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления увеличение пролиферации и/или активации Т-клеток приводит к ингибированию роста раковой опухоли.

#### **Фармацевтические композиции**

[0126] В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие связывающие собачий PD-1 полипептиды, предоставляют в препаратах с широким спектром фармацевтически приемлемых носителей (смотри, например, Gennago, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20-е издание (2003); Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7-е издание, Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3-е издание, Pharmaceutical Press (2000)). Доступны различные фармацевтически приемлемые носители, которые включают среды, адъюванты и разбавители. Кроме того, также доступны различные фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества,

такие как регуляторы рН и буферные средства, регулирующие тоничность средства, стабилизаторы, увлажняющие средства и тому подобное. Неограничивающие примеры носителей включают солевой раствор, буферизованный солевой раствор, декстрозу, воду, глицерин, этанол, а также их сочетания.

[0127] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит связывающий собачий PD-1 полипептид в концентрации по меньшей мере 10 мг/мл, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл, 100 мг/мл, 125 мг/мл, 150 мг/мл, 175 мг/мл, 200 мг/мл, 225 мг/мл или 250 мг/мл.

#### **Комбинированная терапия**

[0128] Связывающие собачий PD-1 полипептиды можно вводить отдельно или в сочетании с другими терапевтическими препаратами, такими как другие противораковые средства. Их можно вводить до, практически одновременно с, или после других терапевтических препаратов (то есть, одновременно или последовательно). В некоторых вариантах осуществления способ лечения, описанный в настоящем документе, может также включать применение: радиотерапии, химиотерапии, вакцинации, таргетированной терапии опухоли, CAR-T-клеточной терапии, терапии онколитическими вирусами, противораковой иммунотерапии, терапии цитокинами, хирургической резекции, модификации хроматина, абляции, криотерапии, антисмыслового средства против опухоли-мишени, кРНК против опухоли-мишени, микроРНК против опухоли-мишени, либо противоракового/противоопухолевого средства или биологического средства, такого как антитело, цитокина или слитого белка внеклеточного домена рецептора и Fc-области.

#### **Неограничивающие примеры способов диагностики и лечения**

[0129] В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, полезны для оценки субъекта и/или образца от субъекта (например, субъекта, имеющего рак). В некоторых вариантах осуществления оценка представляет собой одно или более из диагноза, прогноза и/или определения ответа на лечение.

[0130] В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают оценку наличия, отсутствия или уровня белка. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают оценку присутствия, отсутствия или уровня экспрессии нуклеиновой кислоты. Для этих измерений можно использовать композиции, описанные в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают создание контакта образца опухоли или культивируемых опухолевых клеток с терапевтическим средством, описанным в настоящем документе.

[0131] В некоторых вариантах осуществления оценка может направлять лечение (включая лечение антителами, описанными в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления оценка может направлять применение или прекращение адъювантной терапии после резекции. Адъювантная терапия, также называемая адъювантным лечением, представляет собой лечение, которое проводят в дополнение к первичному, основному или начальному лечению. В качестве неограничивающего

примера, адъювантная терапия может представлять собой дополнительное лечение, обычно назначаемое после хирургического вмешательства, когда весь обнаруживаемый очаг поражения был удален, но остается статистически значимый риск рецидива из-за скрытого заболевания. В некоторых вариантах осуществления антитела применяют в качестве адъювантной терапии при лечении рака. В некоторых вариантах осуществления антитела применяют в качестве единственной адъювантной терапии при лечении рака. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, не применяют в качестве адъювантной терапии при лечении рака. Например, если субъект, скорее всего, не будет отвечать на антитело, описанное в настоящем документе, или будет иметь минимальный ответ, лечение может не быть назначено в интересах качества жизни и во избежание ненужной токсичности от неэффективной химиотерапии. В таких случаях может быть использовано паллиативное лечение.

[0132] В некоторых вариантах осуществления молекулы вводят в качестве неоадъювантной терапии перед резекцией. В некоторых вариантах осуществления «неоадъювантная терапия» означает терапию, направленную на сокращение и/или уменьшение размера опухоли до любой хирургической операции. В некоторых вариантах осуществления «неоадъювантная терапия» означает химиотерапию, проводимую субъектам, страдающим от рака, до хирургического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления «неоадъювантная терапия» означает, что антитело вводят субъектам, страдающим от рака, до хирургического вмешательства. Типы рака, для лечения которых обычно рассматривают неоадъювантную химиотерапию, включают, например, рак молочной железы, колоректальный рак, рак яичников, шейки матки, мочевого пузыря и легких. В некоторых вариантах осуществления антитела применяют в качестве неоадъювантной терапии при лечении рака. В некоторых вариантах осуществления их применяют перед резекцией.

[0133] В некоторых вариантах осуществления микроокружение опухоли, рассматриваемое в способах, описанных в настоящем документе, представляет собой одно или более из: сосудистой сети опухоли; опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов; ретикулярных клеток фибробластов; эндотелиальных клеток-предшественников (ЭКП); ассоциированных с раком фибробластов; перицитов; других стромальных клеток; компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ); дендритных клеток; антигенпредставляющих клеток; Т-клеток; регуляторных Т-клеток; макрофагов; нейтрофилов и других иммунных клеток, расположенных вблизи опухоли.

### **Наборы**

[0134] Также предложены изделия и наборы, которые включают любой из связывающих собачий PD-1 полипептидов, описанных в настоящем документе, и подходящую упаковку. В некоторых вариантах осуществления изобретение включает набор с (i) связывающим собачий PD-1 полипептидом и (ii) инструкциями по применению набора для введения полипептида, связывающего собачий PD-1, субъекту.

[0135] Подходящая упаковка для композиций, описанных в настоящем документе,

известна в данной области и включает, например, флаконы (например, запечатанные флаконы), сосуды, ампулы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, запечатанные майларовые или пластиковые пакеты) и тому подобное. Эти изделия могут быть дополнительно стерилизованы и/или запечатаны. Также предоставляют стандартные лекарственные формы, содержащие композиции, описанные в настоящем документе. Эти стандартные лекарственные формы можно хранить в подходящей упаковке в виде единичных или многократных стандартных доз, а также можно дополнительно стерилизовать и запечатывать. Инструкции, предоставляемые в наборах по изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или вкладыше в упаковку (например, листе бумаги, включенном в набор), но машиночитаемые инструкции (например, инструкции на магнитном или оптическом диске) также являются приемлемыми. Инструкции, относящиеся к применению антител, как правило, включают информацию о дозировке, графике дозирования и пути введения для предполагаемого лечения или промышленного применения. Набор может дополнительно включать описание выбора подходящего субъекта или лечения.

**[0136]** Контейнеры могут представлять собой стандартные дозы, объемные упаковки (например, многодозовые упаковки) или частичные стандартные дозы. Например, также могут быть предоставлены наборы, которые содержат дозы молекул, раскрытых в настоящем документе, достаточные для обеспечения эффективного лечения субъекта в течение длительного периода времени, например, примерно в течение недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 6 недель, 8 недель, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев или более. Наборы могут также включать несколько стандартных доз молекул и инструкции по применению, и быть расфасованы в количествах, достаточных для хранения и использования в аптеках, например, в больничных аптеках и рецептурно-производственных отделах аптек. В некоторых вариантах осуществления набор включает сухую (например, лиофилизированную) композицию, которую можно восстанавливать, ресуспендировать или повторно гидратировать, с получением, как правило, стабильной водной суспензии антитела.

