

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392663** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.11.21

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

(22) Дата подачи заявки
2022.03.30

(54) **МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, СОДЕРЖАЩИЕ
НОВЫЕ PD-1-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ДОМЕНЫ**

(31) **2027893**

(32) **2021.03.31**

(33) **NL**

(86) **PCT/US2022/022564**

(87) **WO 2022/212516 2022.10.06**

(71) Заявитель:

**МЕРИУС Н.В. (NL); ИНСАЙТ
КОРПОРЕЙШН (US)**

(72) Изобретатель:

**Плайт Саймон Эдвард (NL), Майес
Патрик, Настри Орасио Г., Стюарт
Шон М. (US)**

(74) Представитель:

Абильманова К.С. (KZ)

(57) Настоящее изобретение относится к мультиспецифическим связывающим молекулам, содержащим новые PD-1-связывающие домены, которые характеризуются более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем у эталонного PD-1-связывающего домена. Такие мультиспецифические связывающие молекулы дополнительно обеспечивают сопоставимую, или равную, или более высокую эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1 человека, чем эталонное антитело к PD-1. Настоящее изобретение, в частности, относится к мультиспецифическим связывающим молекулам, содержащим новый PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен. Также предложен способ лечения заболевания, в частности заболевания, связанного с подавленной иммунной системой, такого как рак, с помощью мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению. Настоящее изобретение дополнительно относится к вектору и клетке, которые содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие новый PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен.

A1

202392663

202392663

A1

МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, СОДЕРЖАЩИЕ НОВЫЕ PD-1-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ДОМЕНЫ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области антител. В частности, оно относится к области терапевтических антител для лечения заболеваний, в которых задействованы аберрантные клетки. Более конкретно, оно относится к мультиспецифическим связывающим молекулам, содержащим новые связывающие домены, которые связывают PD-1 человека.

Предшествующий уровень техники

Рак по-прежнему является основной причиной смерти в мире, несмотря на многочисленные достижения, которые были сделаны в лечении данного заболевания, и расширение знаний о молекулярных явлениях, которые приводят к развитию рака. Традиционно большинство открытий противораковых лекарственных средств были сосредоточены на средствах, которые блокируют основные функции клеток и уничтожают делящиеся клетки. Однако в случаях рака на поздних стадиях, независимо от того, насколько агрессивно оно применяется, даже до такой степени, когда пациенты страдают от опасных для жизни побочных эффектов лечения, химиотерапия редко приводит к полному излечению. В большинстве случаев опухоли у пациентов перестают расти или временно уменьшаются (что называют ремиссией) только для того, чтобы снова начать пролиферировать, иногда быстрее (что называют рецидивом), и их становится все труднее лечить. За последние годы центр внимания разработки противораковых лекарственных средств сместился от широко цитотоксической химиотерапии к средствам таргетной цитостатической терапии с меньшей токсичностью. Лечение рака на поздних стадиях с помощью средств таргетной терапии было признано обоснованным в клинических условиях при лейкозе и некоторых других формах рака. Однако в большинстве случаев различных форм

саркомы таргетные подходы по-прежнему оказываются недостаточно эффективными для полной ликвидации рака у большинства пациентов.

Целенаправленное воздействие на различные формы рака было достигнуто с помощью ряда различных способов, в том числе, например, малых молекул, направленных на сигнальные белки, от которых зависит выживание и/или рост рака, вакцин с опухолеспецифическими белками, средств клеточной терапии с иммунными клетками, которые активно уничтожают опухолевые клетки, и антител, которые нацеливают цитотоксические молекулы на опухоль, препятствуют передаче сигналов и/или (пере)направляют иммунную систему хозяина на опухолевые клетки.

Развивающимся классом терапевтических антител являются биспецифические антитела, содержащие два различных сайта связывания, которые связывают различные антигены или различные эпитопы на одном и том же антигене. Биспецифические антитела могут быть разработаны для нескольких применений. Во-первых, биспецифические антитела могут обеспечивать большую тканеспецифичность, чем моноспецифические антитела. Некоторые опухолеассоциированные антигены не только (сверх)экспрессируются опухолевыми клетками, но также экспрессируются на нормальных, здоровых клетках. Биспецифическое антитело, направленное против двух различных опухолеассоциированных антигенов, задействованных в определенном типе рака, может специфически нацеливать антитело на место локализации опухоли, где антитело индуцирует уничтожение опухолевых клеток, тем самым предупреждая связывание с неопухолевыми клетками, экспрессирующими только один из антигенов, и тем самым снижая токсичность за пределами места локализации. Другие механизмы действия включают, например, взаимодействие иммунных клеток с опухолевыми клетками и нарушение двух сигнальных путей, необходимых для роста опухоли.

Интересной мишенью для терапии антителами являются белки иммунных контрольных точек, такие как, например, PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3 и TIM-3.

На сегодняшний день описан ряд моноспецифических антител, нацеленный на PD-1, а также некоторые биспецифические антитела, содержащие связывающий домен, нацеленный на PD-1. Однако у каждого из данных биспецифических антител есть свои проблемы при производстве эффективного терапевтического лекарственного средства. Таким образом, остается потребность в разработке новых эффективных биспецифических антител к PD-1×LAG-3.

Сущность изобретения

Одной из целей настоящего изобретения является создание нового фармацевтического средства для лечения заболевания человека, в частности, для лечения рака. Данная цель достигается за счет создания мультиспецифических связывающих молекул, содержащих новые связывающие домены антитела к PD-1 человека, и, в частности, биспецифических антител, содержащих новый связывающий домен антитела к PD-1 человека и связывающий домен антитела к LAG-3 человека.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающий домен антитела к PD-1 человека, характеризующийся более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека, где эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека содержит переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 34, и переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением также предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающий домен антитела к PD-1 человека, где связывающий домен антитела к PD-1 человека обеспечивает по меньшей мере сопоставимую, или равную, или более высокую эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1, чем эталонное антитело к PD-1 человека, где эталонное антитело к PD-1

человека содержит два переменных участка тяжелой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 34, и два переменных участка легкой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением дополнительно предложено мультиспецифическое антитело, содержащее PD-1-связывающий домен, описанный в данном документе, и связывающий домен, который связывается с LAG-3 человека.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество мультиспецифической связывающей молекулы, описанной в данном документе.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением также предложена мультиспецифическая связывающая молекула, описанная в данном документе, и фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, для применения при лечении заболевания, например заболевания, связанного с подавленной иммунной системой, или рака.

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

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

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением дополнительно предложен вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к PD-1 человека, который описан в данном документе, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к LAG-3 человека, который описан в данном документе.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением дополнительно предложена клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к PD-1 человека, который описан в данном документе, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к LAG-3 человека, который описан в данном документе.

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

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложен способ получения мультиспецифической связывающей молекулы, которая описана в данном документе, а также способ получения ее вариантов.

Подробное описание

Настоящее изобретение описывает несколько связывающих доменов антитела к PD-1 человека, переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1-8, и мультиспецифические связывающие молекулы, содержащие такие связывающие домены антитела к PD-1 человека.

Белок запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1) представляет собой рецептор на клеточной поверхности, который принадлежит к семейству

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

LAG-3 известен под различными названиями, такими как фактор активации лимфоцитов 3, ген активации лимфоцитов 3, антиген CD223, белок FDC, CD223, LAG-3 или FDC. Внешние идентификаторы для LAG3: HGNC: 6476; Entrez Gene: 3902; Ensembl: ENSG00000089692; OMIM: 153337 и UniProtKB: P18627. LAG-3 является близкородственным с CD4. LAG-3 локализован на 12-й хромосоме человека (12p13.32), рядом с геном CD4, и его последовательность примерно на 20% идентична CD4. Белок LAG-3 связывает неголоморфный участок главного комплекса гистосовместимости 2 (МНС II класса) с большей аффинностью, чем CD4. LAG-3 является одним из различных рецепторов иммунных контрольных точек, которые координационно активируются как на регуляторных Т-клетках (Treg), так и на анергических Т-клетках. LAG-3 может

оказывать отрицательное регулирующее действие на пролиферацию, активацию и гомеостаз Т-клеток.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека в мультиспецифической связывающей молекуле содержит по меньшей мере переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи. Переменный участок легкой цепи может представлять собой любой подходящий переменный участок легкой цепи, описанный далее в данном документе. В определенных вариантах осуществления переменный участок легкой цепи предпочтительно представляет собой переменный участок легкой цепи из легкой цепи, которая способна образовывать пары с множеством тяжелых цепей, характеризующихся специфичностью к различным эпитопам. Такая легкая цепь в данной области техники также называется «общей легкой цепью».

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающий домен антитела к PD-1 человека, где связывающий домен антитела к PD-1 человека характеризуется более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека, где эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека содержит переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 34, и переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающий домен антитела к PD-1 человека, в частности, один связывающий домен антитела к PD-1 человека, где мультиспецифическая связывающая молекула характеризуется более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонное антитело к PD-1 человека, где эталонное антитело к PD-1 человека содержит два

вариабельных участка тяжелой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 34, и два вариабельных участка легкой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35.

Определение того, характеризуется ли связывающий домен антитела к PD-1 человека более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека, можно осуществить путем измерения аффинности связывания обоих связывающих доменов антитела к PD-1 человека в анализе одного типа, используя одинаковые условия анализа. Таким образом, в определенных вариантах осуществления аффинность связывания связывающего домена антитела к PD-1 человека или мультиспецифической связывающей молекулы и аффинность связывания эталонного связывающего домена антитела к PD-1 человека или эталонного антитела к PD-1 человека измерены в анализе одного типа, используя одинаковые условия анализа. В определенных вариантах осуществления анализ представляет собой анализ, в котором применяют поверхностный плазмонный резонанс (SPR) для измерения аффинности связывания, такой как биосенсорная система Biacore®, или равновесное титрование раствора (SET) (см. Friguet B et al. (1985) *J. Immunol Methods*; 77(2): 305-319, и Hanel C et al. (2005) *Anal Biochem*; 339(1): 182-184). Значения аффинности связывания PD-1-связывающих доменов или мультиспецифических связывающих молекул, представленных в данном документе, получены с помощью способа, описанного в примере 4.

Вкратце: в примере 4 описано проведение SPR с применением прибора Biacore 8K при температуре 25°C. Антитела к Fc человека иммобилизуют посредством аминного связывания на проточных ячейках сенсорного чипа CM5 Series S с уровнями иммобилизации ~9000 RU. Требуемого уровня захвата (100-150 RU) антител к PD-1 достигают путем пропускания заданной концентрации антител к PD-1 через активную проточную ячейку каждого канала в течение 60 секунд со скоростью потока 10 мкл/мин. В течение 240 секунд (время ассоциации) вводят серию концентраций трехкратного серийного разведения PD-1 (всего 7

концентраций, наиболее высокая на уровне 300 нМ) и рабочего буфера, сразу после этого вводят рабочий буфер в течение 480 секунд (время диссоциации) при скорости потока 45 мкл/мин. Поверхность регенерируют 30-секундным введением 3 М $MgCl_2$ со скоростью потока 30 мкл/мин. Кинетику связывания и параметры аффинности получают путем глобальной аппроксимации данных к модели связывания 1:1.

Предпочтительно, SPR проводят со связывающими доменами антитела к PD-1 человека в формате IgG, измеряя аффинность связывания его моновалентного взаимодействия с PD-1.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека или мультиспецифическая связывающая молекула характеризуется по меньшей мере в десять раз более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека или эталонное антитело к PD-1 человека, по результатам измерения методом SPR, как описано в данном документе, например, как описано в примере 4. В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека или мультиспецифическая связывающая молекула характеризуется в десять - пятьдесят, в десять - сорок, в десять - тридцать или в десять - двадцать раз более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека или эталонное антитело к PD-1 человека, по результатам измерения методом SPR, как описано в данном документе, например, как описано в примере 4. В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека или мультиспецифическая связывающая молекула характеризуется в десять раз более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека или эталонное антитело к PD-1 человека, по результатам измерения методом SPR, как описано в данном документе, например, как описано в примере 4.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека или мультиспецифическая связывающая молекула характеризуются аффинностью связывания с PD-1 человека в диапазоне приблизительно 0,1-1,0 нМ, в частности в диапазоне приблизительно 0,3-0,8 нМ, более конкретно в диапазоне приблизительно 0,38-0,78 нМ по результатам измерения методом SPR, как описано в данном документе, например, как описано в примере 4. В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека или мультиспецифическая связывающая молекула характеризуются аффинностью связывания с PD-1 человека в диапазоне 0,1-1,0 нМ, в частности в диапазоне 0,3-0,8 нМ, более конкретно в диапазоне 0,38-0,78 нМ по результатам измерения методом SPR, как описано в данном документе, например, как описано в примере 4. В определенных вариантах осуществления аффинность связывания представляет собой аффинность связывания моновалентного взаимодействия с PD-1.

В определенных вариантах осуществления аффинность связывания измерена как со связывающим доменом антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, так и с эталонным связывающим доменом антитела к PD-1 человека в бивалентном моноспецифическом формате IgG. В определенных вариантах осуществления аффинность связывания измерена как с использованием связывающего домена антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, так и с использованием эталонного связывающего домена антитела к PD-1 человека в бивалентном биспецифическом формате IgG. В определенных вариантах осуществления аффинность связывания измерена с использованием связывающего домена антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению в бивалентном биспецифическом формате IgG и с использованием эталонного связывающего домена антитела к PD-1 человека в бивалентном моноспецифическом формате IgG. Бивалентный биспецифический формат IgG может, например, содержать PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению или эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека, а также связывающий домен, который связывает неродственную мишень.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением также предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающий домен антитела к PD-1 человека, в частности один связывающий домен антитела к PD-1 человека, где связывающий домен антитела к PD-1 человека обеспечивает по меньшей мере сопоставимую, или равную, или более высокую эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1, чем эталонное антитело к PD-1 человека, где эталонное антитело к PD-1 человека содержит два переменных участка тяжелой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 34, и два переменных участка легкой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением также предложена мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающий домен антитела к PD-1 человека, в частности один связывающий домен антитела к PD-1 человека, где мультиспецифическая связывающая молекула характеризуется по меньшей мере сопоставимой, или равной или более высокой эффективностью блокирования связывания лиганда с PD-1, чем эталонное антитело к PD-1 человека, где эталонное антитело к PD-1 человека содержит два переменных участка тяжелой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 34, и два переменных участка легкой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35.

Определение того, обеспечивает ли связывающий домен антитела к PD-1 человека или мультиспецифическая связывающая молекула сопоставимую, или равную, или более высокую эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1, чем эталонное антитело к PD-1 человека, можно осуществить путем измерения эффективности как связывающего домена антитела к PD-1 человека или мультиспецифической связывающей молекулы, так и эталонного антитела в анализе одного типа, используя одинаковые условия анализа. Таким образом, в определенных вариантах осуществления эффективность блокирования

связывания лиганда с PD-1 у связывающего домена антитела к PD-1 человека в мультиспецифической связывающей молекуле или у мультиспецифической связывающей молекулы и эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1 у эталонного связывающего антитела к PD-1 человека измерены в анализе одного типа, используя одинаковые условия анализа. В определенных вариантах осуществления анализ представляет собой анализ PD-1/PD-L1 по гену-репортеру или анализ PD-1/LAG-3 по гену-репортеру. Данные об эффективности PD-1-связывающих доменов или мультиспецифических связывающих молекул, представленных в данном документе, получены с помощью анализа PD-1/PD-L1 по гену-репортеру, как описано в примере 2, и с помощью анализа PD-1/LAG-3 по гену-репортеру, как описано в примере 5.

Вкратце: анализ PD-1/PD-L1 по гену-репортеру, описанный в примере 2, проводят с применением клеток aAPC/CHO-K1 с PD-L1, которые представляют собой клетки CHO-K1, экспрессирующие PD-L1 человека и сконструированный белок на клеточной поверхности, предназначенный для активации родственных TCR антиген-независимым образом, и Т-клеток Jurkat, экспрессирующих PD-1 человека и ген-репортер люциферазы, управляемый элементом, чувствительным к NFAT (NFAT-RE). Аналитические планшеты, содержащие клетки с PD-L1 или PBS, инкубируют в течение ночи при температуре 37°C, в условиях 5% CO₂ и 95% относительной влажности. После инкубации лунки опорожняют и вносят тестируемый и контрольный IgG в серийном разведении, начиная с 10 мкг/мл и проводя 6-стадийное 4-кратное титрование. Также готовят основной контроль, то есть контроль без IgG. IgG, активность которых необходимо непосредственно сравнить, инкубируют на одной планшете. Добавляют Т-клетки Jurkat и аналитические планшеты инкубируют в течение 6 часов при температуре 37°C, в условиях 5% CO₂ и 95% относительной влажности. После 6 часов инкубации планшеты оставляют при комнатной температуре на 10 мин и измеряют люциферазную активность.

Вкратце: анализ PD-1/LAG-3 по гену-репортеру, описанный в примере 5, проводят с применением клеток Raji с PD-L1 и эффекторных клеток Jurkat с PD-

1 и LAG-3. 25 мкл тестируемого и контрольного IgG в 6-кратном серийном разведении, начиная с 6-300 мкг/мл, с коэффициентом разведения от 2 до 10 (конечная аналитическая концентрация, начиная с 20-100 мкг/мл) вносят в аналитические планшеты, содержащие 25 мкл эффекторных клеток Jurkat с PD-1 и LAG-3 или PBS. IgG, активность которых необходимо непосредственно сравнить, инкубируют на одной аналитической планшете. Равный объем суспензии клеток Raji с PD-L1 смешивают с таким же объемом раствора SED (100 нг/мл стафилококкового энтеротоксина D) и в аналитические планшеты вносят 25 мкл смеси Raji/SED. Аналитические планшеты инкубируют в течение 6 часов при температуре 37°C, в условиях 5% CO₂ и 95% относительной влажности. После 6 часов инкубации аналитические планшеты оставляют при комнатной температуре на 10 минут и измеряют люциферазную активность.

Предпочтительно, связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению и эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека применяют в одной и той же концентрации, предпочтительно оба в бивалентном моноспецифическом формате IgG.

В определенных вариантах осуществления сопоставимая эффективность активности блокирования связывания лиганда – PD-1 представляет собой эффективность в 5-кратном диапазоне эффективности блокирования связывания лиганда с PD-1 эталонного антитела к PD-1 человека и включает 5, 4, 3 и 2-кратное, предпочтительно 3-кратное отклонение от эффективности блокирования связывания лиганда с PD-1 эталонного антитела к PD-1 человека.

В определенных вариантах осуществления более высокая эффективность активности блокирования связывания лиганда – PD-1 представляет собой эффективность, которая в 5, 4, 3 или 2 раза, предпочтительно в 3 раза выше, чем эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1 эталонного антитела к PD-1 человека. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере сопоставимая, или равная, или более высокая эффективность активности блокирования связывания лиганда – PD-1 представляет собой эффективность,

которая в 1,1-2,0 раза, предпочтительно в 1,2-1,8 или 1,2-1,6 раза, более предпочтительно в 1,2-1,4 раза выше, чем эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1 эталонного антитела к PD-1 человека.

Эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека представляет собой PD-1-связывающий домен антитела-аналога ниволумаба, предпочтительно полученный с применением того же способа получения, что и для связывающего домена антитела к PD-1 человека в подлежащей сравнению мультиспецифической связывающей молекуле. Эталонное связывающее антитело к PD-1 человека представляет собой антитело-аналог ниволумаба, предпочтительно полученное с применением того же способа получения, что и для подлежащей сравнению мультиспецифической связывающей молекулы. Антитело-аналог ниволумаба характеризуется той же последовательностью переменного участка тяжелой цепи (SEQ ID NO: 20), что и ниволумаб. Антитело-аналог ниволумаба характеризуется той же последовательностью переменного участка легкой цепи (SEQ ID NO: 21), что и ниволумаб.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека в мультиспецифической связывающей молекуле содержит переменный участок тяжелой цепи, где переменный участок тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) одного из переменных участков тяжелой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1-8.