#### ПРИМЕРЫ

**[0137]** Рассмотренные ниже примеры предназначены исключительно для иллюстрации изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие изобретение каким-либо образом. Примеры не должны указывать на то, что приведенные ниже эксперименты являются всеми или единственными проведенными экспериментами. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых чисел (например, количеств, температуры и так далее), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если нет иных указаний, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура выражена в градусах Цельсия, а давление равно атмосферному или примерно атмосферному давлению.

#### **Пример 1: Связывание однодоменных антител с собачьим PD-1**

[0138] Были разработаны однодоменные антитела (одАт), содержащие домены VHH, которые связывают собачий PD-1, в том числе одАт, содержащие домены VHH, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 2-5. Были созданы пять канинизированных вариантов домена VHH PD1-14, имеющих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9-13, соответственно. Приведенные в Таблице 2 одАт, содержащие домен VHH PD1-5, PD1-8, PD1-13 или PD1-14, или канинизированный вариант домена VHH PD1-14, и Fc-область собачьего IgGB, содержащую мутации xEML-DANA (SEQ ID NO: 20), тестировали на связывание с собачьим PD-1.

[0139] Связывание одАт с собачьим PD-1 определяли следующим образом. Временно трансфицированные клетки 293FS, которые экспрессируют полноразмерный собачий PD-1, и не трансфицированные клетки 293FS высевали по 50000 клеток/лунку в отдельные лунки. Антитела титровали в серийном разведении 1:3, начиная с 400 нМ, и проводили обнаружение при помощи вторичных антител против собачьей Fc 647. Проточно-цитометрический анализ выполняли на анализаторе Intellicyte iQue, и строили график средней интенсивности флуоресценции. Как показано на ФИГ. 1А и 1В, семь протестированных антител специфически связывались с собачьим PD-1. Показатели аффинности ( $K_D$ ) одАт для собачьего PD-1 приведены в Таблице 2, ниже.

**Таблица 2**

одАт	Аффинность (нМ)	SEQ ID NO:
czPD1-14v1-Fc xEML-DANA	4,151	14
czPD1-14v2-Fc xEML-DANA	6,647	15
czPD1-14v3-Fc xEML-DANA	3,243	16
PD1-14-Fc xEML-DANA	8,82	21
PD1-5-Fc xEML-DANA	<10 нМ	VHH: 5; Fc-область: 20
PD1-8-Fc xEML-DANA	<10 нМ	VHH: 2; Fc-область: 20
PD1-13-Fc xEML-DANA	<10 нМ	31

**Пример 2: Однодоменные антитела, которые связывают собачий PD-1, блокируют связывание собачьего PD-1 с PD-L1**

[0140] Связывание собачьего PD-1 с PD-L1 в присутствии одАт, описанного в примере 1, определяли следующим образом. Каждое одАт инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в буфере PBS с 3 или 4 нМ слитого белка собачьего PD-L1-hFc (Sino Biological) и не трансфицированными клетками 293FS или трансфицированными клетками 293FS, экспрессирующими полноразмерный собачий PD-1 (SEQ ID NO: 1). Флуоресцентное специфическое вторичное антитело против Fc-области использовали для обнаружения одАт, связанного с PD-1, методом проточной цитометрии с использованием анализатора Intellicyte iQue. Строили график средней интенсивности флуоресценции для каждой тестируемой концентрации одАт.

[0141] Как показано на ФИГ. 2А и 2В, за исключением PD1-8, все протестированные

антитела блокировали связывание собачьего PD-1 с 3 или 4 нМ PD-L1-hFc зависимым от дозы образом с сопоставимой активностью.

**Пример 3: Связывание однодоменных антител с компонентами собачьего Fc-рецептора**

[0142] Тестировали связывание компонентов CD16, CD32 и CD64 собачьего Fc-рецептора с одАт, содержащим хEML-DANA Fc-область. Протестированные одАт приведены в Таблице 3. В качестве положительного контроля использовали собачье одАт CD19, содержащее Fc-область собачьего IgGB дикого типа (SEQ ID NO: 19).

[0143] Связывание одАт с компонентами собачьего Fc-рецептора определяли следующим образом. Временно трансфицированные клетки 293FS, экспрессирующие полноразмерные собачьи CD16, CD32, CD64, высевали по 50000 клеток/лунку в отдельные лунки. Серийно разбавляли одАт 1:3, начиная с 250 нМ, и проводили обнаружение вторичным антителом против собачьей Fc 647. Флуоресцентное специфическое вторичное антитело против Fc-области использовали для обнаружения связанного одАт методом проточной цитометрии с использованием анализатора Intellicyte iQue. Строили график средней интенсивности флуоресценции для каждой тестируемой концентрации антитела.

**Таблица 3**

одАт	SEQ ID NO:
cCD19-4A8-Fc	Fc-область: SEQ ID NO: 19
PD1-14-Fc хEML-DANA	21
PD1-13-Fc хEML-DANA	31

[0144] Как показано на ФИГ. 3А-С, одАт, имеющие мутации хEML-DANA в Fc-области, демонстрировали значительно сниженное связывание с компонентами CD16 (ФИГ. 3А) и CD64 (ФИГ. 3С) Fc-рецептора в сравнении с антителом, содержащим Fc-область дикого типа. Более того, одАт, имеющие мутации хEML-DANA в Fc-области, не проявляли никакого связывания с компонентом CD32 Fc-рецептора (ФИГ. 3В).

**Пример 4: Активация Т-клеток одАт, которые связывают собачий PD-1**

[0145] Тестировали активацию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток за счет одАт, содержащего домен VHH, который связывает собачий PD-1, и Fc-область, имеющую мутации хEML и DANA (SEQ ID NO: 20). Протестированные одАт приведены в Таблице 4. 0,25×10<sup>6</sup> МКПК собаки (предварительно замороженных, свежеразмороженных) высевали на лунку в 96-луночный планшет с U-образным дном. Клетки инкубировали с одАт в буфере FACS (100 нМ, 1:5) в течение 30 минут при 4°C. Затем клетки один раз промывали и инкубировали в смеси для окрашивания поверхности, содержащей антитело против собачьего CD3-FITC (клон CA17.2A12 1:50), антитело против собачьего CD8-A700 (клон: YCATE55.9 1:50) и антитело против собачьего CD4-PE/Cy7 (клон YKIX302.9 1:50), а также PI (1:2000) и антитело против собачьего A647 (1:500), в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем клетки в последний раз промывали и анализировали на анализаторе Sony SA3800. Строили график средней интенсивности флуоресценции с поправкой на фон для каждой

тестируемой концентрации антитела и использовали для расчета значений  $EC_{50}$ , приведенных в Таблице 4, ниже.

**Таблица 4**

одАт	$EC_{50}$ (нМ)		SEQ ID NO:
	CD4 Т-клетки	CD8 Т-клетки	
PD1-14-Fc xEML-DANA	1,703	0,764	21
czPD1-14v2-Fc xEML-DANA	9,148	27,25	15

[0146] Как показано в Таблице 4 и на ФИГ. 4А-В, протестированные одАт активировали CD4 (ФИГ. 4А) и CD8 (ФИГ. 4В) Т-клетки зависимым от дозы образом.

**Пример 5: Фармакокинетика одАт, связывающего собачий PD-1**

[0147] Фармакокинетику одАт, содержащего домен VHH, который связывает собачий PD-1 (SEQ ID NO: 3), и Fc-область, содержащую мутации xEML и DANA (Fc-домен: SEQ ID NO: 20; одАт: SEQ ID NO: 21), тестировали на самцах биглей в возрасте 9 месяцев или старше с массой тела 9,4-11,9 кг. Собак не кормили, затем вводили антитело (группы 2, 3 и 4) или контрольный растворитель (группа 1) путем внутривенной инфузии дважды каждой собаке, с интервалом в три недели между инфузиями, в дозе 0,5 мг/кг/доза (группа 2), 1,5 мг/кг/доза (группа 3) или 4,5 мг/кг/доза (группа 4) с объемом дозы 1 мл/кг, как показано в Таблице 5. Образцы плазмы брали из головной вены через 2, 8, 24, 48, 96, 144, 312 и 480 часов после инфузии, и клинические наблюдения проводили через 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 и 48 часов после введения дозы, а затем по меньшей мере два раза в день.

[0148] Для ФК анализа образцы плазмы хранили при  $-40^{\circ}C$  до анализа методом ELISA. Набор для ELISA представлял собой модифицированный вариант набора для конкурентного анализа ELISA от компании Acro Biosystems для анти-PD-1 h-mАт в сыворотке мыши (каталожный номер: EPM-V1). В модифицированный вариант были внесены следующие изменения: 1) рекомендованная для набора нормальная мышьяная сыворотка была заменена пулом нормальной собачьей плазмы, 2) поставляемый с набором PD-1 человека был заменен альтернативным рекомбинантным PD-1 человека, и 3) входящий в набор реагент стрептавидин-пероксидаза хрена (HRP) был заменен коммерческим реагентом стрептавидин-HRP. Предварительные эксперименты показали, что модифицированный набор подходит для измерения собачьих анти-PD-1 мАт в собачьей плазме. Вкратце, собачью плазму от тестируемых субъектов смешивали и инкубировали в соответствии с инструкциями по анализу с поставляемым в наборе биотинилированным анти-PD-1 антителом перед добавлением в планшеты для ELISA, предварительно покрытые рекомбинантным человеческим PD-1 и заблокированные. После соответствующей инкубации планшеты промывали, инкубировали с коммерческим реагентом стрептавидин-HRP, вновь промывали, инкубировали с субстратом на основе ТМВ, реакцию останавливали добавлением 1N HCl и, в завершение, снимали показания при OD 450 нм в планшетном ридере. Процент связывания рассчитывали путем сравнения показаний OD лунок с образцом (или стандарта) с показаниями лунок, содержащих только нормальную собачью

плазму (общая связывающая активность). Известные концентрации собачьего анти-PD-1 мАт, разведенного в нормальной собачьей плазме, использовали для построения стандартных кривых для каждого планшета ELISA.

[0149] Оценку фармакокинетики, основанную на количественном определении концентраций в плазме методом ELISA, проводили с использованием Phoenix 64 WinNonlin, сборка 8.1.0.3530, следуя некомпартментальному подходу, согласующемуся с введением путем в/в инфузии.

[0150] Концентрацию одАт в плазме каждого образца крови измеряли методом ELISA, а кажущийся терминальный период полувыведения ( $T_{1/2}$ ), площадь под кривой в зависимости от времени от начала введения дозы до момента последней поддающейся измерению концентрации ( $AUC_{\text{последн.}}$ ), системный клиренс (Cl) и объем распределения одАт в равновесном состоянии ( $V_{\text{pc}}$ ) рассчитывали. Оценка показала, что средний период полувыведения анти-PD-1 одАт составлял от 67,8 до 89,8 часов. Средний период полувыведения анти-PD-1 одАт в случае 1-й и 2-й в/в инфузии составлял от 67,8 до 79,7 и от 77,8 до 89,8 часов, соответственно. Клиренс (в среднем 1,63-2,47 мл/ч/кг) и объем распределения (в среднем 128-202 мл/кг) были низкими. Экспозиция (AUC) увеличивалась пропорционально дозе от 0,5 до 4,5 мг/кг, и накопление после двух инфузий отсутствовало.

[0151] Исходя из отсутствия связанных с тестируемым препаратом отклонений или изменений клинической патологии, результатов проточной цитометрии или уровней цитокинов, анти-PD-1 одАт хорошо переносилось при введении в виде двух внутривенных (в/в) инфузий во всех дозах и во все моменты времени. Результаты суммированы в Таблице 5, ниже, и на ФИГ. 5А-С.

**Таблица 5**

Группа (кол-во собак)	Препарат (мг/мл)	Инфузия №	Уровень дозы (мг/кг)	Среднее $T_{1/2}$ (час)	Средняя $AUC_{\text{последн.}}$ (час*мкг/мл)	Средний Cl (мл/час/кг)	Средний $V_{\text{pc}}$ (мл/кг)
2 (3)	0,5	1	0,5	78,8	205	2,47	202
		2		83,2	251	1,96	139
3 (3)	1,5	1	1,5	79,7	727	2,03	172
		2		77,8	915	1,66	145
4 (3)	4,5	1	4,5	67,8	3026	1,85	128
		2		89,8	2963	1,63	134

**Таблица некоторых последовательностей**

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность
1	Собачий PD-1	MGSRRGPWPL VWAVLQLGWW PGWLLDSPDR PWSPLTFSPA QLTVQEGENA TFTCSLADIP DSFVLNWyRL

		SPRNQTDKLA AFQEDRIEPG RDRRFRVTRL PNGRDFHMSI VAARLNDSGI YLCGAIYLP NTQINESPRA ELSVTERTLE PPTQSPSPPP RLSGQLQGLV IGVTSVLVGV LLLLLLTWVL AAVFPRATRG ACVCGSEDEP LKEGPDAAPV FTLDYGELDF QWREKTPEPP APCAPEQTEY ATIVFPGRPA SPGRRASASS LQGAQPPSPE DGPGLWPL
2	PD1-8 VHH	QVQLQQSGGGLVQAGGSLRVSCAASGRTFSSYGMGWFRQA PGKEREFAAISWSGGTQYIYADSAKGRFTISRDNANTVYL QMNSLKPEDTAVYYCADYTDYVVYRPOEIGYWGQGTQVT VKP
3	PD1-14 VHH	QVQLQQSGGGLAQAGGSLRLSCAASGRTVSIYAMGWFRQA PGKEREFAIGWNGGTTYIYADSVGRFTISRDHAKNTAYL QMNSLKPEDTAVYYCAAQESAAGTLGDYWGRGTQVTVKP
4	PD1-13 VHH	QVTLKESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTEIYAMGWFRQAP GKEREFAIGWSSGGTTYIYADSVGRFTISRDSAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAQDSVAGTLGDYWGQGTQVTVKP
5	PD1-5 VHH	QVTLRESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFGLYAMTWFRQAP GKDREGISCISSSDGSTIYADSVKGRFTASRDNAKDTMYLQM NNLNPEDTAVYYCAATDYETRCDYGLRLRDRTAYWGPQTQV TVKP
6	PD1-14 CDR1	GRTVSIYAMG
7	PD1-14 CDR2	GIGWNGGTTY
8	PD1-14 CDR3	QESAAGTLGDY
9	czPD1-14v1 VHH	EVQLVESGGGEVKPGGSLRLSCVASGRTVSIYAMGWFRQAP GKEREFAIGWSSGGTTYADAVKGRFTISRDNANTVYLQ MSSLRAEDTAVYYCAAQESAAGTLGDYWGQGTQVTVKP
10	czPD1-14v2 VHH	EVQLVESGGGEVKPGGSLRLSCVASGRTVSIYAMGWFRQAP GKEREFAIGWNGGTTYADAVKGRFTISRDNANTVYL QMSSLRAEDTAVYYCAAQESAAGTLGDYWGQGTQVTVKP
11	czPD-1-14v3 VHH	EVQLVESGGGEVKPGGSLRLSCVASGRTVSIYAMGWFRQAP GKEREFAIGWNGGTTYADAVKGRFTISRDNANTVYL QMSSLRAEDTAVYYCAAQESAAGTLGDYWGQGTQVTVKP
12	czPD-1-14v4	EVQLVESGGGEVKPGGSLRLSCVASGRTVSIYAMGWFRQAP