Последовательности CDR можно определить с использованием различных способов, в том числе без ограничения схемы нумерации по Kabat (Kabat et al., J. Biol. Chem.252:6609-6616 (1977); и/или Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991)), схемы нумерации по Chothia (Chothia et al., J. Mol. Biol.196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342: 877-883, 1989; и/или Al-Lazikani B. et al., J. Mol. Biol., 273: 927-948 (1997)), системы нумерации по Honegger и Plückthun (Honegger and Plückthun,

J. Mol. Biol., 309:657-670 (2001)), системы нумерации по MacCallum (MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996); и/или Abhinandan and Martin, Mol. Immunol., 45: 3832-3839 (2008)), системы нумерации по Lefranc (Lefranc M.P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27: 55-77 (2003); и/или Honegger and Plückthun, J. Mol. Biol., 309:657-670 (2001)) или согласно IMGT (рассмотрено в Giudicelli et al., Nucleic Acids Res. 25: 206-211 (1997)).

Каждая из данных схем нумерации устанавливает свое определение CDR на прогнозируемом вкладе аминокислотных остатков в вариабельном участке тяжелой или легкой цепи в связывание антигена. Следовательно, для идентификации CDR связывающих доменов по настоящему изобретению можно применять любой из перечисленных способов идентификации CDR. В определенных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи связывающего домена по настоящему изобретению соответствуют схеме Kabat, Chothia или IMGT. В определенных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи связывающего домена по настоящему изобретению соответствуют схеме Kabat. В определенных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи связывающего домена по настоящему изобретению соответствуют схеме Chothia. В определенных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи связывающего домена по настоящему изобретению соответствуют схеме IMGT.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека содержит вариабельный участок тяжелой цепи, где вариабельный участок тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) из вариабельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO:1-8, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) из вариабельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO:1-8, и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) из вариабельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 1-8.

HCDR по Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в перечне последовательностей, представленном в данном документе.

В определенных вариантах осуществления переменный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к PD-1 человека в мультиспецифической связывающей молекуле содержит следующее:

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

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 41 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 50 соответственно;

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

которая изложена под SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 53 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56 соответственно; или

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59 соответственно;

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

В определенных вариантах осуществления вариабельный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к PD-1 человека в мультиспецифической связывающей молекуле содержит следующее:

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

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 41 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 50 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 53 соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56 соответственно; или

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59 соответственно.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению также охватывает варианты PD-1-связывающего домена, где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. В определенных вариантах осуществления лишь один или два HCDR могут содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены.

Например, подходящие положения для введения модификации аминокислоты включают без ограничения первую, вторую и/или четвертую аминокислоту

HCDR1, третью, седьмую, восьмую, девятую, десятую, одиннадцатую, тринадцатую, четырнадцатую и/или шестнадцатую аминокислоту HCDR2 и/или шестую и/или тринадцатую аминокислоту HCDR3. Последовательности CDR согласно Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в перечне последовательностей, представленном в данном документе.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении также предложен связывающий домен антитела к PD-1 человека, содержащий следующее:

- HCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью $X_1X_2FX_3S$, где

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

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

X_3 может представлять собой W или Y; и/или

- HCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью $YIX_1YSGX_2X_3X_4X_5X_6PX_7X_8KX_9$, где

X_1 может представлять собой Y, V или I;

X_2 может представлять собой S или G;

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

X_4 может представлять собой S или N;

X_5 может представлять собой F, V или L;

X_6 может представлять собой N или S;

X_7 может представлять собой S или A;

X_8 может представлять собой F или L;

X₉ может представлять собой S, T, G, D, R или N; и/или

- HCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью GGYTGX₁GGDWFDX₂, где

X₁ может представлять собой Y, H, V или A;

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

Другие подходящие положения для введения модификации аминокислоты включают без ограничения вторую, третью, четвертую и/или пятую аминокислоту HCDR1, третью, четвертую, пятую, шестую, восьмую, девятую, десятую, одиннадцатую, двенадцатую, тринадцатую, четырнадцатую, пятнадцатую, шестнадцатую и/или семнадцатую аминокислоту HCDR2 и/или первую, вторую, шестую, седьмую, девятую, десятую, четырнадцатую, пятнадцатую, шестнадцатую и/или восемнадцатую аминокислоту HCDR3. Последовательности CDR согласно Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в перечне последовательностей, представленном в данном документе.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении также предложен связывающий домен антитела к PD-1 человека, содержащий следующее:

- HCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью RX₁X₂X₃X₄, где

X₁ может представлять собой F или Y;

X₂ может представлять собой T, A или V;

X₃ может представлять собой M, L или V;

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

- HCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью WIX₁X₂X₃X₄GX₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄, где

X₁ может представлять собой N или D;

X₂ может представлять собой P, S или T;

X₃ может представлять собой N или Q;

X₄ может представлять собой T или D;

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

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

X₇ может представлять собой T или S;

X₈ может представлять собой Y, F или H;

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

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

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

X₁₂ может представлять собой F, V или A;

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

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

- HCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью X₁X₂GYCX₃X₄DX₅CYPNX₆X₇X₈DX₉, где

X₁ может представлять собой I, S или V;

X₂ может представлять собой L, Q или N;

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

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

X₅ может представлять собой N или I;

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

X₇ может представлять собой I, V или L;

X₈ может представлять собой F, L или I;

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

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к PD-1 человека в мультиспецифической связывающей молекуле по настоящему изобретению содержит переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 1-8, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен в мультиспецифической связывающей молекуле по настоящему изобретению также охватывает варианты PD-1-связывающего домена, которые, в дополнение к упомянутым выше модификациям в HCDR, содержат одну или несколько модификаций каркасных участков. В определенных вариантах осуществления вариант PD-1-связывающего домена в мультиспецифической связывающей молекуле по настоящему изобретению не содержит модификаций в CDR-участках, но содержит одну или несколько модификаций в каркасных участках. Такие варианты характеризуются по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с последовательностями, раскрытыми в данном документе, и, согласно ожиданиям, они сохраняют специфичность связывания PD-1. Таким образом, в определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен в

мультиспецифической связывающей молекуле по настоящему изобретению содержит следующее:

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 36, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 37, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 38;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 2, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 39, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 40, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 41;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 3, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 42, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 43, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 44;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 4, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 45, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 46, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 47;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 5, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 48, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 49, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 50;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 51, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 52, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 53;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее

предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 7, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 54, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 55, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 56, или

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 8, при этом переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 57, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 58, и аминокислотную последовательность HCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 59.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен в мультиспецифической связывающей молекуле по настоящему изобретению содержит переменный участок легкой цепи. Примером подходящего переменного участка легкой цепи является переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62 соответственно, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. В определенных вариантах осуществления подходящий переменный участок легкой цепи представляет собой переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62 соответственно. В

определенных вариантах осуществления такой вариабельный участок легкой цепи может включать вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO:24, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним. Легкая цепь или вариабельный участок легкой цепи, включающие данные LCDR и/или вариабельный участок легкой цепи, представляет собой легкую цепь, называемую в данной области техники VK1-39/JK1. Это общая легкая цепь.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен в мультиспецифической связывающей молекуле по настоящему изобретению содержит вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24, при этом вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность LCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 60, аминокислотную последовательность LCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 61, и аминокислотную последовательность LCDR3, которая изложена под SEQ ID NO: 62.

Термин «общая легкая цепь» согласно настоящему изобретению относится к легкой цепи, которая способна образовывать пары с множеством различных тяжелых цепей, т. е. тяжелыми цепями, характеризующимися различными специфичностями связывания антигена или эпитопа. Общая легкая цепь особенно полезна при создании, например, биспецифических антител, при этом получение антител более эффективно, когда оба связывающих домена содержат одинаковую легкую цепь. Термин «общая легкая цепь» охватывает легкие цепи, которые идентичны или имеют некоторые различия в аминокислотных последовательностях, при этом не затрагивается специфичность связывания полноразмерного антитела. Например, в рамках объема определения общих

легких цепей, используемого в данном определении, можно получить или найти легкие цепи, которые не идентичны, но все же функционально эквивалентны, например, при введении и тестировании консервативных аминокислотных изменений, изменений аминокислот в участках, которые не вносят вклад или вносят лишь частичный вклад в специфичность связывания при образовании пары с тяжелой цепью, и т. п.

Помимо общей легкой цепи, содержащей упомянутые выше LCDR и/или переменный участок легкой цепи, можно применять и другие общие легкие цепи, известные в данной области техники. Примеры таких общих легких цепей включают без ограничения следующее: VK1-39/JK5, содержащий переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 63. LCDR согласно IMGT выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 63, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 63, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним, VK3-15/JK1, содержащий переменный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) переменного участка легкой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 64. LCDR согласно IMGT выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит

вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 64, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 64, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним, VK3-20/JK1, содержащий вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) вариабельного участка легкой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 65. LCDR согласно IMGT выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 65, где каждый из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. В определенных вариантах осуществления легкая цепь содержит вариабельный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 65, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним, и VL3-21/JL3, содержащий вариабельный участок легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) вариабельного участка легкой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 66. LCDR согласно IMGT выделены жирным шрифтом и

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

VK1-39 является сокращением от гена переменного домена цепи каппа 1-39. Ген также известен как ген переменного домена цепи каппа 1-39 иммуноглобулина, IGKV139, IGKV1-39, IgV κ 1-39. Внешними идентификаторами гена являются HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. Предпочтительная аминокислотная последовательность VK1-39 изложена под SEQ ID NO: 67. Это последовательность V-участка. V-участок можно комбинировать с одним из пяти J-участков. Две предпочтительные соединенные последовательности обозначены как VK1-39/JK1 и VK1-39/JK5, альтернативные названия: IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 или IgV κ 1-39*01/IGJ κ 5*01 (номенклатура согласно доступной во всемирной сети базе данных IMGT на imgt.org). Данные названия являются иллюстративными и охватывают аллельные варианты сегментов гена.

VK3-15 является сокращением от гена переменного домена цепи каппа 3-15. Ген также известен как ген переменного домена цепи каппа 3-15 иммуноглобулина, IGKV315, IGKV3-15, IgV κ 3-15. Внешними идентификаторами гена являются HGNC: 5816; Entrez Gene: 28913; Ensembl: ENSG00000244437. Предпочтительная аминокислотная последовательность VK3-15 изложена под SEQ ID NO: 68. Это последовательность V-участка. V-

участок можно комбинировать с одним из пяти J-участков. Предпочтительная соединенная последовательность обозначена как VK3-15/JK1, альтернативным названием является V_κ3-15*01/IGJ_κ1*01 (номенклатура согласно доступной во всемирной сети базе данных IMGT на imgt.org). Данное название является иллюстративным и охватывает аллельные варианты сегментов гена.

VK3-20 является сокращением от гена варибельного домена цепи каппа 3-20. Ген также известен как ген варибельного домена цепи каппа 3-20 иммуноглобулина, IGKV320, IGKV3-20, IgV_κ3-20. Внешними идентификаторами гена являются HGNC: 5817; Entrez Gene: 28912; Ensembl: ENSG00000239951. Предпочтительная аминокислотная последовательность VK3-20 изложена под SEQ ID NO: 69. Это последовательность V-участка. V-участок можно комбинировать с одним из пяти J-участков. Предпочтительная соединенная последовательность обозначена как VK3-20/JK1, альтернативным названием является IgV_κ3-20*01/IGJ_κ1*01 (номенклатура согласно доступной во всемирной сети базе данных IMGT на imgt.org). Данное название является иллюстративным и охватывает аллельные варианты сегментов гена.

VL3-21 является сокращением от гена варибельного домена цепи лямбда 3-21. Ген также известен как ген варибельного домена цепи лямбда 3-21 иммуноглобулина, IGLV321, IGLV3-21, IgV_λ3-21. Внешними идентификаторами гена являются HGNC: 5905; Entrez Gene: 28796; Ensembl: ENSG00000211662.2. Предпочтительная аминокислотная последовательность VL3-21 изложена под SEQ ID NO: 70. Это последовательность V-участка. V-участок можно комбинировать с одним из пяти J-участков. Предпочтительная соединенная последовательность обозначена как VL3-21/JL3, альтернативным названием является IgV_λ3-21/IGJ_λ3 (номенклатура согласно доступной во всемирной сети базе данных IMGT на imgt.org). Данное название является иллюстративным и охватывает аллельные варианты сегментов гена.

Дополнительно можно применять любой варибельный участок легкой цепи антитела к PD-1, доступного в данной области техники, или любой другой

вариабельный участок легкой цепи, который можно легко получить, такой как, например, из библиотеки дисплея антител, по проявлению антигенсвязывающей активности в паре с PD-1-связывающим доменом по настоящему изобретению.

В определенных вариантах осуществления PD-1-связывающий домен в мультиспецифической связывающей молекуле по настоящему изобретению может дополнительно содержать участок CH1 и CL. Можно применять любой домен CH1, в частности домен CH1 человека. Примером подходящего домена CH1 является аминокислотная последовательность, представленная под SEQ ID NO: 29. Можно применять любой домен CL, в частности CL человека. Примером подходящего домена CL является аминокислотная последовательность, представленная под SEQ ID NO: 71.

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

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула представляет собой мультиспецифическое антитело. Мультиспецифическое антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело в любом формате антитела, которое содержит по меньшей мере два связывающих домена, которые характеризуются специфичностью по меньшей мере к двум различным мишеням или эпитопам. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой биспецифическое антитело. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению может дополнительно содержать Fc-участок или его часть. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению представляет собой антитело IgG1.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению дополнительно содержит связывающий домен, который связывается с молекулой на клеточной поверхности, экспрессируемой на иммунной эффекторной клетке.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит PD-1-связывающий домен, который описан в данном документе, и связывающий домен антитела к LAG-3 человека. Подходящие связывающие домены антитела к LAG-3 человека содержат переменный участок тяжелой цепи, содержащий следующее:

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 11;
- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 12;
- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 13,
- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14,
- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15,
- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 16, и

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 17,

где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. HCDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в указанных SEQ ID NO в перечне последовательностей, представленных в данном документе.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к LAG-3 человека содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий следующее:

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 11;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 12;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 13,

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14,

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15,

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 16, и

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 17.

В определенных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению охватывает варианты LAG-3-связывающего домена, где каждый из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. Ожидается, что такие варианты сохраняют специфичность связывания LAG-3.

Например, подходящие положения для введения модификации аминокислоты включают без ограничения вторую и/или третью аминокислоту HCDR1, третью, седьмую, десятую, тринадцатую и/или шестнадцатую аминокислоту HCDR2 и/или первую аминокислоту HCDR3. Последовательности HCDR согласно Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в перечне последовательностей, представленном в данном документе.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к LAG-3 человека содержит следующее:

- HCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью SX_1X_2WS , где

X_1 может представлять собой Y или F;

X_2 может представлять собой Y или S; и/или

- HCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью $YIX_1YSGX_2TNX_3NPX_4LKX_5$, где

X_1 может представлять собой Y или D;

X₂ может представлять собой S или T;

X₃ может представлять собой Y или F;

X₄ может представлять собой S или F;

X₅ может представлять собой S или I; и/или

- HCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью X₁LLYKWN^YVEGF^DI, где

X₁ может представлять собой D или H.

Например, подходящие положения для введения модификации аминокислоты включают без ограничения первую, третью и/или четвертую аминокислоту HCDR1, седьмую, десятую и/или двенадцатую аминокислоту HCDR2 и/или третью аминокислоту HCDR3. Последовательности HCDR согласно Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в перечне последовательностей, представленном в данном документе.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к LAG-3 человека содержит следующее:

- HCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью X₁YX₂X₃H, где

X₁ может представлять собой S, N или R;

X₂ может представлять собой G или D;

X₃ может представлять собой M, T или I; и/или

- HCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью VISYDGX₁NKX₂YX₃DSVKG, где

X₁ может представлять собой S или N;

X₂ может представлять собой Y, F или H;

X₃ может представлять собой A, E или V; и/или

- HCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью ERX₁WDVFDI, где

X₁ может представлять собой G или D.

Например, подходящие положения для введения модификации аминокислоты включают без ограничения первую и/или третью аминокислоту HCDR1, пятую и/или восьмую аминокислоту HCDR2 и/или третью аминокислоту HCDR3. Последовательности HCDR согласно Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в перечне последовательностей, представленном в данном документе.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к LAG-3 человека содержит следующее:

- HCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью X₁YX₂MH, где

X₁ может представлять собой S или N;

X₂ может представлять собой G или A; и/или

- HCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью VISYX₁GSX₂KYYADSVKG, где

X₁ может представлять собой D или H;

X₂ может представлять собой N или D; и/или

- HCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью DGDNWDX₁FDI, где

X₁ может представлять собой V или A.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению содержит переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 11-17, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

В определенных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению также охватывает варианты LAG-3-связывающего домена, которые, в дополнение к модификациям в HCDR, содержат одну или несколько модификаций в каркасных участках. В определенных вариантах осуществления вариант LAG-3-связывающего домена по настоящему изобретению не содержит модификаций в CDR-участках, но содержит одну или несколько модификаций в каркасных участках. Такие варианты характеризуются по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с последовательностями, раскрытыми в данном документе, и, согласно ожиданиям, они сохраняют специфичность связывания LAG-3. Таким образом, в определенных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен в мультиспецифической связывающей молекуле по настоящему изобретению содержит следующее:

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 11, где переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 74, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 75, и аминокислотную последовательность HCDR3 с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 76;

- вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 12, где вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 77, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 78, и аминокислотную последовательность HCDR3 с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 79;

- вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 13, где вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 80, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 81, и аминокислотную последовательность HCDR3 с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 82;

- вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14, где вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 83, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 84, и аминокислотную последовательность HCDR3 с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 85;

- вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее

предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15, где переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 86, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 87, и аминокислотную последовательность HCDR3 с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 88;

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 16, где переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 89, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 90, и аминокислотную последовательность HCDR3 с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 91; или

- переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 17, где переменный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, которая изложена под SEQ ID NO: 92, аминокислотную последовательность HCDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 93, и аминокислотную последовательность HCDR3 с аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 94.

В определенных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению дополнительно содержит переменный участок легкой цепи. Примером подходящего переменного участка легкой цепи является переменный участок легкой цепи, описанный в данном документе,

например, переменный участок легкой цепи, описанный в данном документе для PD-1-связывающего домена по настоящему изобретению. Можно применять переменные участки легкой цепи антител к LAG-3, доступные в данной области техники, или любой другой переменный участок легкой цепи, который можно легко получить, такой как, например, из библиотеки дисплея антител, по проявлению антигенсвязывающей активности в паре с LAG-3-связывающим доменом по настоящему изобретению. Предпочтительно, LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению содержит переменный участок легкой цепи VK1-39/JK1, VK1-39/JK5, VK3-15/JK1, VK3-20/JK1 или VL3-21/JL3.

В определенных вариантах осуществления связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению может дополнительно содержать участок CH1 и CL. Можно применять любой домен CH1, в частности домен CH1 человека. Примером подходящего домена CH1 является аминокислотная последовательность, представленная под SEQ ID NO: 29. Можно применять любой домен CL, в частности CL человека. Примером подходящего домена CL является аминокислотная последовательность, представленная под SEQ ID NO: 71.

В определенных вариантах осуществления для получения мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению раскрываемый в данном документе PD-1-связывающий домен можно комбинировать с любым раскрываемым в данном документе LAG-3-связывающим доменом. Таким образом, настоящим изобретением также предусмотрены мультиспецифические связывающие молекулы PB1-PB35, которые представлены в таблице 1.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, и

- LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, и

- LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 12.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, и

- LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 13.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, и

- LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, и

- LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 5, и

- LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи

(HCDR3) варибельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) варибельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 7, и

- LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) варибельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 17.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) варибельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 8, и

- LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) варибельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 17.

	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17
SEQ ID NO: 1	PB1	PB2	PB3	PB4	PB5	PB6	PB19

SEQ ID NO: 6	PB7	PB8	PB9	PB10	PB11	PB12	PB20
SEQ ID NO: 5	PB13	PB14	PB15	PB16	PB17	PB18	PB21
SEQ ID NO: 7	PB22	PB23	PB24	PB25	PB26	PB27	PB28
SEQ ID NO: 8	PB29	PB30	PB31	PB32	PB33	PB34	PB35

Таблица 1. Связывающие молекулы, содержащие комбинации переменных участков тяжелой цепи, специфичных в отношении PD-1, и переменных участков тяжелой цепи, специфичных в отношении LAG-3. Каждый из PB1-PB35 можно комбинировать с раскрываемой в данном документе легкой цепью

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, и

- LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15,

где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 60, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 61, и CDR3 легкой цепи (LCDR3),

характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 62.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) варибельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, и

- LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) варибельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 12,

где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 60, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 61, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 62.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) варибельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, и

- LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи

(HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 13, где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 60, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 61, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 62.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, и

- LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14,

где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 60, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 61, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 62.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, и

- LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15,

где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 60, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 61, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 62.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 5, и

- LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14,

где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 60, CDR2 легкой цепи

(LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 61, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 62.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) варибельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 7, и

- LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) варибельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 17,

где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 60, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 61, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 62.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) варибельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 8, и

- LAG-3-связывающий домен по настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 17,

где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 60, CDR2 легкой цепи (LCDR2), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 61, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), характеризующийся аминокислотной последовательностью CDR2, которая изложена под SEQ ID NO: 62.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, и

- связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, и

- связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 12.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, и
- связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 13.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, и
- связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, и
- связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 5, и

- связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 7, и

- связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 17.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 8, и

- связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 17.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, и

- связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15;

где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, и

- связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 12,

где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, и

- связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 13,

где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, и

- связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14,

где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, и

- связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15,

где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 5, и

- связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14,

где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 7, и

- связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 17,

где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24.