	VHH	GKREFVAGIGWNGGTTYADAVKGRFTISRDHAKNTAYL QMSSLRAEDTAVYYCAAQESAAGTLGDYWGQGTQVTVKP
13	czPD-1-14v5 VHH	EVQLVESGGGEVKPGGSLRLSCAASGRTVSIYAMGWFRQAP GKREFVAGIGWNGGTTYADAVEGRFTISRDHAKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAQESAAGTLGDYWGQGTQVTVKP
14	czPD1-14v1-Fc xEML-DANA	EVQLVESGGGEVKPGGSLRLSCVASGRTVSIYAMGWFRQAP GKREFVAGIGWSSGGTTYADAVKGRFTISRDNANTVYLQ MSSLRAEDTAVYYCAAQESAAGTLGDYWGQGTQVTVKPG GGGENGRVPRPPDCPKCPAPGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPE VTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMOTAQTQPREEQFAGT YRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARG QAHQPSVYVLPSSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSN GQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFI CAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
15	czPD1-14v2-Fc xEML-DANA	EVQLVESGGGEVKPGGSLRLSCVASGRTVSIYAMGWFRQAP GKREFVAGIGWNGGTTYADAVKGRFTISRDNANTVYL QMSSLRAEDTAVYYCAAQESAAGTLGDYWGQGTQVTVKP GGGGENGRVPRPPDCPKCPAPGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTP EVTTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMOTAQTQPREEQFAG TYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKAR GQAHQPSVYVLPSSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQS NGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDT FICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
16	czPD-1-14v3-Fc xEML-DANA	EVQLVESGGGEVKPGGSLRLSCVASGRTVSIYAMGWFRQAP GKREFVAGIGWNGGTTYADAVKGRFTISRDHAKNTVYL QMSSLRAEDTAVYYCAAQESAAGTLGDYWGQGTQVTVKP GGGGENGRVPRPPDCPKCPAPGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTP EVTTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMOTAQTQPREEQFAG TYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKAR GQAHQPSVYVLPSSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQS NGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDT FICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
17	czPD-1-14v4-Fc xEML-DANA	EVQLVESGGGEVKPGGSLRLSCVASGRTVSIYAMGWFRQAP GKREFVAGIGWNGGTTYADAVKGRFTISRDHAKNTAYL QMSSLRAEDTAVYYCAAQESAAGTLGDYWGQGTQVTVKP

		GGGGENGRVPRPPDCPKCPAPGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTP EVTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAG TYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKAR GQAHQPSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQS NGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDT FICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
18	czPD-1-14v5-Fc xEML-DANA	EVQLVESGGGEVKPGGSLRLSCAASGRTVSIYAMGWFRQAP GKEREVAVAGIGWNGGTTYADAVEGRFTISRDHAKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAQESAAGTLGDYWGQGTQVTVKPG GGGENGRVPRPPDCPKCPAPGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPE VTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGT YRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARG QAHQPSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSN GQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFI CAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
19	Fc-область собачьего IgGB	ENGRVPRPPDCPPCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPE VTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGT YRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARG QAHQPSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSN GQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFI CAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
20	Fc-область собачьего IgGB (xEML-DANA)	ENGRVPRPPDCPKCPAPGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCV VV <sup>A</sup> LDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQF <sup>A</sup> GTYRV VSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAH QPSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSN GQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFI CAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
21	PD1-14-Fc xEML-DANA	QVQLQQSGGGLAQAGGSLRLSCAASGRTVSIYAMGWFRQA PGKEREVAVAGIGWNGGTTYADAVEGRFTISRDHAKNTAYL QMNSLKPEDTAVYYCAAQESAAGTLGDYWGRTQVTVKPG GGGGENGRVPRPPDCPKCPAPGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTP EVTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAG TYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKAR GQAHQPSVYVLPSPREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQS

		NGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDT FICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
22	PD1-8 CDR1	GRTFSSYGMG
23	PD1-8 CDR2	AISWSSGTQY
24	PD1-8 CDR3	YTDYVVYRPQEIGY
25	PD1-13 CDR1	GRTEIYYAMG
26	PD1-13 CDR2	GIGWSSGTTY
27	PD1-13 CDR3	QDSVAGTLGDY
28	PD1-5 CDR1	GLTFGLYAMT
29	PD1-5 CDR2	GIGWSSGTTY
30	PD1-5 CDR3	TDYETRCDYGLRLRDRTAY
31	PD1-13-Fc xEML-DANA	QVTLKESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTEIYYAMGWFRQAP GKEREFVAGIGWSSGTTYIADSVVEGRFTISRDSAKNTVYLQ MRSLKPEDTAVYYCAAQDSVAGTLGDYWGQGTQVTVKPG GGGENGRVPRPPDCPKCPAPGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPE VTCVVVALDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFAGT YRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARG QAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFPPDIDVEWQSN GQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFI CAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Полипептид, содержащий по меньшей мере один канинизированный домен VHH, связывающий собачий PD-1, где полипептид содержит собачью Fc-область и где по меньшей мере один домен VHH, связывающий собачий PD-1, содержит:

a) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;

b) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;

c) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; или

d) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

2. Полипептид, содержащий по меньшей мере один домен VHH, связывающий собачий PD-1, где полипептид содержит собачью Fc-область и где по меньшей мере один домен VHH, связывающий собачий PD-1, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2-5.

3. Полипептид по п. 1 или 2, содержащий один домен VHH.

4. Полипептид по п. 1 или 2, содержащий два домена VHH, где два домена VHH являются одинаковыми или разными.

5. Полипептид по п. 1 или 2, содержащий три домена VHH, где три домена VHH являются одинаковыми или разными.

6. Полипептид по любому из предшествующих пунктов, где каждый домен VHH связывает собачий PD-1.

7. Полипептид по любому из пунктов 1-6, где собачья Fc-область представляет собой Fc-область собачьего IgG.

8. Полипептид по п. 7, где собачья Fc-область представляет собой Fc-область собачьего IgGB.

9. Полипептид по п. 7 или п. 8, в котором удалены аминокислоты E233, M234 и L235 Fc-области в соответствии с нумерацией Kabat.

10. Полипептид по любому из пунктов 7-9, где Fc-область имеет замены D265A и N297A в соответствии с нумерацией Kabat.

11. Полипептид по любому из пунктов 1-8, где Fc-область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

12. Полипептид по любому из пунктов 1-10, где собачья Fc-область содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

13. Полипептид по любому из пунктов 1-12, где по меньшей мере один домен VHH,

связывающий собачий PD-1, содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

14. Полипептид по любому из пунктов 1-13, где по меньшей мере один домен VHH, связывающий собачий PD-1, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

15. Полипептид по любому из пунктов 1-10 или 12-14, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

16. Полипептид по любому из пунктов 1 или 3-13, где по меньшей мере один домен VHH, связывающий собачий PD-1, является канинизированным.

17. Полипептид по п. 16, где по меньшей мере один канинизированный домен VHH, связывающий собачий PD-1, содержит CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 9-13.

18. Полипептид по п. 16 или п. 17, где по меньшей мере один канинизированный домен VHH, связывающий собачий PD-1, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 9-13.

19. Полипептид по любому из пунктов 16-18, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 14-18.

20. Полипептид по любому из пунктов 1-19, который образует димер в физиологических условиях.

21. Полипептид по любому из пунктов 1-20, который уменьшает связывание собачьего PD-1 с собачьим PD-L1 *in vitro* и/или *in vivo*.

22. Полипептид по п. 21, который уменьшает связывание собачьего PD-1 с собачьим PD-L1 *in vitro* на по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80% или по меньшей мере 90%.

23. Полипептид по любому из пунктов 1-22, который является антагонистом биологической активности собачьего PD-1.

24. Полипептид по любому из пунктов 1-23, который связывает собачий PD-1 с аффинностью ( $K_D$ ), составляющей менее 100 нМ, менее 50 нМ, менее 25 нМ или менее 10 нМ.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пунктов 1-24 и фармацевтически приемлемый носитель.

26. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из пунктов 1-24.

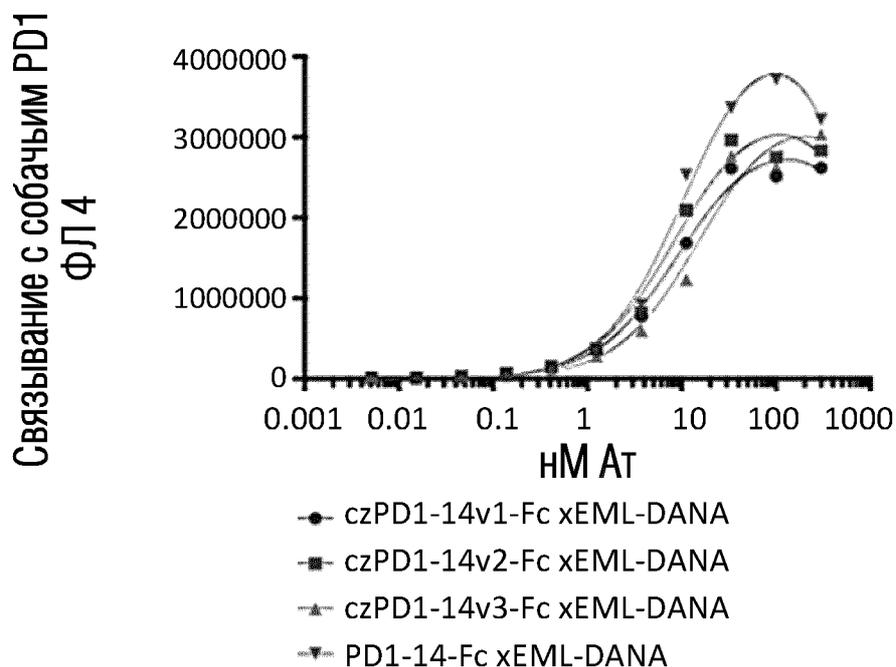
27. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 26.

28. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 26 или вектор по п. 27.

29. Клетка-хозяин, экспрессирующая полипептид по любому из пунктов 1-24.
30. Способ получения полипептида по любому из пунктов 1-24, включающий инкубацию клетки-хозяина по п. 28 или п. 29 в условиях, подходящих для экспрессии полипептида.
31. Способ по п. 30, дополнительно включающий выделение полипептида.
32. Способ активации собачьих CD4+ Т-клеток и/или собачьих CD8+ Т-клеток, включающий создание контакта Т-клеток с полипептидом по любому из пунктов 1-24.
33. Способ по п. 32, где Т-клетки находятся *in vitro*.
34. Способ по п. 32, где Т-клетки находятся *in vivo*.
35. Способ лечения рака у собак, включающий введение собакам, страдающим от рака, фармацевтически эффективного количества полипептида по любому из пунктов 1-24 или фармацевтической композиции по п. 25.
36. Способ по п. 35, где рак выбран из лимфомы, гемангиосаркомы, тучноклеточной карциномы, меланомы, остеосаркомы, рака молочной железы, почечноклеточного рака и немелкоклеточного рака легкого.
37. Способ по п. 35 или 36, также включающий применение дополнительной противораковой терапии.
38. Способ по п. 37, где дополнительная противораковая терапия включает по меньшей мере одну терапию, выбранную из резекции раковой опухоли, радиотерапии и введения дополнительного противоракового средства.