В одном варианте осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению содержит следующее:

- связывающий домен антитела к PD-1 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 8, и

- связывающий домен антитела к LAG-3 человека по настоящему изобретению, содержащий переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 17,

где PD-1-связывающий домен и LAG-3-связывающий домен содержат переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к PD-1×LAG-3 по настоящему изобретению характеризуется более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонное антитело к PD-1 человека, содержащее два переменных участка тяжелой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 34, и два переменных участка легкой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35.

Определение того, характеризуется ли мультиспецифическое антитело к PD-1×LAG-3 более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонное антитело к PD-1 человека, можно осуществить путем измерения аффинности связывания обоих антител в анализе одного типа, используя одинаковые условия анализа. Таким образом, в определенных вариантах осуществления аффинность связывания мультиспецифического антитела к PD-1×LAG-3 и аффинность связывания эталонного антитела к PD-1 человека измерены в анализе одного типа, используя одинаковые условия анализа. В определенных вариантах осуществления анализ представляет собой анализ, в

котором применяют поверхностный плазмонный резонанс (SPR) для измерения аффинности связывания, такой как биосенсорная система Biacore®, или равновесное титрование раствора (SET) (см. Friguet B et al. (1985) *J. Immunol Methods*; 77(2): 305-319, и Hanel C et al. (2005) *Anal Biochem*; 339(1): 182-184). Значения аффинности связывания мультиспецифических антител к PD-1×LAG-3, представленных в данном документе, получены с помощью способа, описанного в примере 12.

Вкратце: в примере 12 описано определение аффинности связывания в биспецифическом формате IgG с помощью метода SPR на приборе BIAcore-T200 с применением антитела к huIgG, иммобилизованного на сенсорном чипе CM5 Series S. Применяют следующие мономерные рекомбинантные антигены: huLAG-3 (huLAG-3-His, Sino Biological, каталожный № 16498-H08H), cyLAG-3 (cyLAG-3-His, Sino Biological, каталожный № 90841-C08H), huPD-1 (huPD-1-His, Sino Biological, каталожный № 10377-H08H) и cyPD-1 (cyPD-1-His, R&D Systems, каталожный № 8509-PD). Иммобилизация Fc козы к huIgG на четырех проточных каналах сенсорного чипа CM5 была осуществлена путем аминного связывания с применением 40 мкг/мл антитела, разведенного в 10 мМ ацетате, pH 5,0. Применяют следующие условия: время активации 420 секунд, время дезактивации 420 секунд, буфер для дезактивации: 1 М этаноламин, pH 8,5. Плотность иммобилизации колеблется в диапазоне от 9158 до 9428 RU. Тестируемые и контрольные антитела захватываются антителом к huIgG, иммобилизованным на сенсорном чипе CM5, при скорости потока 30 мкл/мин в течение 60 секунд. Концентрация захваченных антител составляет 20 нМ для определения аффинности к PD-1 и 10 нМ для определения аффинности к LAG-3. После этого идет период стабилизации продолжительностью 60 секунд с использованием буфера со скоростью потока 30 мкл/мин. Пятистадийные двукратные серийные разведения антигенов вводят со скоростью 30 мкл/мин в течение 60 секунд как в проточную ячейку с захваченным антителом, так и в эталонную проточную ячейку (без захваченного антитела). Концентрации антигена составляют от 80 до 25 нМ для huPD-1 и cyPD-1 и от 40 до 1,25 нМ для hu-LAG-3 и cy-LAG-3. Коррекцию по фону для буферных эффектов производят

путем введения только буфера, а для вычитания фона используют эталонную проточную ячейку. После взаимодействия между антителом и антигеном для определения скорости диссоциации проводят промывку в течение 300 секунд со скоростью 30 мкл/мин. Регенерацию между циклами осуществляют с помощью двух введений по 15 мкл 10 мМ глицина, pH 1,5, со скоростью 30 мкл/мин, после чего идет стадия стабилизации в течение 90 секунд со скоростью 90 мкл/мин. Буфер HBS-EP+ применяют для определения аффинности к PD-1, тогда как в случае LAG-3 буфер HBS-EP+ дополняют посредством NaCl до конечной концентрации 500 мМ NaCl. Результаты анализируют в программном обеспечении Biacore T200 Evaluation Software. Из необработанного сигнала в RU вычитают холостой сигнал (канал без захваченного антитела) и корректируют по фону с учетом буферных эффектов (вычитание цикла с захваченным антителом, но с буфером во втором введении вместо антигена). Для расчета скорости ассоциации (k_a), скорости диссоциации (k_d) и аффинности (KD) к набору кривых образцов применяют модель связывания 1:1 по Ленгмюру с использованием опции одновременной аппроксимации в программном обеспечении Biacore T200 Evaluation Software.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к PD-1×LAG-3 характеризуется по меньшей мере в десять раз более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонное антитело к PD-1 человека, по результатам измерения методом SPR, как описано в данном документе, например, как описано в примере 12. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к PD-1×LAG-3 характеризуется в десять - пятьдесят раз, предпочтительно в десять - сорок, десять - тридцать или в десять - двадцать раз более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека, по результатам измерения методом SPR, как описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к PD-1×LAG-3 характеризуется в десять раз более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонный связывающий домен к PD-1 человека, по результатам

измерения методом SPR, как описано в данном документе, например, как описано в примере 12.

Эталонное антитело к PD-1 человека представляет собой антитело-аналог ниволумаба, предпочтительно полученное с применением того же способа получения, что и для подлежащего сравнению мультиспецифического антитела к PD-1×LAG-3. Антитело-аналог ниволумаба характеризуется той же последовательностью варибельного участка тяжелой цепи (SEQ ID NO: 20), что и ниволумаб. Антитело-аналог ниволумаба характеризуется той же последовательностью варибельного участка легкой цепи (SEQ ID NO: 21), что и ниволумаб.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к PD-1×LAG-3 характеризуются аффинностью связывания с PD-1 человека в диапазоне приблизительно 0,1-1,0 нМ, в частности в диапазоне приблизительно 0,2-0,4 нМ, более конкретно в диапазоне приблизительно 0,32-0,34 нМ по результатам измерения методом SPR, как описано в данном документе, например, как описано в примере 12.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к PD-1×LAG-3 характеризуются аффинностью связывания с PD-1 человека в диапазоне 0,1-1,0 нМ, в частности в диапазоне 0,2-0,4 нМ, более конкретно в диапазоне 0,32-0,34 нМ по результатам измерения методом SPR, как описано в данном документе, например, как описано в примере 12.

В определенных вариантах осуществления аффинность связывания измерена с использованием мультиспецифического антитела к PD-1×LAG-3 по настоящему изобретению в бивалентном биспецифическом формате и с использованием эталонного антитела к PD-1 человека в бивалентном моноспецифическом формате IgG.

Таким образом, аффинность связывания с PD-1 человека представляет собой аффинность моновалентного связывания бивалентного биспецифического антитела к PD-1×LAG-3.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к PD-1×LAG-3 по настоящему изобретению характеризуется аффинностью связывания в диапазоне приблизительно 0,4-3,0 нМ для PD-1 яванского макака по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как описано в данном документе, например, как описано в примере 12, в бивалентном биспецифическом формате антитела. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к PD-1×LAG-3 по настоящему изобретению характеризуется аффинностью связывания в диапазоне 0,4-3,0 нМ для PD-1 яванского макака по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как описано в данном документе, например, как описано в примере 12, в бивалентном биспецифическом формате антитела. Таким образом, аффинность связывания с PD-1 яванского макака представляет собой аффинность моновалентного связывания биспецифического бивалентного антитела к PD-1×LAG-3.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к PD-1×LAG-3 по настоящему изобретению характеризуется аффинностью связывания в диапазоне приблизительно 1-2 нМ для LAG-3 человека по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как описано в данном документе, например, как описано в примере 12, в бивалентном биспецифическом формате антитела. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к PD-1×LAG-3 по настоящему изобретению характеризуется аффинностью связывания в диапазоне 1-2 нМ для LAG-3 человека по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как описано в данном документе, например, как описано в примере 12, в бивалентном биспецифическом формате антитела. Таким образом, аффинность связывания с LAG-3 человека представляет собой

аффинность моновалентного связывания бивалентного биспецифического антитела к PD-1×LAG-3.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к PD-1×LAG-3 по настоящему изобретению характеризуется аффинностью связывания в диапазоне приблизительно 0,2-0,4 нМ для LAG-3 яванского макака по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как описано в данном документе, например, как описано в примере 12, в бивалентном биспецифическом формате антитела. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к PD-1×LAG-3 по настоящему изобретению характеризуется аффинностью связывания в диапазоне 0,2-0,4 нМ для LAG-3 яванского макака по результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как описано в данном документе, например, как описано в примере 12, в бивалентном биспецифическом формате антитела. Таким образом, аффинность связывания с PD-1 яванского макака представляет собой аффинность моновалентного связывания бивалентного биспецифического антитела к PD-1×LAG-3.

В определенных вариантах осуществления мультиспецифическая связывающая молекула по настоящему изобретению является моновалентной в отношении связывания с PD-1 человека, что означает, что мультиспецифическая связывающая молекула содержит лишь один PD-1-связывающий домен по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления мультиспецифические связывающие молекулы по настоящему изобретению, моновалентные в отношении связывания с PD-1, характеризуются сопоставимой, или равной, или более высокой аффинностью связывания с PD-1, чем бивалентные моноспецифические связывающие молекулы и/или мультиспецифические связывающие молекулы, по меньшей мере бивалентные в отношении связывания с PD-1, описанные в данной области техники, в эквивалентных концентрациях. В определенных вариантах осуществления такая бивалентная моноспецифическая связывающая молекула представляет собой антитело-аналог ниволумаба, как описано в данном документе. В определенных

вариантах осуществления мультиспецифические связывающие молекулы по настоящему изобретению, моновалентные в отношении связывания с PD-1, характеризуются более высокой эффективностью, чем эталонная мультиспецифическая связывающая молекула, в эквивалентных концентрациях. В определенных вариантах осуществления такая эталонная мультиспецифическая связывающая молекула представляет собой антитело-аналог ниволумаба, как описано в данном документе.

В определенных вариантах осуществления в данном документе дополнительно предложен вектор, пригодный для получения мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления такой вектор экспрессии содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к PD-1 человека, который описан в данном документе, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к LAG-3 человека, который описан в данном документе. В определенных вариантах осуществления вектор по настоящему изобретению может дополнительно содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую участок CH1 и предпочтительно шарнирный участок, участок CH2 и CH3. В определенных вариантах осуществления вектор по настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок легкой цепи и предпочтительно участок CL. В определенных вариантах осуществления вариабельный участок легкой цепи может представлять собой вариабельный участок общей легкой цепи, как описано в данном документе.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением также предложена клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к PD-1 человека, который описан в данном документе, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок

тяжелой цепи связывающего домена антитела к LAG-3 человека, который описан в данном документе. В определенных вариантах осуществления клетка по настоящему изобретению может дополнительно содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую участок CH1 и предпочтительно шарнирный участок, участок CH2 и CH3. В определенных вариантах осуществления клетка по настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок легкой цепи и предпочтительно участок CL. В определенных вариантах осуществления вариабельный участок легкой цепи может представлять собой вариабельный участок общей легкой цепи, как описано в данном документе.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением также предложена клетка, продуцирующая мультиспецифическую связывающую молекулу, которая описана в данном документе. В определенных вариантах осуществления такая клетка может представлять собой рекомбинантную клетку, которая была трансформирована вектором по настоящему изобретению.

В определенных вариантах осуществления в данном документе дополнительно предложен способ получения варианта мультиспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению, где способ предусматривает:

- создание варианта последовательности вариабельного участка тяжелой цепи к PD-1 и/или вариабельного участка тяжелой цепи к LAG-3, которые описаны в данном документе; и

- экспрессию варианта(-ов) последовательности и вариабельного участка легкой цепи, который(-ые) описан(-ы) в данном документе, в клетке.

Способы создания вариантов последовательностей хорошо известны в данной области техники. Можно использовать случайный подход при создании вариантов последовательности или целенаправленный подход, при котором можно, например, стремиться к введению модификаций, которые могут

повысить или снизить аффинность связывания. Стандартные способы созревания аффинности доменов связывания антител широко известны в данной области техники, см., например, Tabasinezhad M. *et al.* Immunol Lett. 2019;212:106-113. Можно также стремиться к введению модификаций, которые снижают проявляемые риски, с целью получения связывающего домена или молекулы, содержащей такой связывающий домен, в большом масштабе. Можно ввести модификации, которые, вероятно, не приведут к потере специфичности связывания и/или не повлияют на аффинность связывания. Можно ли аминокислотные остатки в CDR и/или каркасных участках заменить, например, на консервативный аминокислотный остаток и без или практически без утраты специфичности и/или аффинности связывания, можно определить способами, хорошо известными в данной области техники. Экспериментальные примеры включают без ограничения, например, аланиновое сканирование (Cunningham BC, Wells JA. Science. 1989;244(4908):1081-5) и глубокое мутационное сканирование (Araza CL, Fowler DM. Trends Biotechnol. 2011;29(9):435-42). Также были разработаны вычислительные способы, которые позволяют спрогнозировать влияние модификации аминокислоты, такие как описанные в Sruthi CK, Prakash M. PLoS One. 2020;15(1):e0227621, Choi Y. et al. PLoS One. 2012;7(10):e46688 и Munro D, Singh M. Bioinformatics. 2020;36(22-23):5322-9.

В определенных вариантах осуществления в данном документе дополнительно предложены любые варианты мультиспецифических связывающих молекул, фармацевтическая композиция, содержащая любые варианты мультиспецифических связывающих молекул, нуклеиновая кислота, кодирующая вариант связывающего домена любого из указанных вариантов мультиспецифических связывающих молекул, векторы и клетки, содержащие указанные нуклеиновые кислоты, и применение указанных вариантов мультиспецифических связывающих молекул или фармацевтической композиции для лечения рака.

Фармацевтическая композиция и способы

Мультиспецифическую связывающую молекулу по настоящему изобретению можно применять в фармацевтической композиции вместе с фармацевтически приемлемым носителем для эффективного лечения заболевания, например заболевания, связанного с подавленной иммунной системой, в частности рака. Лечение предусматривает введение эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы или фармацевтической композиции нуждающемуся в этом субъекту.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула или фармацевтическая композиция, которые описаны в данном документе, для применения в терапии.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложена мультиспецифическая связывающая молекула или фармацевтическая композиция для применения при лечении заболевания, связанного с подавленной иммунной системой, в частности рака.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложен способ лечения заболевания, где способ предусматривает введение эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы или фармацевтической композиции, которые описаны в данном документе, нуждающемуся в этом индивидууму.

В определенных вариантах осуществления настоящим изобретением предложен способ лечения заболевания, связанного с подавленной иммунной системой, в частности рака, где способ предусматривает введение эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы или фармацевтической композиции, которые описаны в данном документе, нуждающемуся в этом индивидууму.

В данном документе термины «индивидуум», «субъект» и «пациент» используются взаимозаменяемо и относятся к млекопитающему, такому как человек, мышь, крыса, хомяк, морская свинка, кролик, кошка, собака, обезьяна,

корова, лошадь, свинья и др. (например, пациент, такой как человек-пациент, у которого имеется рак).

Термины «лечить», «осуществлять лечение» и «лечение» в контексте данного документа относятся к любому типу вмешательства или процесса, выполняемого на субъекте или к введению активного средства или комбинации активных средств субъекту с целью излечения заболевания или его симптома или улучшения состояния при заболевании или его симптоме. Сюда относятся обращение вспять, смягчение, облегчение, ингибирование или замедление симптома, осложнения, патологического состояния или биохимических признаков, которые связаны с заболеванием, а также предупреждение возникновения, прогрессирования, развития, ухудшения степени тяжести или повторного появления симптома, осложнения, патологического состояния или биохимических признаков, которые связаны с заболеванием.

В контексте данного документа термин «эффективное лечение» или «положительный терапевтический ответ» относится к лечению, вызывающему благоприятный эффект, например, облегчение по меньшей мере одного симптома заболевания или нарушения, например, рака. Положительный эффект может принимать форму улучшения по сравнению с исходным уровнем, в том числе улучшения по сравнению с результатами измерения или наблюдения, проведенного до начала терапии согласно данному способу. Например, благоприятный эффект может принимать форму замедления, стабилизации, остановки или обращения вспять прогрессирования рака у субъекта на любой клинической стадии, о чем свидетельствует уменьшение или устранение клинического или диагностического симптома заболевания или маркера рака. Эффективное лечение может, например, уменьшить размер опухоли, уменьшить присутствие опухолевых клеток в кровотоке, уменьшить или предупредить метастазы опухоли, замедлить или заблокировать рост опухоли и/или предупредить или задержать повторное появление или рецидив опухоли.

Термин «терапевтическое количество» или «эффективное количество» относится к количеству средства или комбинации средств, которое обеспечивает требуемый биологический, терапевтический и/или профилактический результат. Данный результат может представлять собой уменьшение, облегчение, временное облегчение, ослабление, задержку и/или смягчение одного или нескольких признаков, симптомов или причин заболевания или любого другого требуемого изменения биологической системы. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое количество представляет собой количество, достаточное для задержки развития опухоли. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое количество представляет собой количество, достаточное для предупреждения или задержки повторного появления опухоли.

Эффективное количество средства или композиции может следующее: (i) уменьшить количество раковых клеток, (ii) уменьшить размер опухоли, (iii) ингибировать, задержать, в некоторой степени замедлить и может остановить инфильтрацию раковых клеток в периферические органы, (iv) ингибировать метастазирование опухоли, (v) ингибировать рост опухоли, (vi) предупредить или задержать возникновение и/или повторное возникновение опухоли и/или (vii) избавить в некоторой степени от одного или нескольких симптомов, связанных с раком.

Эффективное количество может варьировать в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и вес подлежащего лечению индивидуума, а также способность средства или комбинации средств вызывать требуемый ответ у индивидуума.

Эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений.

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

Термин «средство» относится к терапевтически активному веществу, в данном случае к PD-1-связывающему домену по настоящему изобретению, связывающей молекуле (например, мультиспецифической связывающей молекуле, содержащей связывающий домен антитела к PD-1 человека) по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Общие термины

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

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

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

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

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

Регистрационные номера в первую очередь приведены для обеспечения дополнительного способа идентификации мишени, фактическая последовательность связанного белка может варьировать, например, по причине мутации в кодирующем гене, такой как мутация, возникающая при некоторых формах рака, или др. Сайт связывания антигена связывает антиген и ряд его вариантов, таких как варианты, которые экспрессируются некоторыми антиген-положительными иммунными или опухолевыми клетками.

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

HGNC означает номенклатурный комитет HUGO Gene. Число, идущее после аббревиатуры, представляет собой регистрационный номер, с помощью которого из базы данных HGNC можно получить информацию о гене и белке, кодируемом данным геном. Entrez Gene предоставляет регистрационный номер или идентификатор гена, с помощью которого из базы данных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации) можно получить информацию о гене или белке, кодируемом данным геном. Ensemble предоставляет регистрационный номер, с помощью которого из базы данных Ensemble можно получить информацию о гене или белке, кодируемом данным геном. Ensembl представляет собой совместный проект EMBL-EBI и Wellcome Trust Sanger Institute по разработке системы программного обеспечения, которая создает и поддерживает автоматическую аннотацию на выбранных эукариотических геномах.