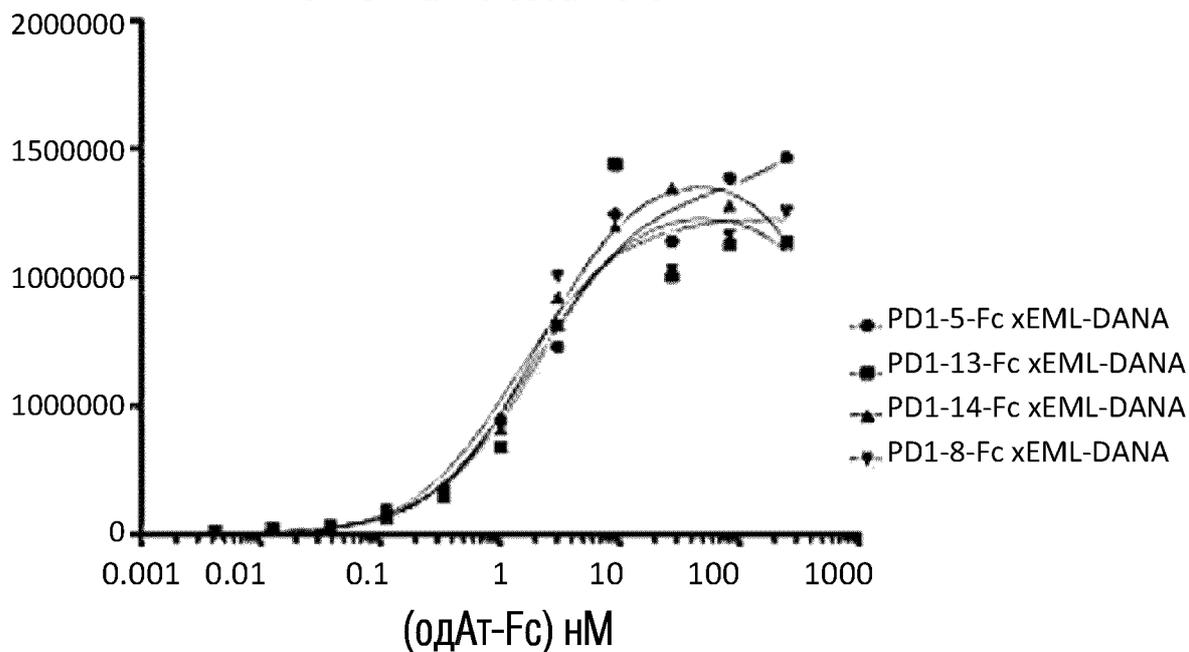
По доверенности

Клетки FS, трансфицированные  
собачьим PR1

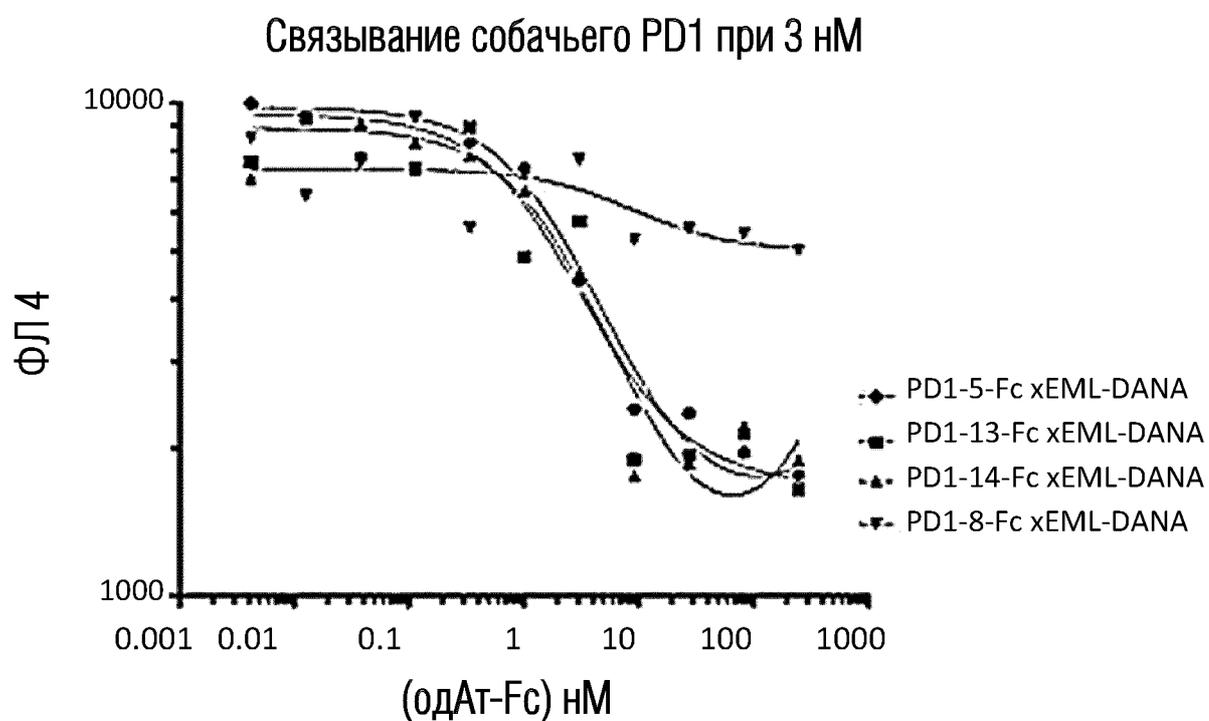
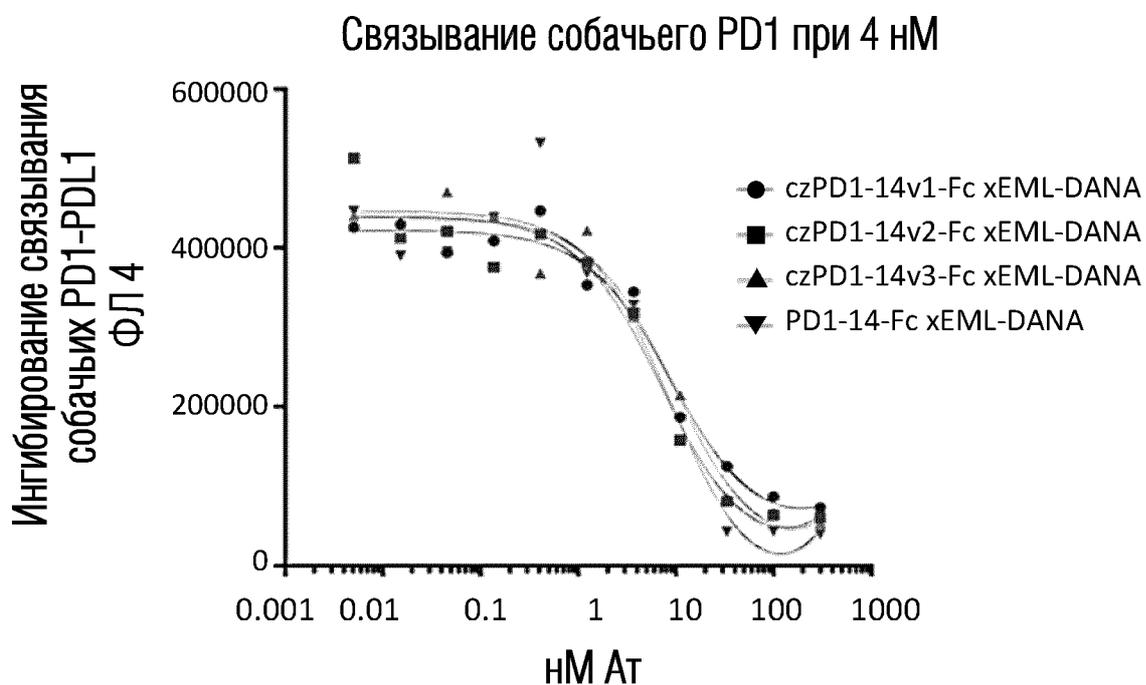