Перечень фигур чертежей

На фигурах бивалентные моноспецифические антитела указаны в формате SEQ ID NO: A, где SEQ ID NO: A относится к варибельной последовательности

тяжелой цепи обоих связывающих доменов. Каждый связывающий домен моноспецифических антител содержит легкую цепь. В примерах, которые используются для иллюстрации настоящего изобретения, но не предназначены для какого-либо его ограничения, каждый связывающий домен моноспецифических антител содержит переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24, и константный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 71. Моноспецифические антитела предпочтительно представляют собой антитела IgG1, содержащие CH1, шарнирный участок, CH2 и CH3. В примерах, которые используются для иллюстрации настоящего изобретения, но не предназначены для какого-либо его ограничения, моноспецифические антитела были подвергнуты скринингу в формате IgG1, где PD-1-связывающие тяжелые цепи содержат CH1, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 29, CH2, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 72, и CH3, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 73.

Бивалентные биспецифические антитела указаны в формате SEQ ID NO: A x SEQ ID NO: B, где как SEQ ID NO: A, так и SEQ ID NO: B относятся к переменным последовательностям тяжелой цепи. Каждый связывающий домен биспецифических антител содержит легкую цепь. В примерах, которые используются для иллюстрации настоящего изобретения, но не предназначены для какого-либо его ограничения, каждый связывающий домен моноспецифических антител содержит переменный участок легкой цепи, при этом переменный участок характеризуется аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24, и константный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 71. Биспецифические антитела предпочтительно представляют собой антитела IgG1, содержащие CH1, шарнирный участок, CH2 и CH3. В примерах, которые используются для

иллюстрации настоящего изобретения, но не предназначены для какого-либо его ограничения, биспецифические антитела были подвергнуты скринингу в формате IgG1, где PD-1-связывающая тяжелая цепь содержит CH1, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 29, CH2, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 30, и CH3, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 31, а LAG-3-связывающая тяжелая цепь содержит CH1, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 29, CH2, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 32, и CH3, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 33.

Бивалентные моноспецифические антитела-аналоги ниволумаба и релатлимаба указаны в формате SEQ ID NO: A/SEQ ID NO: B, где SEQ ID NO: A относится к соответствующей последовательности тяжелой цепи, а SEQ ID NO: B относится к соответствующей последовательности легкой цепи. Бивалентные моноспецифические антитела-аналоги ниволумаба содержат два PD-1-связывающих домена. Бивалентные моноспецифические антитела-аналоги релатлимаба содержат два LAG-3-связывающих домена. Комбинация аналогов ниволумаба и релатлимаба указана в формате SEQ ID NO: A/SEQ ID NO: B + SEQ ID NO: C/SEQ ID NO: D, где SEQ ID NO: A относится к последовательности тяжелой цепи и SEQ ID NO: B относится к последовательности легкой цепи аналога одного из ниволумаба или релатлимаба, а SEQ ID NO: C относится к последовательности тяжелой цепи и SEQ ID NO: D относится к последовательности легкой цепи другого. Антитело-аналог ниволумаба применяют в формате IgG1 или IgG4, и каждый связывающий домен содержит легкую цепь. Антитело-аналог релатлимаба применяют в формате IgG1, и каждый связывающий домен содержит легкую цепь.

На фигуре 1 представлены результаты скрининга вариантов с созревшей аффинностью в анализе PD-1/PD-L1 по гену-репортеру. А) IgG, содержащие переменные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 6, сравнивали с исходным антителом, содержащим переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 9, аналогом ниволумаба (SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 22) в качестве положительного контроля и отрицательным контролем (SEQ ID NO: 23/SEQ ID NO: 24). В) IgG, содержащие переменные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, сравнивали с исходным антителом, содержащим переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 10, аналогами ниволумаба (SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 19/SEQ ID NO: 22) в качестве положительных контролей и отрицательным контролем (SEQ ID NO: 23/SEQ ID NO: 24).

На фигуре 2 представлены результаты скрининга биспецифических антител в анализе PD-1/PD-L1 по гену-репортеру. А) Биспецифические антитела, содержащие переменные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 12, а также SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 12, сравнивали с аналогом ниволумаба (SEQ ID NO: 20/SEQ ID NO: 22) в качестве положительного контроля и отрицательным контролем (SEQ ID NO: 23/SEQ ID NO: 24). В) Биспецифические антитела, содержащие переменные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 14, SEQ ID

NO: 6 и SEQ ID NO: 14, а также SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 14, сравнивали с аналогом ниволумаба (SEQ ID NO: 20/SEQ ID NO: 22) в качестве положительного контроля и отрицательным контролем (SEQ ID NO: 23/SEQ ID NO: 24). С) Биспецифические антитела, содержащие переменные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 16, а также SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 16, сравнивали с аналогом ниволумаба (SEQ ID NO: 20/SEQ ID NO: 22) в качестве положительного контроля и отрицательным контролем (SEQ ID NO: 23/SEQ ID NO: 24).

На фигуре 3 представлены результаты скрининга биспецифических антител в анализе PD-1/PD-L1 по гену-репортеру. А) Сравнение значений эффективности биспецифических антител, содержащих переменные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 5, по сравнению с аналогом 3 ниволумаба (ниволумабом*). В) Средние значения EC50 биспецифических антител, содержащих переменные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8, по сравнению с аналогом 4 ниволумаба (ниволумабом*).

На фигуре 4 представлена аффинность связывания PD-1-связывающих доменов, содержащих переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 5, в бивалентном моноспецифическом формате по сравнению с бивалентным моноспецифическим аналогом 1 ниволумаба (SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 22, в четырех экземплярах) и PD-1-связывающим доменом аналога 1 ниволумаба в составе бивалентного биспецифического антитела (SEQ ID NO: 18/SEQ ID NO: 22 x SEQ ID NO: 23/SEQ ID NO: 24).

На фигуре 5 представлены результаты скрининга биспецифических антител в анализе PD-1/LAG-3 по гену-репортеру. А) Биспецифические антитела, содержащие переменные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 15, а также SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 16, сравнивали с аналогом ниволумаба (SEQ ID NO: 20/SEQ ID NO: 22) в качестве положительного контроля, комбинацией аналога ниволумаба и аналога релатлимаба (SEQ ID NO: 20/SEQ ID NO: 22 + SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 28) и отрицательным контролем (SEQ ID NO: 23/SEQ ID NO: 24). В) Биспецифические антитела, содержащие переменные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 15, а также SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 16, сравнивали с комбинацией аналога ниволумаба и аналога релатлимаба (SEQ ID NO: 20/SEQ ID NO: 22 + SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 28), а также бивалентным моноспецифическим антителом, содержащим SEQ ID NO: 23/SEQ ID NO: 24, и аналогом мотавизумаба (SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO: 26) в качестве отрицательных контролей. С) Биспецифические антитела, содержащие переменные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 15, а также SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 16, сравнивали с комбинацией аналога ниволумаба и аналога релатлимаба (SEQ ID NO: 20/SEQ ID NO: 22 + SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 28) и отрицательным контролем (SEQ ID NO: 23/SEQ ID NO: 24).

На фигуре 6 представлены результаты скрининга биспецифических антител в анализе с применением SEB. А) Биспецифические антитела, содержащие переменные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью,

характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 15, а также SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 16, сравнивали с комбинацией аналога ниволумаба и аналога релатлимаба (SEQ ID NO: 20/SEQ ID NO: 22 + SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 28) и отрицательным контролем (SEQ ID NO: 23/SEQ ID NO: 24). В) Биспецифические антитела, содержащие переменные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 15, а также SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 16, сравнивали с комбинацией аналога ниволумаба и аналога релатлимаба (SEQ ID NO: 20/SEQ ID NO: 22 + SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 28) и отрицательным контролем (SEQ ID NO: 23/SEQ ID NO: 24). С) Биспецифические антитела, содержащие переменные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 15, а также SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 16, сравнивали с комбинацией аналога ниволумаба и аналога релатлимаба (SEQ ID NO: 20/SEQ ID NO: 22 + SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 28) и отрицательным контролем (SEQ ID NO: 23/SEQ ID NO: 24).

На фигуре 7 представлены результаты скрининга биспецифических антител в анализе бустер-эффекта на антиген. А) Биспецифические антитела, содержащие переменные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 15, а также SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 16, сравнивали с комбинацией аналога ниволумаба и аналога релатлимаба (SEQ ID NO: 20/SEQ ID NO: 22 + SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 28) и отрицательным контролем (SEQ ID NO: 23/SEQ ID NO: 24).

NO: 24). В) Биспецифические антитела, содержащие переменные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 15, а также SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 16, сравнивали с комбинацией аналога ниволумаба и аналога релатлимаба (SEQ ID NO: 20/SEQ ID NO: 22 + SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 28) и отрицательным контролем (SEQ ID NO: 23/SEQ ID NO: 24). С) Биспецифические антитела, содержащие переменные участки тяжелой цепи с созревшей аффинностью, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 15, а также SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 16, сравнивали с комбинацией аналога ниволумаба и аналога релатлимаба (SEQ ID NO: 20/SEQ ID NO: 22 + SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 28) и отрицательным контролем (SEQ ID NO: 23/SEQ ID NO: 24).

На фигуре 8 показана способность производить эффект биспецифических антител в исследовании на мышах в условиях *in vivo*. А) Способность биспецифического антитела 1 (10 мг/кг), биспецифического антитела 2 (10 мг/кг), и биспецифического антитела 3 (10 мг/кг) (фигура 8А), и биспецифического антитела 4 (10 мг/кг), и биспецифического антитела 5 (10 мг/кг) (фигура 8В) производить эффект в отношении уменьшения объема опухоли сравнивали с контрольным антителом IgG1 (10 мг/кг), контрольным антителом IgG4 (10 мг/кг), пембролизумабом (10 мг/кг), аналогом релатлимаба (10 мг/кг) и комбинацией пембролизумаба (10 мг/кг) и аналога релатлимаба (10 мг/кг). С) Процент регуляторных Т-клеток (Treg), измеренный в опухолях, полученных от мышей, обработанных биспецифическим антителом 1, биспецифическим антителом 2 или биспецифическим антителом 3 в сравнении с контрольным антителом IgG1, контрольным антителом IgG4, пембролизумабом, аналогом релатлимаба и комбинацией пембролизумаба и аналога релатлимаба. D) Процент CD8⁺ Т-клеток (левый график) и соотношение регуляторных Т-

клеток в данной популяции CD8⁺ Т-клеток (правый график), измеренный в опухолях, полученных от мышей, обработанных биспецифическим антителом 1, биспецифическим антителом 2 или биспецифическим антителом 3 в сравнении с контрольным антителом IgG1, контрольным антителом IgG4, пембролизумабом, аналогом релатлимаба и комбинацией пембролизумаба и аналога релатлимаба.

На фигуре 9 показана аффинность связывания биспецифических антител, содержащих последовательность под SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 17, а также SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 17, с PD-1 и LAG-3 человека и яванского макака в сравнении с аналогом ниволумаба (SEQ ID NO: 21/SEQ ID NO: 22) и аналогом релатлимаба (SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 28).

Настоящее изобретение проиллюстрировано в представленных далее примерах, но они не предназначены для какого-либо его ограничения.

Примеры

Пример 1. Получение связывающих доменов антитела к PD-1 человека

Связывающие домены антитела к PD-1 человека можно получить способами, известными в данной области техники, такими как, например, описанные в WO 2019/009728. Получали большую панель переменных участков тяжелой цепи путем иммунизации трансгенных мышей, характеризующихся наличием общей легкой цепи IGKV1-39 (мышей MeMo®), антигенными молекулами PD-1 человека, в том числе путем доставки различных форм ДНК, белка и клеточного антигена. Для созревания аффинности были выбраны переменные участки тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10. В результате получали 202 варианта с созревшей аффинностью, некоторые из которых были отобраны для дополнительного изучения характеристик в анализе PD-1/PD-L1 по гену-репортеру.

Пример 2. Эффективность IgG к PD-1 и отбор для получения биспецифических Ab

Для подтверждения того, что переменные участки тяжелой цепи к PD-1 с созревшей аффинностью в формате IgG по меньшей мере столь же эффективны, как и их исходные IgG, варианты с созревшей аффинностью подвергали скринингу в анализе PD-1/PD-L1 по гену-репортеру. В анализ также были включены исходные IgG к PD-1, антитело к PD-1, содержащее тяжелую цепь (SEQ ID NO: 18) и легкую цепь (SEQ ID NO: 22) ниволумаба (аналог 1 ниволумаба в форме IgG1 с подвергнутым сайленсингу Fc), и антитело к PD-1, содержащее тяжелую цепь (SEQ ID NO: 19) и легкую цепь (SEQ ID NO: 22) ниволумаба (аналог 2 ниволумаба в форме IgG4), в качестве положительных контролей, а также антитело к RSV-G, содержащее переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся последовательностью под SEQ ID NO: 23, и переменный участок легкой цепи, характеризующийся последовательностью под SEQ ID NO: 24, в качестве отрицательного контроля. Последние 2 лунки в данном вертикальном ряду оставляли без IgG в качестве контроля основного уровня.

Анализ PD-1 – PD-L1 по гену-репортеру проводили в соответствии с протоколом производителя (Promega, каталожный № J1255), который предусматривает применение двух линий клеток – клеток aAPC/CHO-K1 с PD-L1, которые представляют собой клетки CHO-K1, экспрессирующие PD-L1 человека и сконструированный белок на клеточной поверхности, предназначенный для активации родственных TCR антиген-независимым способом (Promega, каталожный № J109A), а также эффекторные клетки с PD-1: Т-клетки Jurkat, экспрессирующие PD-1 человека и ген-репортер люциферазы, управляемый элементом, чувствительным к NFAT (NFAT-RE) (Promega, каталожный № J115A).

В день 1 готовили среду для восстановления клеток с PD-L1 при комнатной температуре: 10% FBS (Sigma, каталожный № F2442) в DMEM/F12 (Life Technologies, каталожный № 21765). Необходимое количество флаконов с клетками с PD-L1 (J109A; 1 флакон на 32 подлежащих тестированию IgG) извлекали из морозильной камеры, быстро оттаивали при температуре 37°C и

клетки переносили в 50-мл пробирку. Среду для восстановления клеток медленно добавляли к клеткам, 14,5 мл/флакон, удваивая объем за минуту. Лунки планшетов с площадью лунки $\frac{1}{2}$ от стандартного размера (Corning, каталожный № 3688) заполняли данной суспензией клеток в количестве 50 мкл/лунку или посредством 50 мкл PBS (Invitrogen, каталожный № 10010). Аналитические планшеты инкубировали в течение ночи при температуре 37°C, в условиях 5% CO₂ и 95% относительной влажности.

На второй день готовили 2× концентрированный аналитический буфер: 4% FBS (Sigma, каталожный № F2442) в RPMI 1640 (набор от Promega или Life Technologies, каталожный № 21875) при комнатной температуре. 2× концентрированные растворы тестируемого и контрольного IgG готовили в PBS. Серийные разведения тестируемых и контрольных IgG также производили в PBS в планшетах с U-образным дном (Nunc, каталожный № 268152), начиная с 10 мкг/мл и выполняя 6-стадийное 4-кратное титрование. Серийные разведения IgG положительного и отрицательного контроля готовили в PBS на отдельных планшетах с глубокими лунками (Greiner Bio-one, каталожный № 780270). Также готовили основной контроль, который представляет собой контроль без IgG. IgG, активность которых необходимо было сравнивать напрямую, инкубировали в максимально возможной степени на одном и том же планшете во избежание отклонения, возникающего при использовании различных планшетов.

Аналитические планшеты вынимали из инкубатора и стряхиванием опустошали лунки. В аналитический планшет вносили 20 мкл раствора IgG, начиная с переноса наиболее низкой концентрации IgG, за которой следовали более высокие концентрации, с помощью одних и тех же наконечников пипетки.

Требуемое количество эффекторных клеток с PD-1 (J115A: 1 флакон на 32 подлежащих тестированию IgG) извлекали из морозильной камеры, быстро оттаивали при 37°C и осторожно перемешивали посредством пипетирования вверх и вниз. Клетки из всех флаконов переносили в 50-мл пробирку. К клеткам медленно добавляли 2× концентрированный аналитический буфер (5,9 мл на

флакон с клетками) так, чтобы объем удваивался за минуту. В лунки на аналитических планшетах вносили 20 мкл суспензии эффекторных клеток. Планшеты инкубировали в течение 6 часов при температуре 37°C, в условиях 5% CO₂ и 95% относительной влажности. После 6-часовой инкубации планшеты предварительно инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин.

Люциферазную активность измеряли с применением системы для люциферазного анализа Bio-Glo™ (Promega, каталожный № G7941). Буфер для люциферазного анализа Bio-Glo™ (защищенный от света) уравнивали до комнатной температуры в течение ночи и тщательно смешивали с субстратом для люциферазного анализа Bio-Glo™. В каждую лунку аналитического планшета вносили 40 мкл люциферазы Bio-Glo и спустя 5-10 мин измеряли люминесценцию на планшет-ридере EnVision (PerkinElmer, модель 2104-0040A, режим измерения люминесценции). Показания прибора получали в значениях относительных световых единиц (RLU). Кратность индукции, которая представляет собой соотношение экспериментальной активности к контрольной активности, рассчитывали как значение RLU для IgG-X / значение RLU в лунке без IgG. Кратность индукции наносили на график в зависимости от log концентраций IgG и строили сигмовидную кривую с помощью GraphPad Prism с применением нелинейной регрессии и уравнения log(ингибитора) в зависимости от ответа (три параметра).

Результаты представлены на фигуре 1. У всех контролей наблюдали ожидаемые значения активности, и они были сходными на разных планшетах. Варианты с созревшей аффинностью были по меньшей мере столь же эффективны, как и их исходный IgG, и столь же эффективны или более эффективны, чем аналог 1 ниволумаба. Значения EC₅₀ вариантов с созревшей аффинностью и исходных антител представлены в таблице 2.

IgG, содержащий VH, характеризующийся аминокислотной последовательностью:	EC ₅₀ (нМ)	EC ₅₀ (нМ) аналог ниволумаба
---------------------------------------------------------------------------	-----------------------	-----------------------------------------------

SEQ ID NO: 1	3,81	3,47
SEQ ID NO: 2	4,49	
SEQ ID NO: 6	2,87	
SEQ ID NO: 9	5,65	
SEQ ID NO: 5	4,91	5,79
SEQ ID NO: 4	4,12	
SEQ ID NO: 3	4,20	
SEQ ID NO: 10	11,05	

Таблица 2. Значения EC50 вариантов с созревшей аффинностью и исходных антител

Для получения биспецифических антител, в которых плечо, связывающее PD-1 человека, объединено с плечом, связывающим LAG-3 человека, были выбраны три варианта к PD-1 с созревшей аффинностью. Данные три варианта к PD-1 содержат переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 1, 5 и 6, и они были объединены с шестью различными плечами антител, связывающими LAG-3 человека. Шесть плеч антител, связывающих LAG-3 человека, содержат переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 11, 12, 13, 14, 15 и 16. Полученные восемнадцать биспецифических антител тестировали на связывание с PD-1 человека и LAG-3 человека с помощью FACS.

Пример 3. FACS-анализ

Связывание биспецифических антител анализировали с помощью FACS с применением линий клеток, стабильно трансфицированных LAG-3 человека или LAG-3 макака-резуса или временно трансфицированных PD-1 человека или PD-1 яванского макака. С этой целью клетки 293FF подвергали временной трансфекции экспрессирующими конструкциями pVAX, кодирующими PD-1 человека и PD-1 яванского макака, и клетки 293FF подвергали стабильной

трансфекции экспрессирующими конструкциями pVAX, кодирующими LAG-3 человека и LAG-3 макака-резуса. Специфическое связывание IgG измеряли с помощью FACS с применением 8-стадийного 5-кратного разведения, начиная с 50 мкг/мл. В качестве вторичного детектирующего антитела применяли конъюгированное с PE антитело козы к антителам человека. В качестве отрицательных аналитических контролей включали клетки без окрашивания или только с вторичными детектирующими антителами. В качестве положительного контроля применяли бивалентное моноспецифическое антитело к PD-1, содержащее тяжелые цепи, характеризующиеся последовательностью под SEQ ID NO: 18, и легкие цепи, характеризующиеся последовательностью под SEQ ID NO: 22 (аналог 1 ниволумаба), а также бивалентное моноспецифическое антитело к LAG-3, содержащее тяжелые цепи, характеризующиеся последовательностью под SEQ ID NO: 27, и легкие цепи, характеризующиеся последовательностью под SEQ ID NO: 28 (25F7/аналог релатлимаба), о которых известно, что в данном анализе они связывают соответственно PD-1 и LAG-3. В качестве отрицательного контроля применяли бивалентное моноспецифическое антитело к RSV-G, содержащее переменные участки тяжелой цепи, характеризующиеся последовательностью под SEQ ID NO: 23, и переменный участок легкой цепи, характеризующийся последовательностью под SEQ ID NO: 24 (изотипический контроль в форме IgG1 с подвергнутому сайленсингу Fc).

Положительный и отрицательный контроли вели себя так, как и ожидалось. Все биспецифические антитела связывались с LAG-3 человека и LAG-3 макака-резуса. Все биспецифические антитела также связывались с PD-1 человека и PD-1 яванского макака.

Пример 4. Анализ PD-1/PD-L1 по гену-репортеру

Биспецифические антитела подвергали скринингу с помощью анализа PD-1/PD-L1 по гену-репортеру согласно протоколу, описанному в примере 2.

Биспецифические антитела 6-кратно разводили за 6 стадий, начиная с конечной концентрации 100 мкг/мл, и тестировали в двух повторностях. Разведения IgG

производили в PBS. В качестве положительного контроля включали 6-стадийное 6-кратное титрование бивалентного моноспецифического антитела к PD-1, содержащего тяжелые цепи, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 20, и легкие цепи, характеризующиеся последовательностью под SEQ ID NO: 22 (аналог 3 ниволумаба в форме IgG4), начиная со 100 мкг/мл (конечная концентрация). В качестве изотипического контроля для биспецифических антител к PD-1×LAG-3 применяли 4-стадийное 6-кратное титрование бивалентного моноспецифического антитела, связывающегося с RSV-G, содержащего переменные участки тяжелой цепи, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 23, и переменные участки легкой цепи, характеризующиеся последовательностью под SEQ ID NO: 24 (изотипический контроль в форме IgG1 с подвергнутым сайленсингу Fc), начиная со 100 мкг/мл (конечная концентрация). Последние две лунки в вертикальном ряду изотипического контроля оставляли без IgG в качестве контроля основного уровня. Антитела инкубировали в течение 6 часов при температуре 37°C, в условиях 5% CO₂, 95% относительной влажности. Добавляли люциферазу Bio-Glo и измеряли люминесценцию на планшет-ридере Envision (PerkinElmer). Кратность индукции, индуцированной каждым антителом, рассчитывали относительно лунок, не содержащих антитело (основного уровня).

Если антитело блокирует ось PD-1/PD-L1, это избавляет от ингибирования сигнала TCR. Затем сигнал TCR становится активным и приводит к транскрипции генов и появлению люциферазной активности. Люциферазная активность коррелирует со связыванием антител и блокировкой оси.

Результаты представлены на фиг. 2. Положительный и отрицательный контроли ведут себя так, как ожидалось. У всех биспецифических антител наблюдается блокировка оси PD-1/PD-L1.

На фиг. 3А представлены результаты сравнения активности в анализе по гену-репортеру люциферазы между тремя биспецифическими антителами и эталонным антителом к PD-1, представляющим собой аналог 3 ниволумаба. Эффективность биспецифического антитела, содержащего PD-1-связывающий домен с варибельным участком тяжелой цепи, характеризующимся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6, схожа с эффективностью эталонного антитела к PD-1. Таким образом, данное биспецифическое антитело с единственным PD-1-связывающим доменом достигает схожей эффективности, что и в случае эталонного антитела, которое является бивалентным по связыванию с PD-1.

Эффективность двух дополнительных биспецифических антител также оценивали в анализе PD-1/PD-L1 по гену-репортеру и сравнивали с бивалентным моноспецифическим антителом к PD-1, содержащим тяжелые цепи, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 21, и легкие цепи, характеризующиеся последовательностью под SEQ ID NO: 22 (аналог 4 ниволумаба). Анализ повторяли дважды с каждым образцом в трех повторностях. Средние значения EC50 представлены на фиг. 3В.

PD-1-связывающие домены, характеризующиеся последовательностью под SEQ ID NO: 1, 5 и 6, тестировали методом SPR в бивалентном моноспецифическом формате для определения аффинности связывания с PD-1 и сравнивали с аналогом эталонного антитела ниволумаб. По результатам предыдущих исследований было видно, что аффинность связывания с PD-1 схожа у данных PD-1-связывающих доменов в бивалентном моноспецифическом формате и биспецифическом формате. Аффинность связывания аналога ниволумаба определяли в бивалентном моноспецифическом формате и биспецифическом формате, моновалентном в отношении PD-1 (PD-1xRSV).

Эксперименты методом SPR проводили с применением прибора Biacore 8K (GE Healthcare) при температуре 25°C. Рабочий буфер для SPR (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества

P20, pH 7,4) готовили из 10× буфера HBS-EP (GE Healthcare). Антитела к Fc человека (GE Healthcare) иммобилизовали посредством аминного связывания на всех шестнадцати проточных ячейках сенсорного чипа CM5 Series S (GE Healthcare). Уровни иммобилизации составляют ~9000 RU для всех проточных ячеек. Требуемого уровня захвата (100-150 RU) антител к PD-1 достигали путем пропускания соответствующей концентрации антител к PD-1 через активную проточную ячейку каждого канала в течение 60 секунд со скоростью потока 10 мкл/мин. Затем в течение 240 секунд (время ассоциации) вводили серию концентраций трехкратного серийного разведения PD-1 (всего 7 концентраций, наиболее высокая на уровне 300 нМ), приготовленную из исходного раствора PD-1 (8986-PD от R&D) и рабочего буфера (концентрация 0), сразу после этого вводили рабочий буфер в течение 480 секунд (время диссоциации) при скорости потока 45 мкл/мин. Поверхность регенерировали 30-секундным введением 3 М MgCl₂ со скоростью потока 30 мкл/мин. Кинетику связывания и параметры аффинности получали путем глобальной аппроксимации данных к модели связывания 1:1.

Результаты представлены на фиг. 4. PD-1-связывающие домены трех биспецифических антител характеризуются по меньшей мере в десять раз более высокой аффинностью связывания с PD-1, чем аналог ниволумаба в обоих форматах антител.

Пример 5. Анализ PD-1/LAG-3 по гену-репортеру

Клетки Raji с PD-L1 (Promega, каталожный № CS1978B03) готовили путем суспендирования клеток в среде для анализа (1% hiFBS (Gibco, Gibco/Thermo Fisher, каталожный № 10270106) в RPMI 1640 (+25 мМ HEPES). (Life Technologies, каталожный № 52400) при комнатной температуре) до достижения 2 миллионов клеток/мл. Эффекторные клетки Jurkat с PD-1 и LAG-3 (Promega, каталожный № CS1978B02) готовили путем суспендирования клеток в среде для анализа до достижения концентрации 4 миллионов клеток/мл. 3X концентрированные растворы тестируемого и контрольного IgG готовили в PBS,

т. е. путем 6-кратного серийного разведения, начиная с 6-300 мкг/мл, с коэффициентом разведения от 2 до 10 (конечная концентрация для анализа, начиная с 20-100 мкг/мл).

Поскольку данный анализ может быть очень чувствительным к применяемой партии FBS, перед выполнением анализа партию FBS следует валидировать.

Аналитические планшеты заполняли посредством 25 мкл эффекторных клеток Jurkat с PD-1 и LAG-3 или PBS. Вносили 25 мкл раствора тестируемого и контрольного IgG. IgG, активность которых необходимо было сравнивать напрямую, нужно было инкубировать в максимально возможной степени на одном и том же аналитическом планшете во избежание влияния отклонения, возникающего при использовании различных планшетов (планшетных эффектов).

Равный объем суспензии клеток Raji с PD-L1 смешивали с таким же объемом раствора SED (100 нг/мл стафилококкового энтеротоксина D (Toxin Technologies, каталожный № PD303) в среде для анализа). В аналитические планшеты вносили 25 мкл смеси Raji/SED.

Аналитические планшеты инкубировали в течение 6 часов при температуре 37°C, в условиях 5% CO₂ и 95% относительной влажности.

После 6 часов инкубации аналитические планшеты оставляли при комнатной температуре на 10 минут. В лунки вносили 75 мкл люциферазы Steady-Glo (Promega, каталожный № E2510) и через 5-10 минут измеряли люминесценцию на планшет-ридере Envision (в соответствии с протоколом по измерению люминесценции; PerkinElmer, модель 2104-0020A).

Кратность индукции, индуцированной каждым антителом, рассчитывали относительно лунок, не содержащих IgG.

IgG сравнивали с положительным контролем и с комбинацией бивалентного моноспецифического антитела к PD-1, которое представляет собой аналог

ниволумаба 3, и бивалентного моноспецифического антитела к LAG-3 25F7/аналога релатлимаба, с наиболее высокой концентрацией 50 мкг/мл + 50 мкг/мл. Все IgG тестировали в трех повторностях.

Результаты представлены на фиг. 5. Положительный и отрицательный контроли вели себя так, как и ожидалось. Все биспецифические антитела были более эффективными в повышении ингибирующей активности путей с участием PD-1 и LAG-3, чем комбинация эталонных антител к PD-1 и к LAG-3. Процент площади под кривой (AUC) относительно положительного контроля и значения EC50 представлены в таблице 3.

Пример 6. Анализ с применением SEB

IgG тестировали с помощью 6-стадийного титрования с 7-кратными разведениями, начиная с 50 мкг/мл (конечной концентрации). Разведения IgG готовили при 4× конечной концентрации в среде для анализа. В качестве положительного контроля включали комбинацию бивалентного моноспецифического антитела к PD-1, которое представляет собой аналог ниволумаба 3, и бивалентного моноспецифического антитела к LAG-3 25F7/аналога релатлимаба, с наиболее высокой концентрацией 25 мкг/мл + 25 мкг/мл. Все IgG тестировали в трех повторностях.

Приблизительно 200000 подвергнутых криоконсервации PBMC, о которых известно, что они отвечают на IgG к LAG-3 и к PD-1/PD-L1, инкубировали с биспецифическими и контрольными антителами и SEB в конечной концентрации 2 мкг/мл в течение 3 дней при температуре 37°C, в условиях 5% CO₂ и 90% RH. Через 3 дня собирали супернатант, разводили его в 4 раза и измеряли уровни IL-2 с помощью Lumiplex.

Анализ проводили с PBMC от двух доноров. Данные от одного донора представлены на фиг. 6. Положительный и отрицательный контроли вели себя так, как и ожидалось. Многие из биспецифических антител индуцировали высвобождение IL-2 более эффективно, чем комбинация эталонных антител к

PD-1 и к LAG-3. Значения процента площади под кривой (AUC) относительно положительного контроля представлены в таблице 3.

Пример 7. Анализ бустер-эффекта на антиген

IgG тестировали с помощью 6-стадийного титрования с 5-кратными разведениями, начиная с 10 мкг/мл (конечной концентрации). В качестве положительного контроля включали комбинацию бивалентного моноспецифического антитела к PD-1, которое представляет собой аналог ниволумаба 3, и бивалентного моноспецифического антитела к LAG-3 25F7/аналога релатлимаба, с наиболее высокой концентрацией 5 мкг/мл + 5 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля применяли 4-стадийное 5-кратное разведение антитела к RSV-G, содержащего вариабельные участки тяжелой цепи, характеризующиеся последовательностью под SEQ ID NO: 23, и вариабельные участки легкой цепи, характеризующиеся последовательностью под SEQ ID NO: 24 (изотипический контроль в форме IgG1 с подвергнутым сайленсингу Fc), начиная с 10 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля две лунки оставляли без пула пептидов. Все IgG тестировали в трех повторностях.

Приблизительно 300000 PBMC от выбранного донора, выдержанные в покое в течение ночи, инкубировали с пептидами IgG и CEFT MHC-II CD4 в конечной концентрации 1 мкг/мл в течение 6 дней при температуре 37°C, в условиях 5% CO₂ и 90% RH. Собирали супернатант для измерения уровней IFN- γ и TNF- α с помощью Luminex.

Результаты представлены на фиг. 7. Положительный и отрицательный контроли вели себя так, как и ожидалось. Многие из биспецифических антител индуцировали высвобождение IFN- γ более эффективно, чем комбинация эталонных антител к PD-1 и к LAG-3. Результаты считывания TNF- α были схожи с результатами для IFN- γ . Значения процента площади под кривой (AUC) относительно положительного контроля представлены в таблице 3.

Биспецифическо е антитело	EC50 (нМ) Анализ PD- 1/LAG-3 по гену- репортер у	AUC относительно положительного контроля Анализ PD- 1/LAG-3 по гену-репортеру	AUC относительно положительного контроля Анализ с применением SEB	AUC относительно положительного контроля Анализ бустер- эффекта на антиген TNF α IFN γ	
SEQ ID NO: 1 x SEQ ID NO: 16	17,65	194,1	109,11	142,30	199,49
SEQ ID NO: 1 x SEQ ID NO: 15	8,00	289,8	106,12	140,39	171,30
SEQ ID NO: 1 x SEQ ID NO: 14	9,96	271,3	108,89	148,39	182,43
SEQ ID NO: 1 x SEQ ID NO: 13	10,45	256,6	109,58	149,55	215,80
SEQ ID NO: 1 x SEQ ID NO: 12	10,47	259,4	112,69	117,25	145,13
SEQ ID NO: 1 x SEQ ID NO: 11	19,10	215,3	130,05	188,98	233,75
SEQ ID NO: 6 x SEQ ID NO: 16	29,04	193,3	138,48	96,69	163,30
SEQ ID NO: 6 x SEQ ID NO: 15	12,45	276,3	131,32	99,50	148,40
SEQ ID NO: 6 x SEQ ID NO: 14	17,98	246,0	145,38	106,67	164,42
SEQ ID NO: 6 x SEQ ID NO: 13	17,46	255,2	146,55	148,45	220,03
SEQ ID NO: 6 x	14,80	243,4	147,49	164,84	248,72

SEQ ID NO: 12					
SEQ ID NO: 6 x SEQ ID NO: 11	21,26	215,4	128,49	188,31	283,49
SEQ ID NO: 5 x SEQ ID NO: 16	25,35	196,7	107,50	76,28	112,08
SEQ ID NO: 5 x SEQ ID NO: 15	12,89	292,7	108,50	99,37	140,39
SEQ ID NO: 5 x SEQ ID NO: 14	19,76	262,6	130,52	123,36	117,94
SEQ ID NO: 5 x SEQ ID NO: 13	16,06	270,5	114,93	123,49	123,67
SEQ ID NO: 5 x SEQ ID NO: 12	14,66	259,6	114,64	82,22	99,02
SEQ ID NO: 5 x SEQ ID NO: 11	10,14	217,9	104,38	116,30	173,95

Таблица 3. Значения EC50 и процента AUC относительно положительного контроля для биспецифических антител, подвергнутых скринингу в анализе PD-1/LAG-3 по гену-репортеру, анализе с применением SEB и анализе бустер-эффекта на антиген

Пример 8. Исследование в условиях *in vivo*

Способность производить эффект пяти биспецифических антител к PD-1×LAG-3 оценивали на мышах с hu-CD34, несущих опухоли MDA-MB-231.

Гуманизированным CD34⁺ NSG мышам (Jackson Laboratories) подкожно инокулировали в общей сложности 3×10^6 клеток опухоли MDA-MB-231, суспендированных в 100 мкл бессывороточной культуральной среды и матригелевой матрицы (Corning) в равных объемах. При достижении размеров опухолей примерно 80-100 мм³ мышей рандомизировали на восемь групп по десять мышей в каждой группе и вводили в 1× PBS (Life Technologies)

следующее: 1) IgG1 (10 мг/кг), 2) IgG4 (10 мг/кг), 3) пембролизумаб (10 мг/кг), 4) аналог релатлимаба (10 мг/кг), 5) пембролизумаб (10 мг/кг) + аналог релатлимаба (10 мг/кг), 6) биспецифическое антитело 1 к PD-1×LAG-3 (10 мг/кг), 7) биспецифическое антитело 2 к PD-1×LAG-3 (10 мг/кг) и 8) биспецифическое антитело 3 к PD-1×LAG-3 (10 мг/кг), и в отдельном эксперименте вводили следующее: 9) биспецифическое антитело 4 к PD-1×LAG-3 (10 мг/кг) и 10) биспецифическое антитело 5 к PD-1×LAG-3 (10 мг/кг).

Биспецифическое антитело 1 к PD-1×LAG-3 содержит вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6 (PD-1), и вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 13 (LAG-3).

Биспецифическое антитело 2 к PD-1×LAG-3 содержит вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 6 (PD-1), и вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14 (LAG-3).

Биспецифическое антитело 3 к PD-1×LAG-3 содержит вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 5 (PD-1), и вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14 (LAG-3).

Биспецифическое антитело 4 к PD-1×LAG-3 содержит вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 7 (PD-1), и вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 17 (LAG-3).

Биспецифическое антитело 5 к PD-1×LAG-3 содержит переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 8 (PD-1), и переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 17 (LAG-3).

Связывающие домены биспецифических антител могут содержать CH1, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 29. PD-1-связывающая тяжелая цепь биспецифических антител может содержать CH2 и CH3, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 30 и 31 соответственно. LAG-3-связывающая тяжелая цепь биспецифических антител может содержать CH2 и CH3, характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 32 и 33 соответственно. PD-1- и LAG-3-связывающие домены могут содержать переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 24, и константный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 60.

Животным вводили дозы внутривентриально каждые пять дней в течение 20 дней (фигура 8А) или каждые пять дней в течение 34 дней (фигура 8В). Опухоли измеряли с помощью штангенциркуля, а объем опухоли рассчитывали путем приведения их к эллипсоиду по формуле: l (длина) $\times w^2$ (ширина) $\times \frac{1}{2}$. Статистическую значимость в исследовании способности производить эффект определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Значения веса тела также отслеживали на протяжении всего исследования. Опухоли собирали после обработки, микропрепарировали и расщепляли с помощью набора для диссоциации опухолей (MilteNY Biotec) в соответствии с рекомендациями производителя с последующим анализом методом проточной цитометрии.

Анализ методом проточной цитометрии

По окончании фазы *in vivo*, через 29 дней после начала обработки, опухолевые клетки анализировали с помощью анализа методом проточной цитометрии. С этой целью собирали опухоли и переносили их в 15-мл пробирку С (MilteNY Biotec), содержащую 3 мл среды DMEM. Для получения суспензии отдельных клеток для анализа методом проточной цитометрии опухоли микропрепарировали и расщепляли с помощью набора для диссоциации опухолей (MilteNY Biotec) в соответствии с инструкциями производителя. Анализ опухолевых клеток проводили с применением красителя на жизнеспособность клеток для определения живых/мертвых клеток и конъюгированных с флуорохромом антител к CD45 человека в качестве лейкоцитарного маркера. Панель для проточной цитометрии для данного исследования имеет следующий вид:

Мишень	Клоны	Флуорохром	Продавец
L/D	N/A	PE-TR	Biolegend
mCD45	30-F11	BV605	BD
hCD45	2D1	APC-H7	BD
hCD3	UCHL1	BUV395	BD
hCD4	SK3	BUV563	BD
hCD8	RPA-T8	BUV737	BD
hCD25	2A3	PE-Cy7	BD
hFoxP3	236A/E7	BB700	BD
hTim3	7D3	BV786	BD
hPD1	NAT105	BV510	Biolegend
hLag3	11C3C65	BV421	Biolegend
hTCF1	7F11A10	PE	Biolegend
hKi-67	B56	BV711	BD
hTox	REA473	APC	Miltenyi

Перед добавлением коктейля антител образцы блокировали в отношении Fc-рецептора человека и мыши в течение 10 мин при комнатной температуре.

Перед добавлением коктейля антител проводили окрашивание для определения живых/мертвых клеток при комнатной температуре в течение 15 мин. После инкубации коктейля в течение 30 мин при комнатной температуре образцы тщательно промывали и фиксировали посредством 2% PFA. Клетки прогоняли и анализировали с применением анализатора методом проточной цитометрии BD Symphony и пакета программного обеспечения FlowJo.

Результаты

Результаты представлены на фиг. 8. Все биспецифические антитела демонстрировали лучшую способность производить эффект, чем моноспецифические антитела, как в отдельности, так и в комбинации (фиг. 8A и B). После 20 дней введения доз одно исследование пришлось прекратить по причине увеличения признаков реакции «трансплантат против хозяина» в группах, которых обрабатывали биспецифическими антителами (фиг. 8A), что могло быть связано с повышенной иммунной активацией при обработке биспецифическими антителами. Однако среди остальных групп данное явление не наблюдалось.