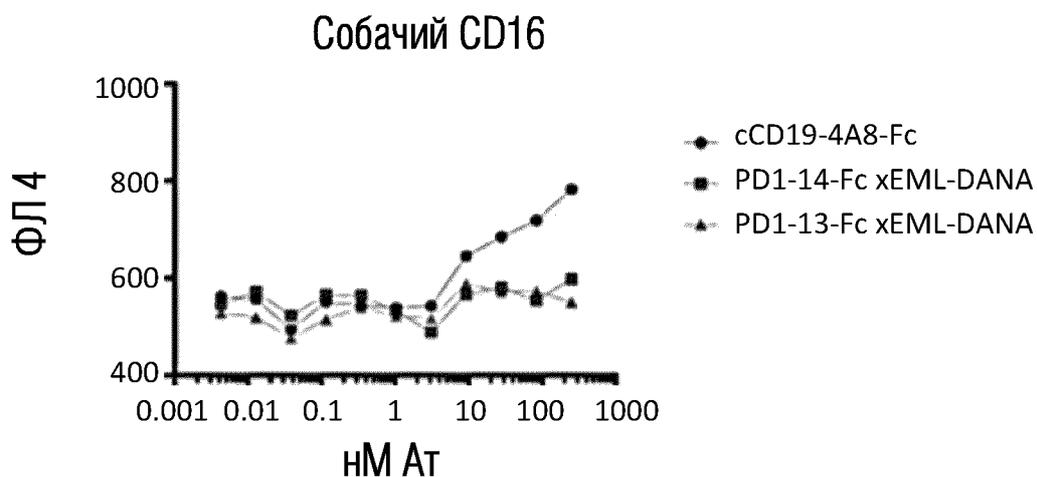
ФИГ. 1А

Связывание собачьего PD1

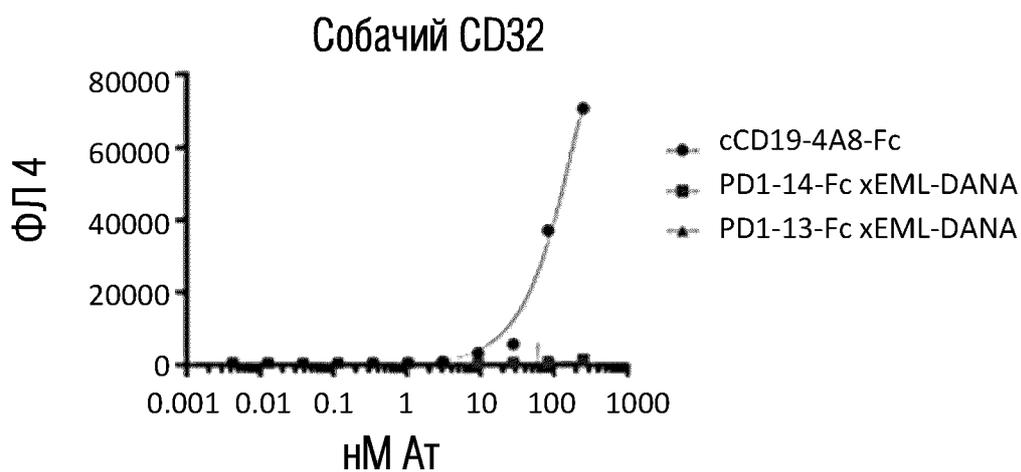


ФИГ. 1В

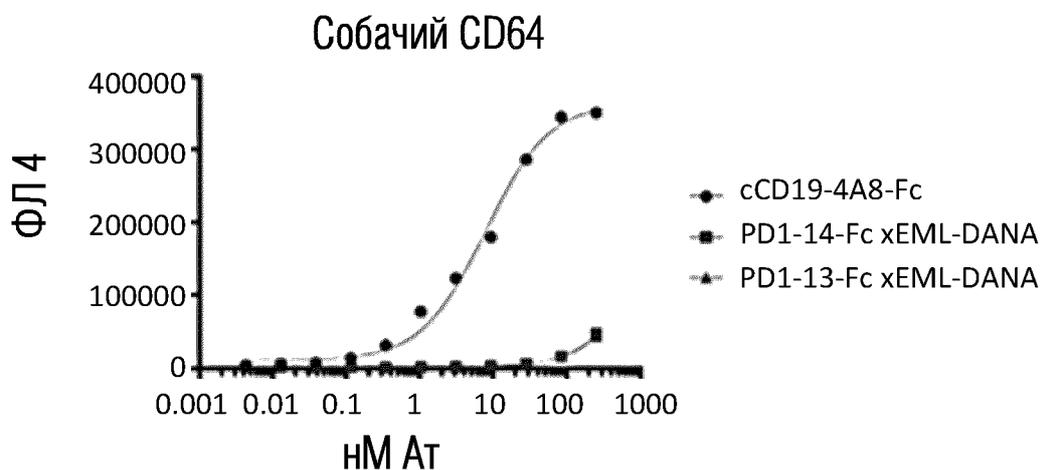




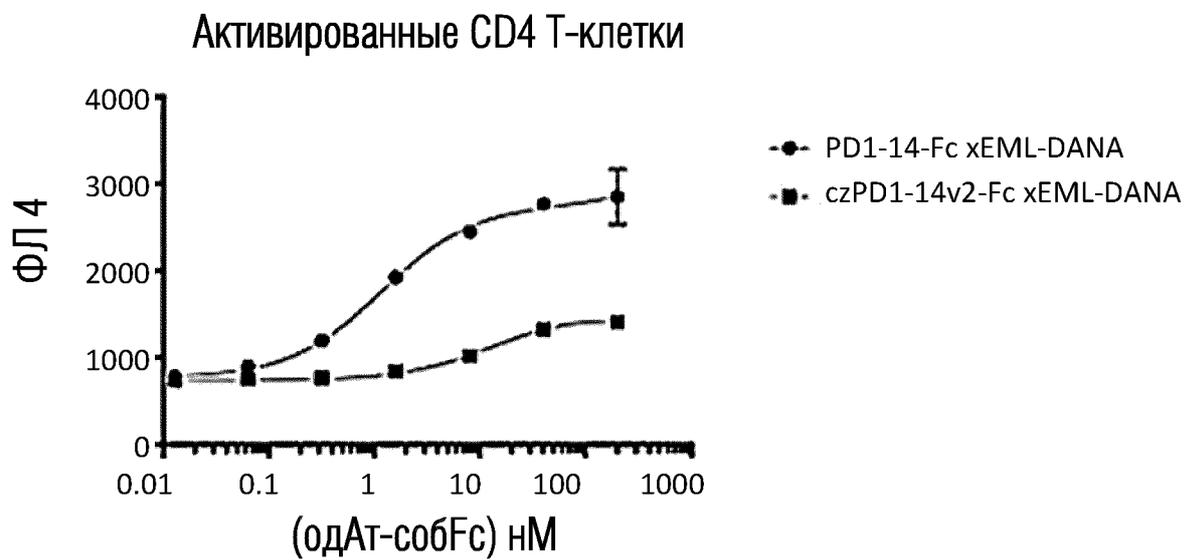
ФИГ. 3А



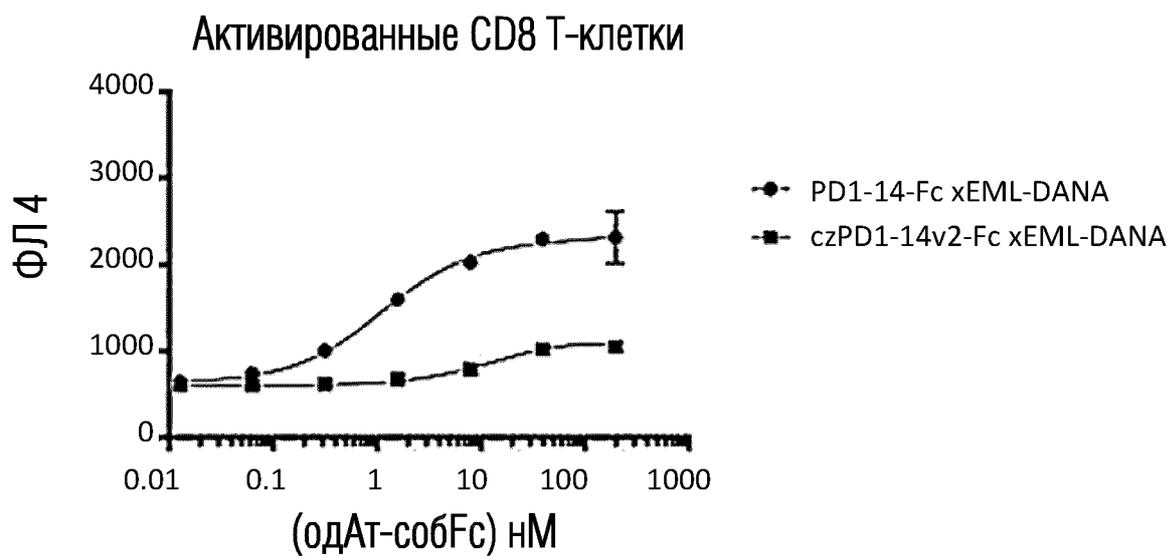
ФИГ. 3В



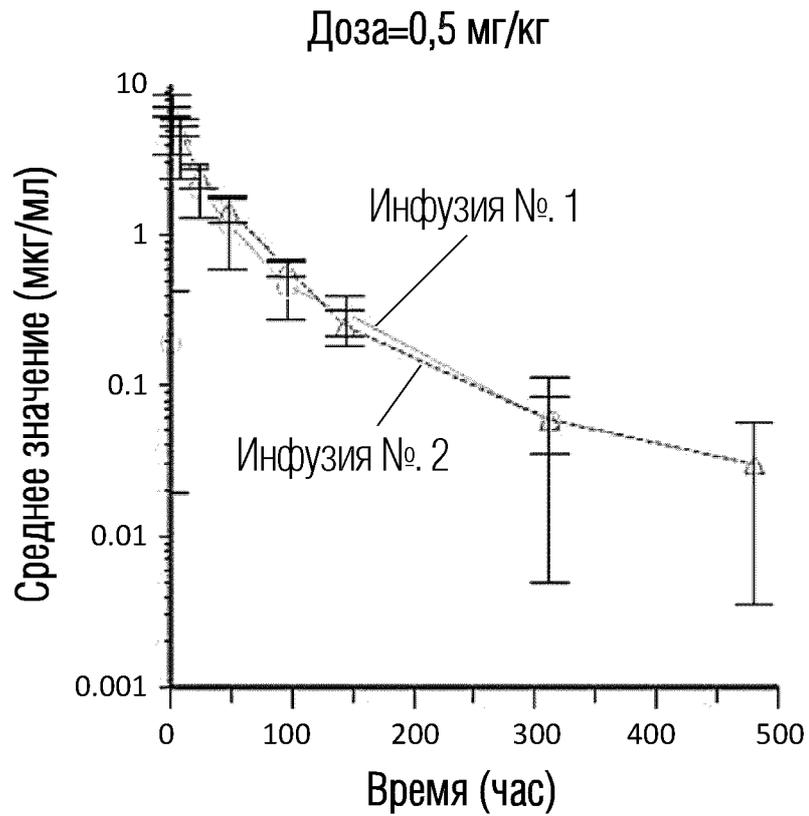
ФИГ. 3С



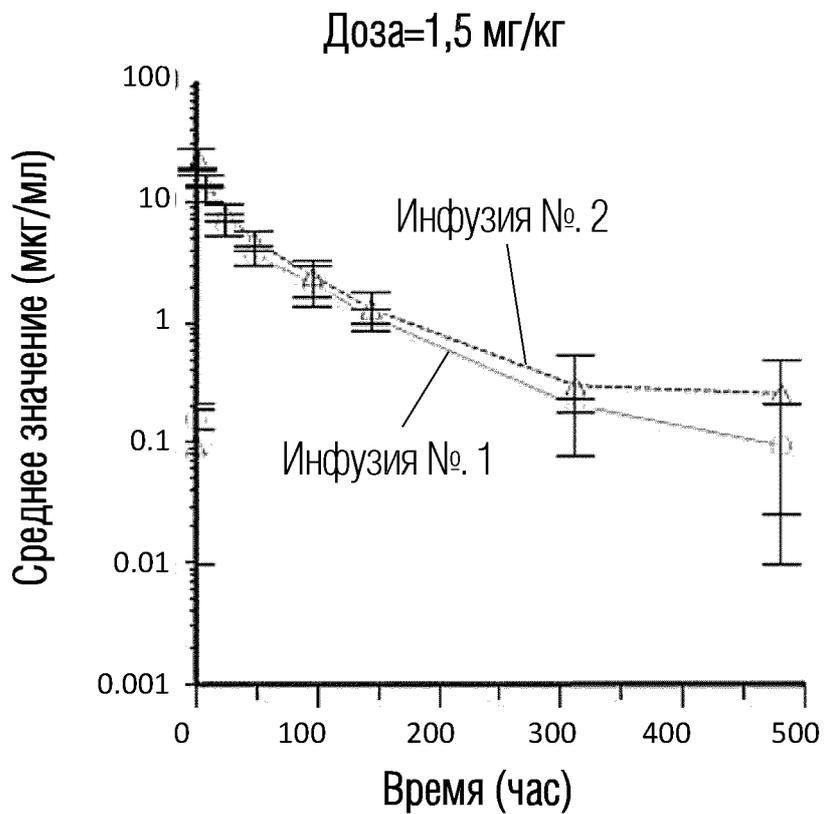
ФИГ. 4А



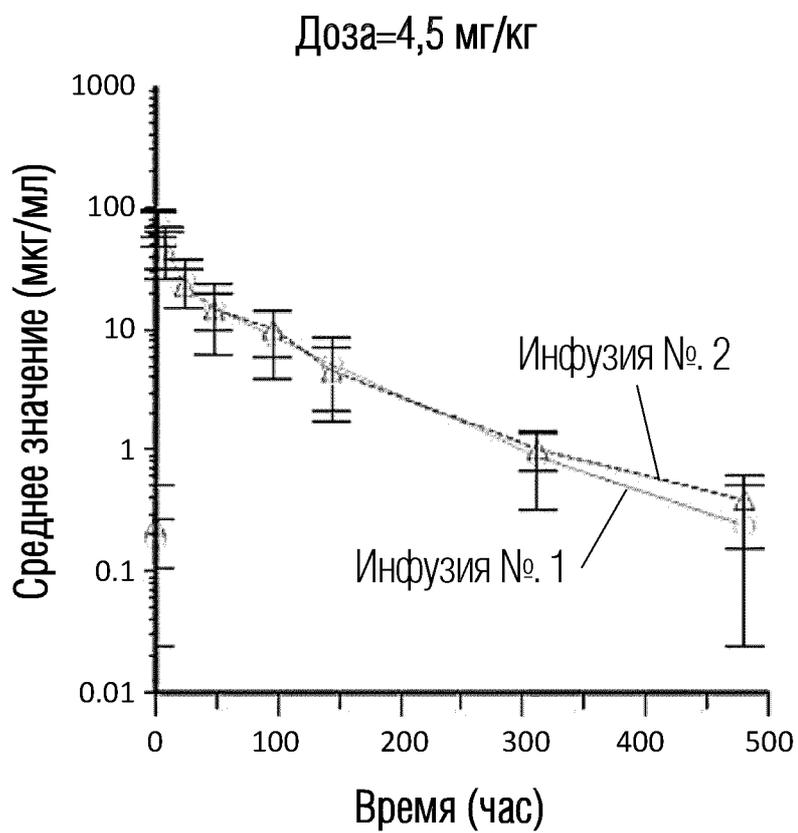
ФИГ. 4В



ФИГ. 5А



ФИГ. 5В



ФИГ. 5С