После окончания исследования способности производить эффект опухоли подвергали диссоциации для иммунного анализа PD методом проточной цитометрии. Как уже упоминалось, была разработана и внедрена 14-цветная панель для проточной цитометрии для оценки TIL после обработки. При оценке TIL все оцениваемые биспецифические антитела демонстрировали снижение в опухолях процента Т-клеток человека, представляющих собой Treg (фигура 8C). Более того, все оцениваемые биспецифические антитела демонстрировали повышенное соотношение CD8⁺/Treg в опухоли (фигура 8D).

Пример 12. Характеристики связывания

Аффинность связывания и одновременное связывание биспецифических антител определяли методом SPR.

Аффинность связывания биспецифических антител к PD-1 человека, PD-1 яванского макака, LAG-3 человека и LAG-3 яванского макака определяли в формате биспецифического антитела к PD-1×LAG-3 и сравнивали с аналогами эталонных антител под названиями ниволумаб и релатлимаб.

Аффинность связывания определяли в биспецифическом формате IgG с помощью метода SPR на приборе BIAcore-T200 с применением антитела к huIgG, иммобилизованного на сенсорном чипе CM5 Series S. Также оценивали, могут ли с биспецифическими антителами одновременно взаимодействовать два человеческих белка. Аффинность связывания биспецифических антител, содержащих PD-1-связывающий домен, содержащий варибельный участок тяжелой цепи, характеризующийся последовательностью под SEQ ID NO: 7, или PD-1-связывающий домен, содержащий варибельный участок тяжелой цепи, характеризующийся последовательностью под SEQ ID NO: 8, и LAG-3-связывающий домен, содержащий варибельный участок тяжелой цепи, характеризующийся последовательностью под SEQ ID NO: 17, определяли к PD-1 человека, PD-1 яванского макака, LAG-3 человека и LAG-3 яванского макака. Аффинность связывания биспецифических антител сравнивали с аффинностью связывания аналога эталонного антитела под названием ниволумаб (SEQ ID NO: 21/ SEQ ID NO: 22) и аналога эталонного антитела под названием релатлимаб (SEQ ID NO: 27/ SEQ ID NO: 28). В качестве отрицательного контроля связывания применяли антитело к неродственной мишени.

Применяли следующие мономерные рекомбинантные антигены: huLAG-3 (huLAG-3-His, Sino Biological, каталожный № 16498-H08H), cyLAG-3 (cyLAG-3-His, Sino Biological, каталожный № 90841-C08H), huPD-1 (huPD-1-His, Sino Biological, каталожный № 10377-H08H) и cyPD-1 (cyPD-1-His, R&D Systems, каталожный № 8509-PD).

Иммобилизация

Иммобилизацию антитела козы к Fc huIgG (JIR, каталожный № 109-005-098) на четырех проточных каналах сенсорного чипа CM5 (GE Healthcare; каталожный

№ BR-1005-30) осуществляли путем аминного связывания с применением 40 мкг/мл антитела, разведенного в 10 мМ ацетате, pH 5,0. Применяли следующие условия: время активации 420 секунд, время дезактивации 420 секунд, буфер для дезактивации: 1 М этаноламин, pH 8,5. Была достигнута высокая плотность иммобилизации в диапазоне 9158-9428 RU.

Определение аффинности

Для определения аффинности тестируемые и контрольные антитела захватывали антителом к huIgG, иммобилизованным на сенсорном чипе CM5, при скорости потока 30 мкл/мин в течение 60 секунд только в одной проточной ячейке. Концентрация захваченных антител составляла 20 нМ для определения аффинности к PD-1 и 10 нМ для определения аффинности к LAG-3. После этого шел период стабилизации продолжительностью 60 секунд с использованием буфера со скоростью потока 30 мкл/мин. Пятистадийные двукратные серийные разведения антигенов вводили со скоростью 30 мкл/мин в течение 60 секунд как в проточную ячейку с захваченным антителом, так и в эталонную проточную ячейку (без захваченного антитела). Концентрации антигена составляли от 80 нМ до 2,5 нМ для huPD-1 и суPD-1 и от 40 до 1,25 нМ для hu-LAG-3 и су-LAG-3. Коррекцию по фону для буферных эффектов производили путем введения только буфера, а для вычитания фона использовали эталонную проточную ячейку.

После взаимодействия между антителом и антигеном для определения скорости диссоциации проводили промывку в течение 300 секунд со скоростью 30 мкл/мин. Регенерацию между циклами осуществляли с помощью двух введений по 15 мкл 10 мМ глицина, pH 1,5, со скоростью 30 мкл/мин, после чего шла стадия стабилизации в течение 90 секунд со скоростью 90 мкл/мин. Для подтверждения полной регенерации и сопоставимости результатов анализа в конце анализа и для всех протестированных антигенов проводили повторный цикл анализа эталонного антитела со всеми протестированными концентрациями антигена.

Буфер HBS-EP+ применяли для определения аффинности к PD-1, тогда как в случае LAG-3 буфер HBS-EP+ дополняли посредством NaCl до конечной концентрации 500 мМ NaCl во избежание неспецифического связывания.

Результаты анализировали в программном обеспечении Biacore T200 Evaluation Software. Из необработанного сигнала в RU вычитали холостой сигнал (канал без захваченного антитела) и корректировали по фону для учета буферных эффектов (вычитание цикла с захваченным антителом, но с буфером во втором введении вместо антигена). Для расчета скорости ассоциации (k_a), скорости диссоциации (k_d) и аффинности (KD) к набору кривых образцов применяли модель связывания 1:1 по Ленгмюру с использованием опции одновременной аппроксимации в программном обеспечении Biacore T200 Evaluation Software.

У захваченных биспецифических и эталонных антител наблюдали связывание с соответствующими рекомбинантными антигенами. Не наблюдали связывания антигена с антителом отрицательного контроля.

Обзор данных представлен на фигуре 9. Биспецифические антитела к PD-1×LAG-3 обладают более низкой аффинностью к LAG-3 человека, чем аналог релатлимаба, и более высокой аффинностью к PD-1 человека и яванского макака, чем аналог ниволумаба. Биспецифические антитела к PD-1×LAG-3 одновременно связываются с PD-1 человека и LAG-3 человека.

Одновременное связывание

Одновременное связывание биспецифических антител с hu-LAG-3 и huPD-1 анализировали с помощью системы, схожей с той, что использовали для определения аффинности. Для захвата биспецифических антител использовали иммобилизованное антитело к huIgG. В качестве положительного контроля включали смесь эталонных антител-аналогов ниволумаба и антител-аналогов релатлимаба, а в качестве отрицательного контроля включали антитело к неродственной мишени. Затем для того, чтобы занять все сайты связывания антигена, на 300 секунд вводили один из антигенов в насыщающей

концентрации (80 нМ в случае huPD-1 и 40 нМ в случае hu-LAG-3). Последовательно вводили второй антиген в той же концентрации, что и при введении 1, либо отдельно, либо в комбинации с первым антигеном (для обеспечения того, чтобы все сайты связывания оставались занятыми). Для предупреждения неспецифического связывания hu-LAG-3 в течение всего процесса применяли буфер с высоким содержанием солей.

Обзор данных представлен на фигуре 9. Биспецифические антитела к PD-1×LAG-3 одновременно связываются с PD-1 человека и LAG-3 человека.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO: 1 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSNGLSLG**FD****FWS**WIRQPPGRGLEWIG**YIYY**
SGSWSLNP**SFKGR**VTMSVDTSKNQFSLNLRSVTAADTAVYYCARG**GGY****TGY**
GGDW**FDP**WGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 2 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSNGLSLG**FE****FWS**WIRQPPGRGLEWIG**YIVY**
SGSHSV**PSLK**TRVTMSVDTSKNQFSLNLRSVTAADTAVYYCARG**GGY****TGHG**
GDW**FDT**WGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 3 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**RF****ALS**WVRQAPGQGLEWMG**WI**
DPNTGTPT**YAQD****FTG**RFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**SLG****YC**
GSDICYP**NGILD**NWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 4 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**RF****AVN**WVRQAPGQGLEWMG**W**
IDPNTGTPT**YAQG****VTN**RFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**SLG****Y**
CSSDICY**PNLIF**DNWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 5 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**RF****ALH**WVRQAPGQGLEWMG**W**
IDPNTGTPT**FAQG****VTG**RFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**SLG****Y**
CDSDICY**PNWIF**DNWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 6 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSDGSIG**YHFWS**WIRQPPGRGLEWIG**YIVY**
SGSYNVNPSLKTRVTMSVDTSKNQFSLNLRVTAADTAVYYCARG**GGYTGYG**
GDWFDPWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 7 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSEGSIG**YHFWS**WIRQPPGRGLEWIG**YIVYS**
GSYNVNPSLKTRVTMSVDTSKNQFSLNLRVTAADTAVYYCARG**GGYTGYG**
GDWFDPWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 8 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**REALH**WVRQAPGQGLEWMGW
IDPNTGTPFAQGVTGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**SLGY**
CDSDICYPNWIFDNWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 9 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSNGLG**FYFWS**WIRQPPGRGLEWIG**YIYY**
SGSTSFNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLNLRVTAADTAVYYCARG**GGYTGYG**
GDWFDPWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 10 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**RFTMS**WVRQAPGQGLEWMGW
INPNTGNPTYAQDFTTGRFVFSLDTSVTTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR**ILGYC**
NTDNCYPNWIFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 11 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat IMGT

QVQLQESGPGGLVRPSETLSLTCTVSGGSIS**SYSW**SWIRQPPGKGLEWIG**YIDYS**
GSTNYNPSLKSRVTISVDTSKTQFSLKLSSVSAADTAVYYCAK**DLLYKWN****YV**
EGFDIWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 12 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS**SYDTH**WVRQAPGKGLEWVA**VIS**
YDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARE**ERG****W**
DVFDIWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO: 13 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS**SYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**VI**
SYHGSDKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD**DGD****N**
WDVFDIWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO: 14 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

EVQLVQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFT**TNALN**WVRQAPGQGLEWM**GW**
INTHTGNPTYA**QGF**IGRFVFSLDTSVSTAYLQIRSLKAEDTAVYYCARE**EP****NW**
GVYFDYWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO: 15 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT**SYGIS**WVRQAPGQGLEWM**GW****I**
SAYSGNTNYA**QK****LOG**RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARD**DGS**
GWDDFDYWGQGTTLVTVSS

SEQ ID NO: 16 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT**SYGIS**WVRQAPGQGLEWMG**WI**
SAYSGNTNYAOKLOGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARG**SIL**
AAQMWGDIWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 17 – Вариабельный участок тяжелой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе Kabat

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFT**TNALN**WVRQAPGQGLEWMG**W**
INTHTGNPTYAQGFIRFVFSLDTSVSTAYLQIRSLKAEDTAVYYCARE**EPNW**
GVYFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 18 – Тяжелая цепь, аналог 1 ниволумаба

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
 WYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDY
 WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
 RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 19 – Тяжелая цепь, аналог 2 ниволумаба

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
 WYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDY
 WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNVDHKPSNTKVD
 KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQE
 DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY

KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 20 – Тяжелая цепь, аналог 3 ниволумаба

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
WYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD
KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 21 – Тяжелая цепь, аналог 4 ниволумаба

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
WYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVD
KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 22 – Легкая цепь ниволумаба

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 23 – Отрицательный контроль варибельного участка тяжелой цепи

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
SYDGSTKYSADSLKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRADDTAVYYCAKEGWSF
DSSGYRSWFDSWGQGLVT

SEQ ID NO: 24 – Отрицательный контроль варибельного участка легкой цепи

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 25 – Тяжелая цепь, аналог мотавизумаба

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTAGMSVGWIRQPPGKALEWLADI
WWDDKKHYNPSLKDRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARDMIFN
FYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPS
NTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK

SEQ ID NO: 26 – Легкая цепь, аналог мотавизумаба

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSRVGYMHWYQQKPGKAPKLLIYDTSKL
ASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYCFQGSYFPFTFGGGTKVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 27 – Тяжелая цепь, аналог релатлимаба

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIN
HRGSTNSNPSLKSRVTLSDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAFGYSDYEYN
WFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT

VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSN
TKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSQEDPEVQFNWYVDGVEV

HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSLGK

SEQ ID NO: 28 – Легкая цепь, аналог релатлимаба

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 29 – CH1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

SEQ ID NO: 30 – CH2

APELGRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAK

SEQ ID NO: 31 – CH3

GQPREPQVYTDPPSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

SEQ ID NO: 32 – CH2

APELGRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAK

SEQ ID NO: 33 – CH3

GQPREPQVYTKPPSREEMTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

SEQ ID NO: 34 – Вариабельный участок тяжелой цепи аналога ниволумаба

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
WYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDY
WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 35 – Вариабельный участок легкой цепи аналога ниволумаба

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 36 – HCDR1 согласно системе Kabat

FDFWS

SEQ ID NO: 37 – HCDR2 согласно системе Kabat

YIYYSGSWSLNPSFKG

SEQ ID NO: 38 – HCDR3 согласно системе Kabat

GGYTGYGGDWFDP

SEQ ID NO: 39 – HCDR1 согласно системе Kabat

FEFWS

SEQ ID NO: 40 – HCDR2 согласно системе Kabat

YIVYSGSHSVPSLKT

SEQ ID NO: 41 – HCDR3 согласно системе Kabat

GGYTGHGGDWFDT

SEQ ID NO: 42 – HCDR1 согласно системе Kabat

RFALS

SEQ ID NO: 43 – HCDR2 согласно системе Kabat

WIDPNTGTPTYAQDFTG

SEQ ID NO: 44 – HCDR3 согласно системе Kabat

SLGYCGSDICYPNGILDN

SEQ ID NO: 45 – HCDR1 согласно системе Kabat

RFAVN

SEQ ID NO: 46 – HCDR2 согласно системе Kabat

WIDPNTGTPTYAQGVVN

SEQ ID NO: 47 – HCDR3 согласно системе Kabat

SLGYCSSDICYPNLIFDN

SEQ ID NO: 48 – HCDR1 согласно системе Kabat

RFALH

SEQ ID NO: 49 – HCDR2 согласно системе Kabat

WIDPNTGTPTFAQGVVG

SEQ ID NO: 50 – HCDR3 согласно системе Kabat

SLGYCDSDICYPNWIFDN

SEQ ID NO: 51 – HCDR1 согласно системе Kabat

YHFWS

SEQ ID NO: 52 – HCDR2 согласно системе Kabat

YIVYSGSYNVNPSLKT

SEQ ID NO: 53 – HCDR3 согласно системе Kabat

GGYTGYGGDWFDP

SEQ ID NO: 54 – HCDR1 согласно системе Kabat

YHFWS

SEQ ID NO: 55 – HCDR2 согласно системе Kabat

YIVYSGSYNVNPSLKT

SEQ ID NO: 56 – HCDR3 согласно системе Kabat

GGYTGYGGDWFDP

SEQ ID NO: 57 – HCDR1 согласно системе Kabat

RFALH

SEQ ID NO: 58 – HCDR2 согласно системе Kabat

WIDPNTGTPTFAQGVTG

SEQ ID NO: 59 – HCDR3 согласно системе Kabat

SLGYCDSDICYPNWIFDN

SEQ ID NO: 60 – LCDR1 согласно системе IMGT

QSISSY

SEQ ID NO: 61 – LCDR2 согласно системе IMGT

AAS

SEQ ID NO: 62 – LCDR3 согласно системе IMGT

QQSYSTPPT

SEQ ID NO: 63 – Вариабельный участок легкой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе IMGT

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 64 – Вариабельный участок легкой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе IMGT

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAST
RATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQGTKVEI
K

SEQ ID NO: 65 – Вариабельный участок легкой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе IMGT

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS
RATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 66 – Вариабельный участок легкой цепи – CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты согласно системе IMGT

SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSVYWYQQKSGQAPVLVIYYYDS
RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDHWVFGGGTK
LTVL

SEQ ID NO: 67 – V-участок

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP

SEQ ID NO: 68 – V-участок

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAST
RATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWP

SEQ ID NO: 69 – V-участок

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS
RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP

SEQ ID NO: 70 – V-участок

SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSVMYQKSGQAPVLVIYYDSDR
PSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDH

SEQ ID NO: 71 – Константный участок легкой цепи

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDESTYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

SEQ ID NO: 72 – CH2

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAK

SEQ ID NO: 73 – CH3

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

SEQ ID NO: 74 – HCDR1 согласно системе Kabat

SYSWS

SEQ ID NO: 75 – HCDR2 согласно системе Kabat

YIDYSGSTNYNPSLKS

SEQ ID NO: 76 – HCDR3 согласно системе Kabat

DLLYKWNYYVEGFDI

SEQ ID NO: 77 – HCDR1 согласно системе Kabat

SYDTH

SEQ ID NO: 78 – HCDR2 согласно системе Kabat

VISYDGSNKYYADSVKG

SEQ ID NO: 79 – HCDR3 согласно системе Kabat

ERGWDVFDI

SEQ ID NO: 80 – HCDR1 согласно системе Kabat

SYGMH

SEQ ID NO: 81 – HCDR2 согласно системе Kabat

VISYHGSDKYYADSVKG

SEQ ID NO: 82 – HCDR3 согласно системе Kabat

DGDNWDVFDI

SEQ ID NO: 83 – HCDR1 согласно системе Kabat

TNALN

SEQ ID NO: 84 – HCDR2 согласно системе Kabat

WINTHTGNPTYAQQFIG

SEQ ID NO: 85 – HCDR3 согласно системе Kabat

EPNWGVYFDY

SEQ ID NO: 86 – HCDR1 согласно системе Kabat

SYGIS

SEQ ID NO: 87 – HCDR2 согласно системе Kabat

WISAYSGNTNYAQKLQG

SEQ ID NO: 88 – HCDR3 согласно системе Kabat

DGSGWDDFDY

SEQ ID NO: 89 – HCDR1 согласно системе Kabat

SYGIS

SEQ ID NO: 90 – HCDR2 согласно системе Kabat

WISAYSGNTNYAQKLQG

SEQ ID NO: 91 – HCDR3 согласно системе Kabat

GSILAAQMWGDI

SEQ ID NO: 92 – HCDR1 согласно системе Kabat

TNALN

SEQ ID NO: 93 – HCDR2 согласно системе Kabat

WINTHTGNPTYAQQFIG

SEQ ID NO: 94 – HCDR3 согласно системе Kabat

EPNWGVYFDY

Первоначально поданная формула изобретения

1. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающий домен антитела к PD-1 человека, где связывающий домен антитела к PD-1 человека характеризуется более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека, где эталонный связывающий домен антитела к PD-1 человека содержит переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 34, и переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35.
2. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающий домен антитела к PD-1 человека, где связывающий домен антитела к PD-1 человека обеспечивает сопоставимую, или равную, или более высокую эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1, чем эталонное антитело к PD-1 человека, где эталонное антитело к PD-1 человека содержит два переменных участка тяжелой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 34, и два переменных участка легкой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 35.
3. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 1 или п. 2, где связывающий домен антитела к PD-1 человека содержит по меньшей мере переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, и где переменный участок легкой цепи предпочтительно представляет собой переменный участок легкой цепи из легкой цепи, которая способна образовывать пары с множеством тяжелых цепей, характеризующихся специфичностью к различным эпитопам.
4. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 1 или п. 3, где аффинность связывания измерена методом поверхностного плазмонного резонанса.

5. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1-4, где связывающий домен антитела к PD-1 человека характеризуется по меньшей мере в десять раз более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем у эталонного связывающего домена антитела к PD-1 человека.
6. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1-4, где связывающий домен антитела к PD-1 человека характеризуется в десять раз более высокой аффинностью связывания с PD-1 человека, чем у эталонного связывающего домена антитела к PD-1 человека.
7. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1-6, где связывающий домен антитела к PD-1 человека характеризуется аффинностью связывания с PD-1 человека в диапазоне приблизительно 0,1-1,0 нМ, в частности в диапазоне приблизительно 0,3-0,8 нМ, более конкретно в диапазоне приблизительно 0,38-0,78 нМ.
8. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1 и 3-7, где аффинность связывания измерена как с использованием связывающего домена антитела к PD-1 человека, так и с использованием эталонного связывающего домена антитела к PD-1 человека в бивалентном моноспецифическом формате IgG.
9. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1 и 3-7, где аффинность связывания измерена с использованием связывающего домена антитела к PD-1 человека в бивалентном биспецифическом формате IgG и с использованием эталонного связывающего домена антитела к PD-1 человека в бивалентном моноспецифическом формате IgG.
10. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 2, 3 или 5-9, где эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1 измерена в анализе PD-1/PD-L1 или PD-1/LAG-3 по гену-репортеру.
11. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 2, 3 или 5-10, где сопоставимая эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1

представляет собой эффективность в пределах 5-кратного диапазона эффективности блокирования связывания лиганда с PD-1 эталонного антитела к PD-1 человека, включая 5-, 4-, 3- и 2-кратное отклонение от эффективности блокирования связывания лиганда с PD-1 эталонного антитела к PD-1 человека.

12. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1-11, где переменный участок тяжелой цепи содержит следующее:

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

b) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 41, соответственно;

c) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44, соответственно;

d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47, соответственно;

e) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 50, соответственно;

f) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 53, соответственно;

g) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56, соответственно; или

h) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно;

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

13. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1-12, содержащая переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 1-8, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

14. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 3-13, где связывающий домен антитела к PD-1 человека дополнительно содержит участок CH1 и CL.

15. Мультиспецифическая связывающая молекула, содержащая связывающий домен антитела к PD-1 человека, где связывающий домен антитела к PD-1 человека содержит переменный участок тяжелой цепи, где переменный участок тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1) из переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной

последовательностью из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 1-8, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) из варибельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 1-8, и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) из варибельных участков тяжелой цепи, характеризующихся аминокислотной последовательностью из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 1-8.

16. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 15, где варибельный участок тяжелой цепи содержит следующее:

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

b) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 41, соответственно;

c) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44, соответственно;

d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47, соответственно;

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

которая изложена под SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 50, соответственно;

f) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 53, соответственно;

g) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56, соответственно; или

h) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), характеризующиеся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно;

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

17. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 15 или п. 16, содержащая переменный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 1-8, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

18. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 15-17, где связывающий домен антитела к PD-1 человека дополнительно содержит участок CH1 и CL.

19. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1-18, дополнительно содержащая связывающий домен, который связывается с

молекулой на клеточной поверхности, экспрессируемой на иммунной эффекторной клетке.

20. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1-19, дополнительно содержащая связывающий домен антитела к LAG-3 человека.

21. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 20, где связывающий домен антитела к LAG-3 человека содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий следующее:

a) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 11;

b) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 12;

c) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 13;

d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 14;

e) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 15;

f) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 16;

или

g) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельного участка тяжелой цепи, характеризующегося аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 17,

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

22. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 20 или п. 21, где связывающий домен антитела к LAG-3 человека содержит вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под любым из SEQ ID NO: 11-17, или характеризующийся по меньшей мере 80%, предпочтительно 85%, более предпочтительно 90% или наиболее предпочтительно 95% идентичности последовательности с ним.

23. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 20-22, где связывающий домен антитела к LAG-3 человека дополнительно содержит вариабельный участок легкой цепи, предпочтительно вариабельный участок легкой цепи из легкой цепи, которая способна образовывать пары с множеством тяжелых цепей, характеризующихся специфичностью к различным эпитопам, в частности тот же вариабельный участок легкой цепи, что и у связывающего домена антитела к PD-1 человека.

24. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 20-23, где связывающий домен антитела к LAG-3 человека дополнительно содержит участок CH1 и CL.

25. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 15-24, где связывающая молекула обладает сопоставимой, или равной, или более высокой эффективностью блокирования связывания лиганда с PD-1, чем бивалентное моноспецифическое антитело к PD-1 человека, где бивалентное моноспецифическое антитело к PD-1 человека содержит два связывающих домена, содержащих вариабельный участок тяжелой цепи, характеризующийся

аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO: 34, и переменный участок легкой цепи, характеризующийся аминокислотной последовательностью, которая изложена под SEQ ID NO:35.

26. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 25, где эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1 измерена в анализе PD-1/PD-L1 или PD-1/LAG-3 по гену-репортеру.

27. Мультиспецифическая связывающая молекула по п. 25 или п. 26, где сопоставимая эффективность блокирования связывания лиганда с PD-1 представляет собой эффективность в пределах 5-кратного диапазона эффективности блокирования связывания лиганда с PD-1 эталонного антитела к PD-1 человека, включая 5-2-кратное, предпочтительно 5-, 4-, 3- или 2-кратное отклонение от эффективности блокирования связывания лиганда с PD-1 эталонного антитела к PD-1 человека.

28. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1-27, где связывающая молекула является моновалентной в отношении связывания с PD-1 человека.

29. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество мультиспецифической связывающей молекулы по любому из пп. 1-28 и фармацевтически приемлемый носитель.

30. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1-28 или фармацевтическая композиция по п. 29 для применения в терапии.

31. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1-28 или фармацевтическая композиция по п. 29 для применения при лечении заболевания, связанного с подавленной иммунной системой.

32. Мультиспецифическая связывающая молекула по любому из пп. 1-28 или фармацевтическая композиция по п. 29 для применения при лечении рака.

33. Способ лечения заболевания, предусматривающий введение эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы по любому из пп. 1-28 или фармацевтической композиции по п. 29 нуждающемуся в этом индивидууму.

34. Способ лечения заболевания, связанного с подавленной иммунной системой, предусматривающий введение эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы по любому из пп. 1-28 или фармацевтической композиции по п. 29 нуждающемуся в этом индивидууму.

35. Способ лечения рака, предусматривающий введение эффективного количества мультиспецифической связывающей молекулы по любому из пп. 1-28 или фармацевтической композиции по п. 29 нуждающемуся в этом индивидууму.

36. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к PD-1 человека по любому из пп. 1-28, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к LAG-3 человека по п. 21 или п. 22.

37. Вектор по п. 36, где вектор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую участок СН1 и предпочтительно шарнирный участок, участок СН2 и СН3.

38. Вектор по п. 36 или п. 37, где вектор дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую вариабельный участок легкой цепи и предпочтительно участок CL.

39. Вектор по п. 38, где вариабельный участок легкой цепи представляет собой вариабельный участок легкой цепи из легкой цепи, которая способна образовывать пары с множеством тяжелых цепей, характеризующихся специфичностью к различным эпитопам.

40. Клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к PD-1 человека по любому из пп. 1-28, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок тяжелой цепи связывающего домена антитела к LAG-3 человека по п. 21 или п. 22.

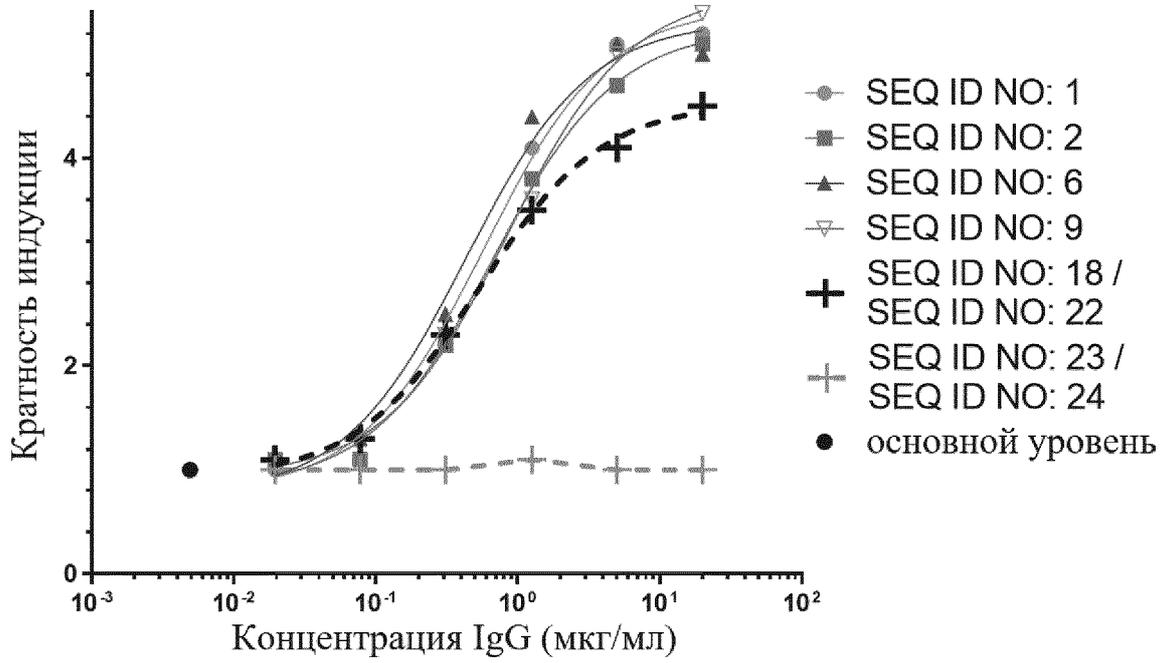
41. Клетка по п. 40, где клетка дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую участок CH1 и предпочтительно шарнирный участок, участок CH2 и CH3.

42. Клетка по п. 40 или п. 41, где клетка дополнительно содержит по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный участок легкой цепи и предпочтительно участок CL.

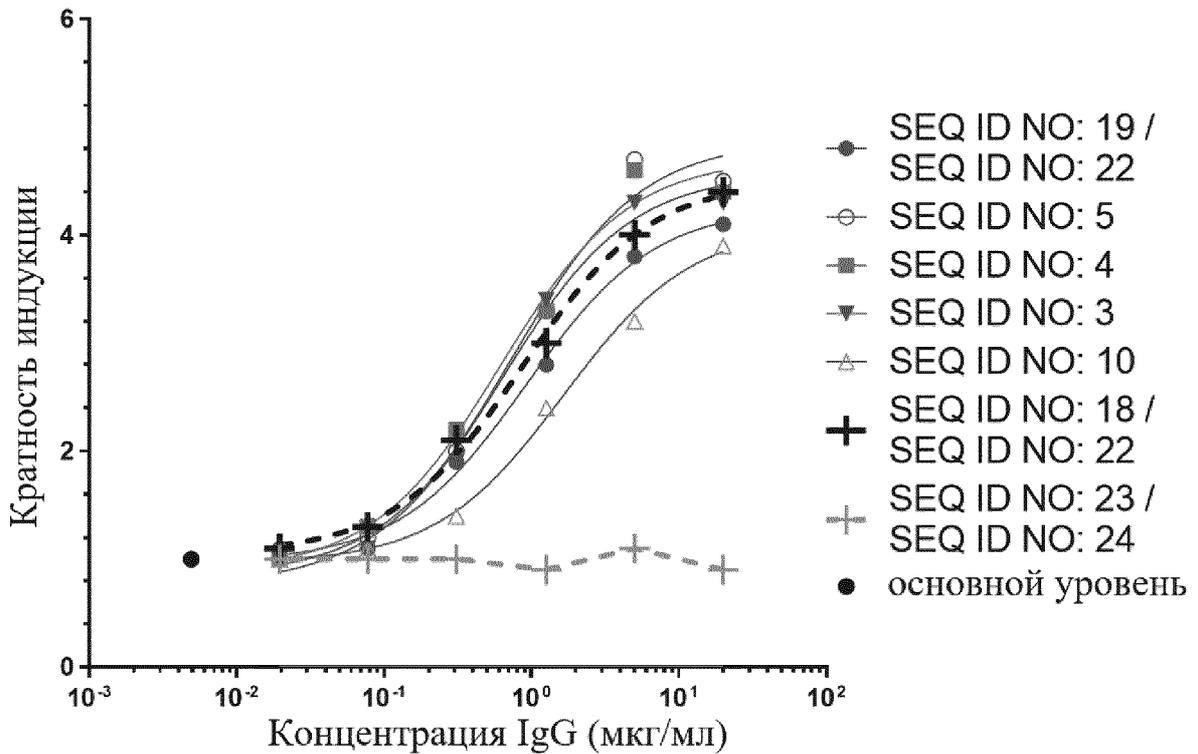
43. Клетка, продуцирующая мультиспецифическую связывающую молекулу по любому из пп. 1-28.

44. Клетка по п. 43, где указанная клетка представляет собой рекомбинантную клетку, которая была трансформирована вектором по любому из пп. 36-39.

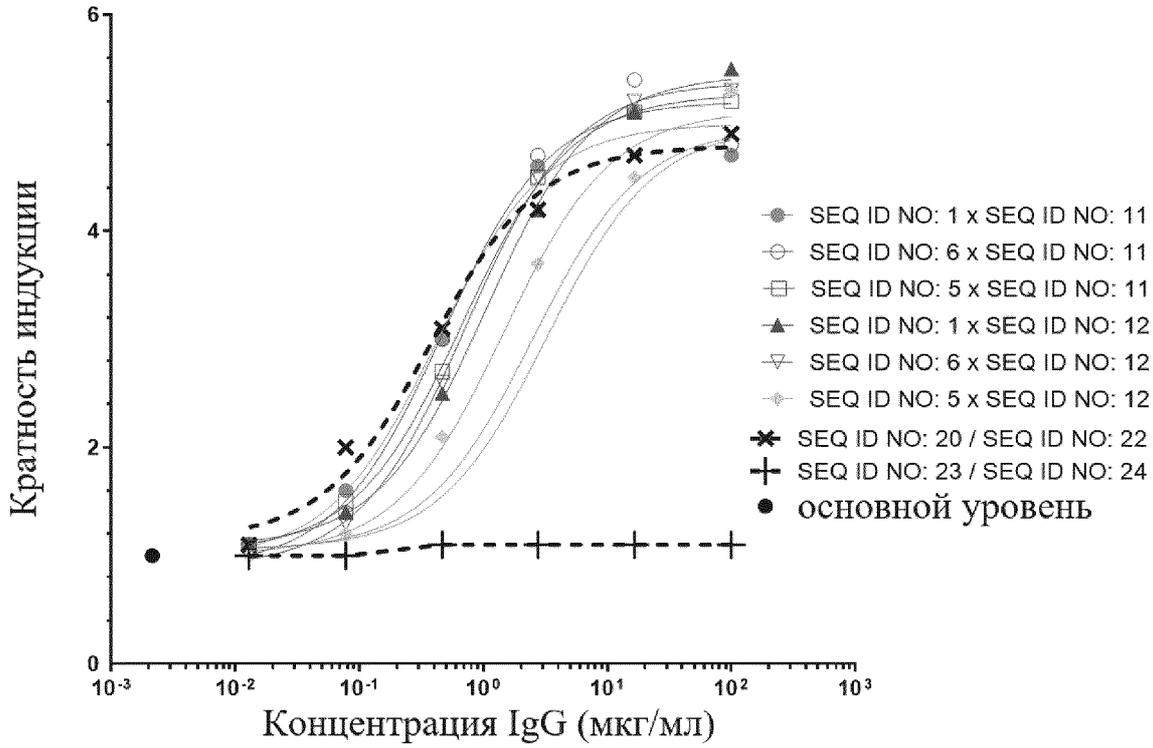
Фиг. 1А



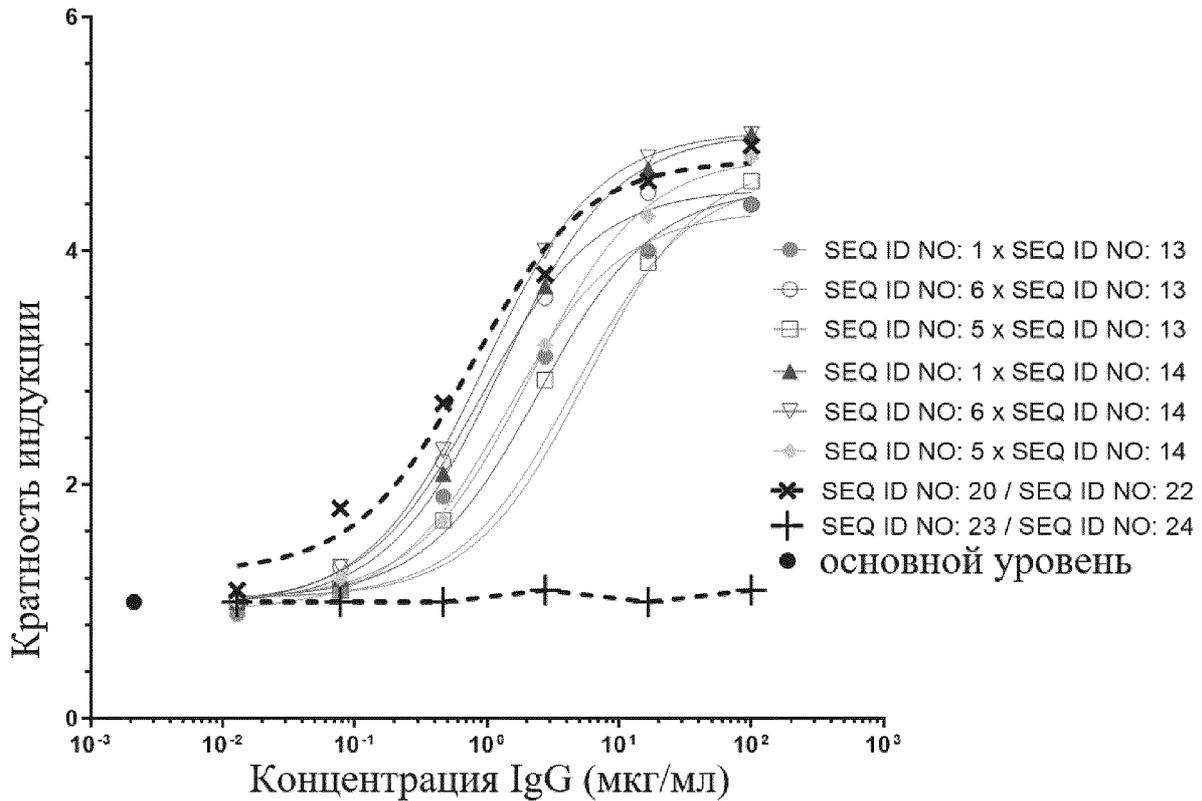
Фиг. 1В



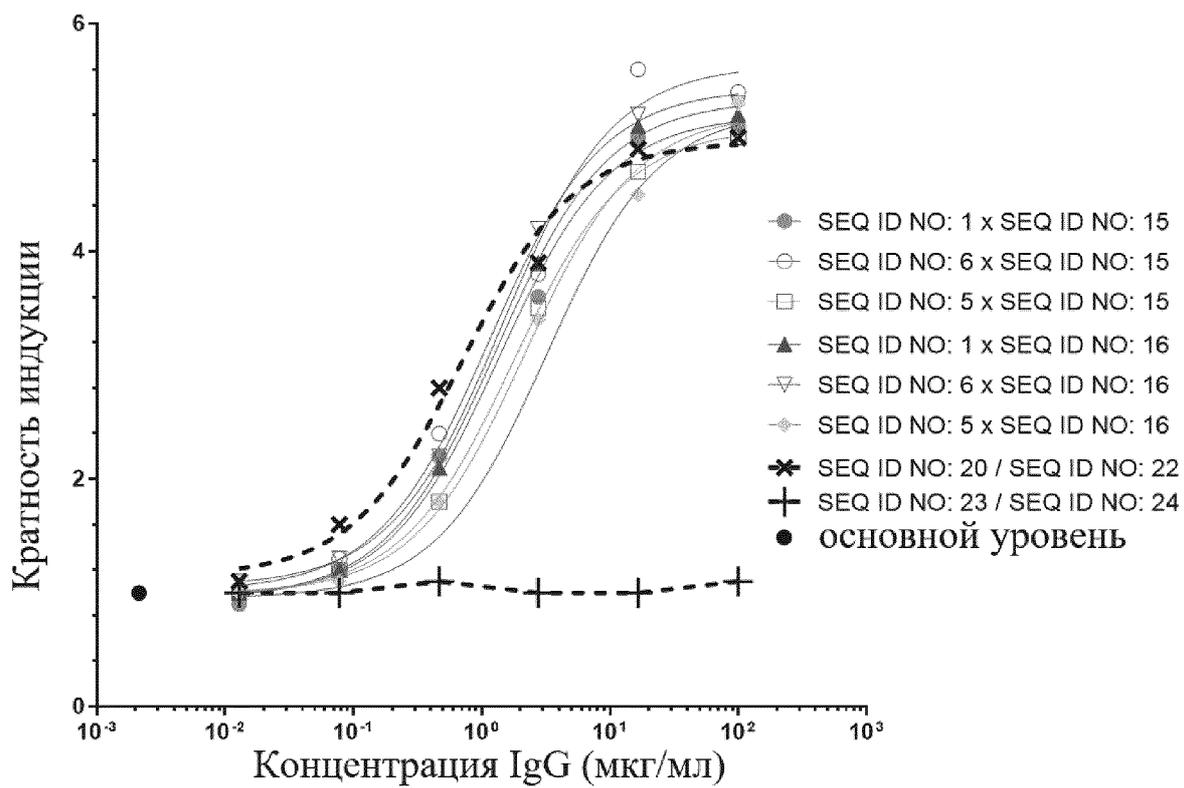
Фиг. 2А



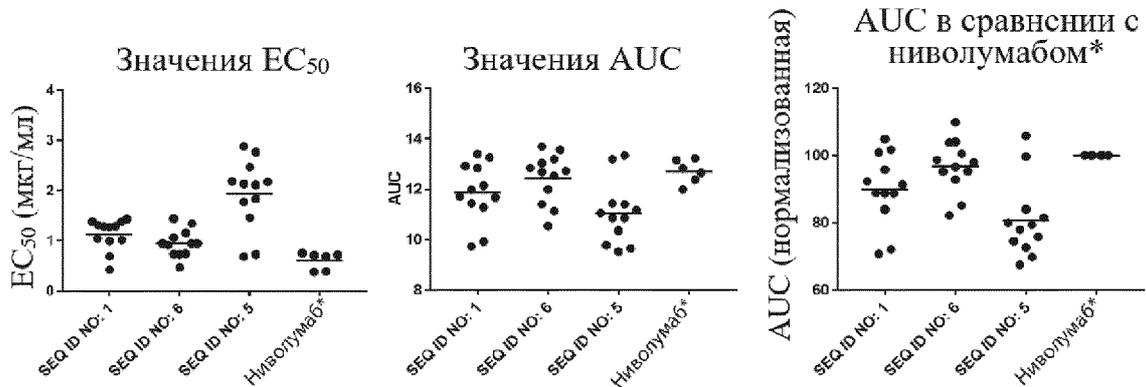
Фиг. 2В



Фиг. 2С



Фиг. 3А



Плечо к PD-1	EC ₅₀ (мкг/мл)	AUC	В сравнении с ниволумабом*
SEQ ID NO: 1	1,12	11,85	90,03
SEQ ID NO: 6	0,95	12,44	96,86
SEQ ID NO: 5	1,93	11,05	80,72
Ниволумаб *	0,61	12,70	100,00

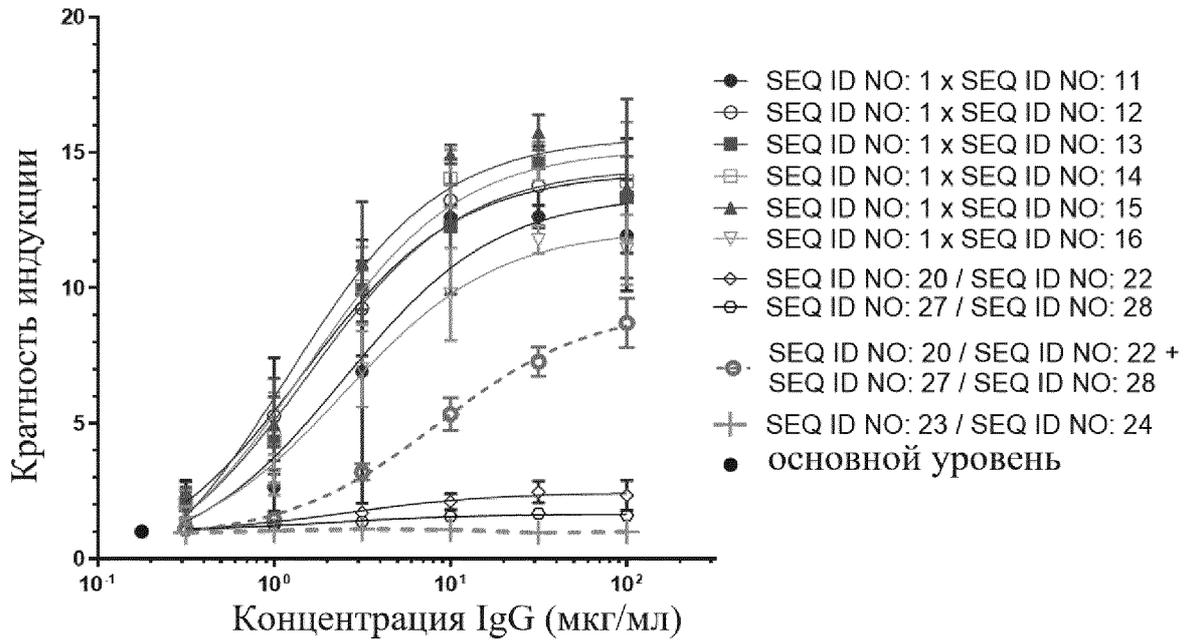
Фиг. 3В

Плечо к PD-1	EC ₅₀ (нМ)
SEQ ID NO: 7	5,41
SEQ ID NO: 8	15,02
Ниволумаб*	4,20

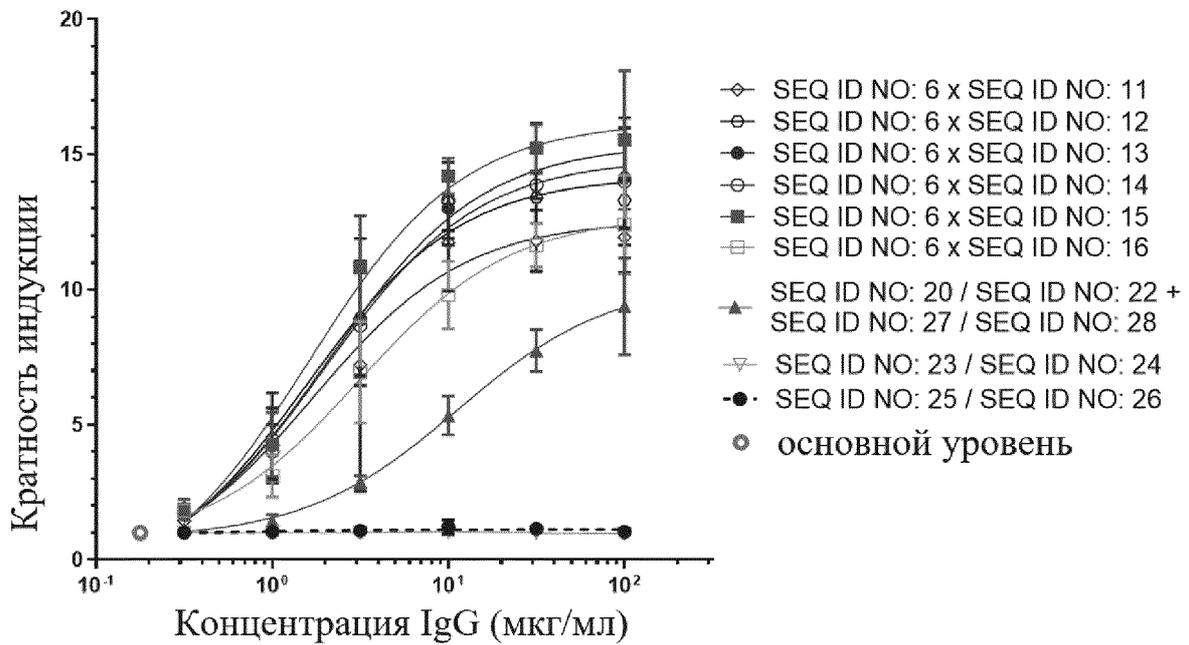
Фиг.4

IgG, содержащий PD-1-связывающий домен с SEQ ID NO:	K_{on}	K_{off}	K_D
SEQ ID NO: 1	6,67E+05	2,55E-04	3,82E-10
SEQ ID NO: 6	2,48E+05	1,93E-04	7,81E-10
SEQ ID NO: 5	3,95E+05	2,18E-04	5,51E-10
SEQ ID NO: 18 / SEQ ID NO: 22 x SEQ ID NO: 23 / SEQ ID NO: 24	2,13E+05	1,59E-03	7,49E-09
SEQ ID NO: 18 / SEQ ID NO: 22	2,16E+05	1,68E-03	7,77E-09
SEQ ID NO: 18 / SEQ ID NO: 22	2,08E+05	1,62E-03	7,78E-09
SEQ ID NO: 18 / SEQ ID NO: 22	2,07E+05	1,64E-03	7,92E-09
SEQ ID NO: 18 / SEQ ID NO: 22	1,71E+05	1,63E-03	9,54E-09

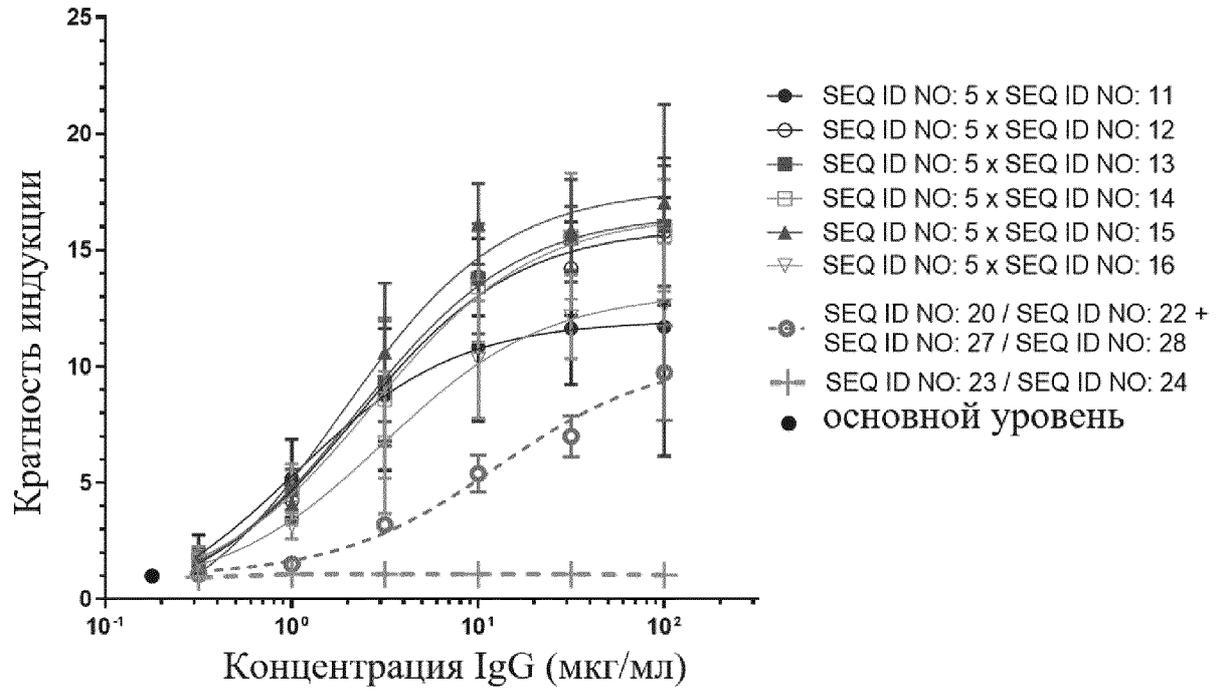
Фиг. 5А



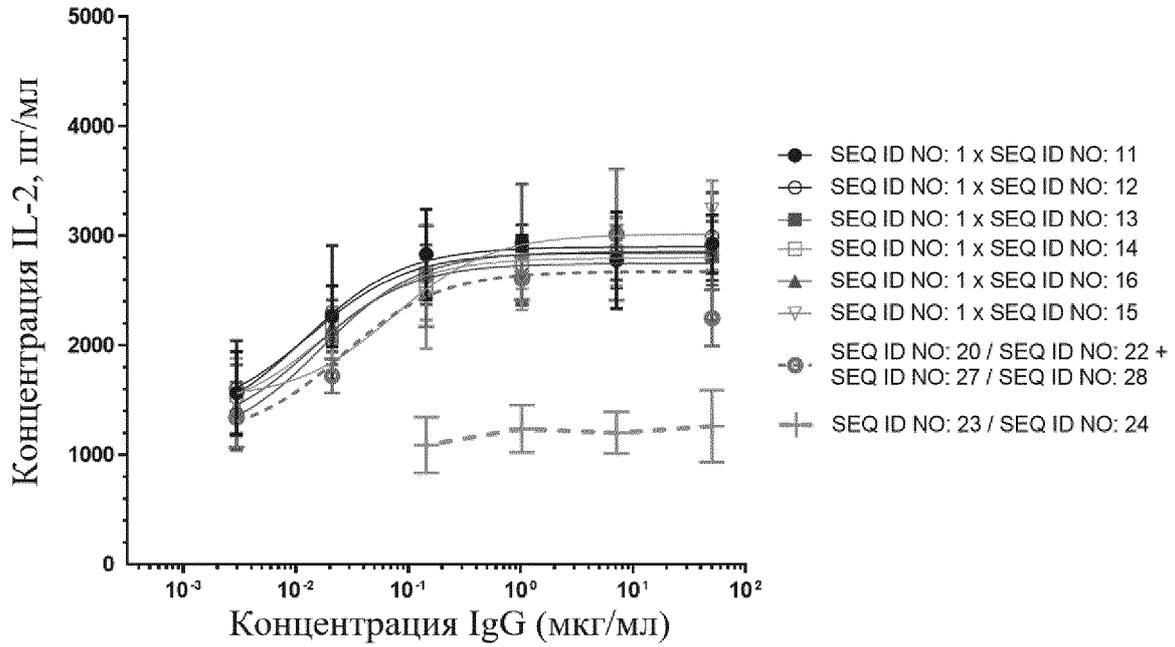
Фиг. 5В



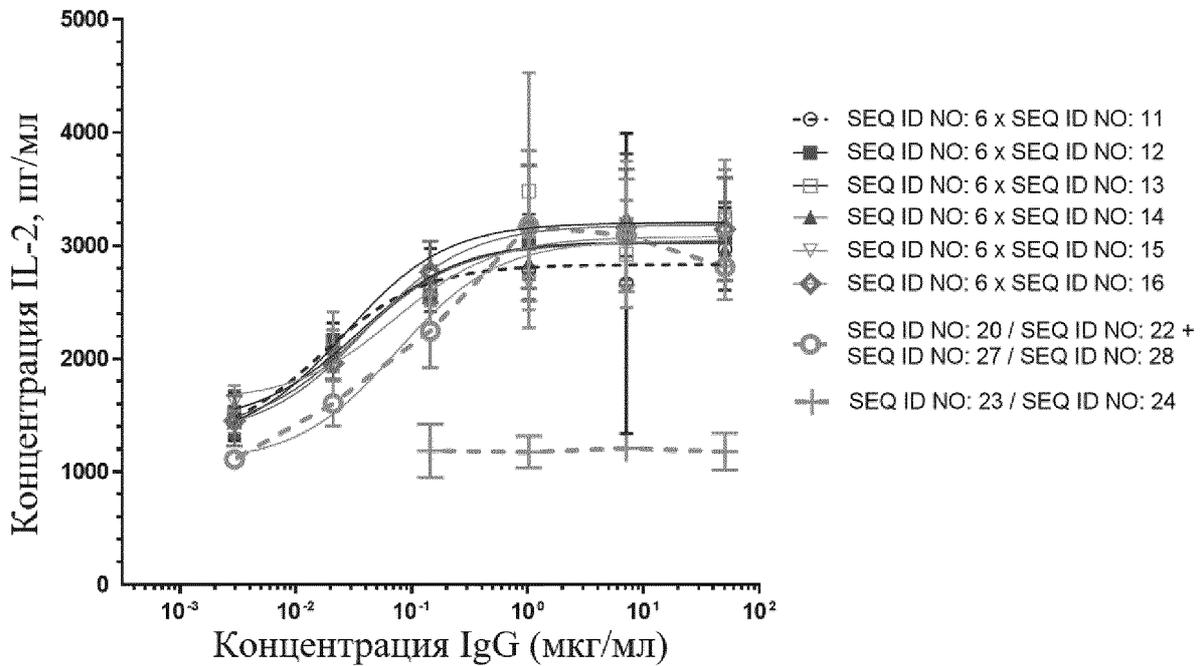
Фиг. 5С



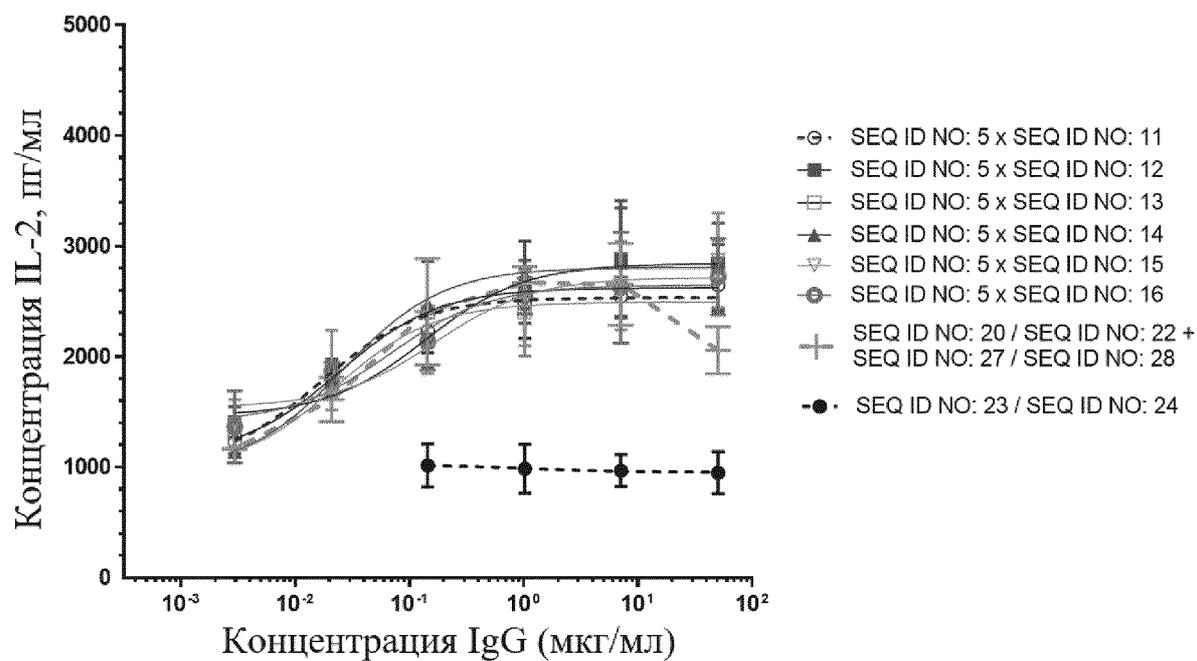
Фиг. 6А



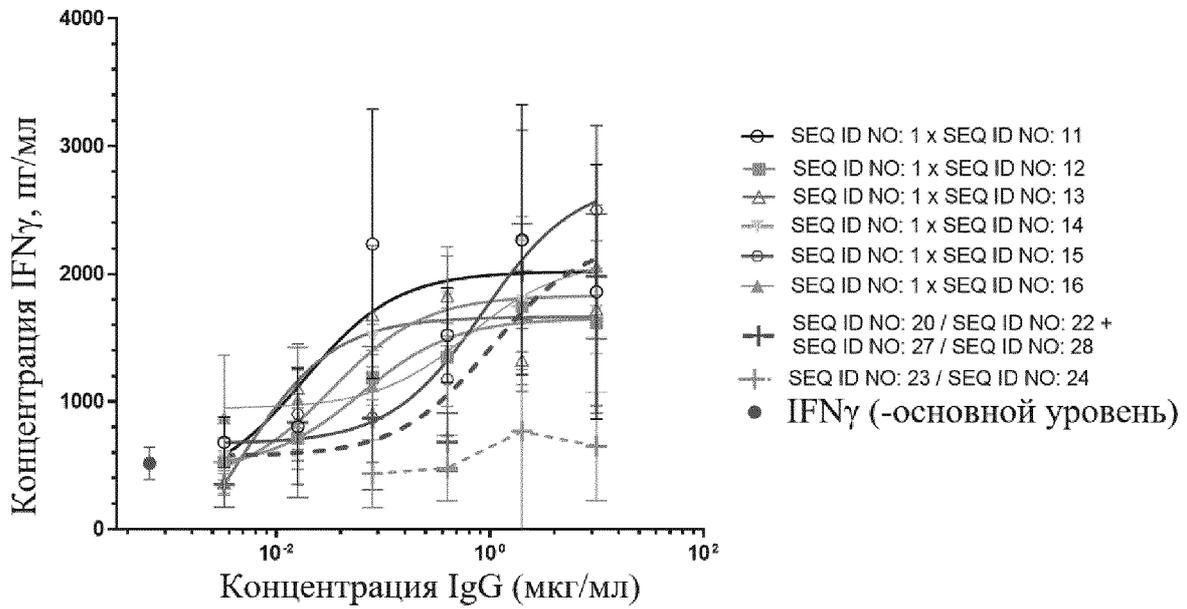
Фиг. 6В



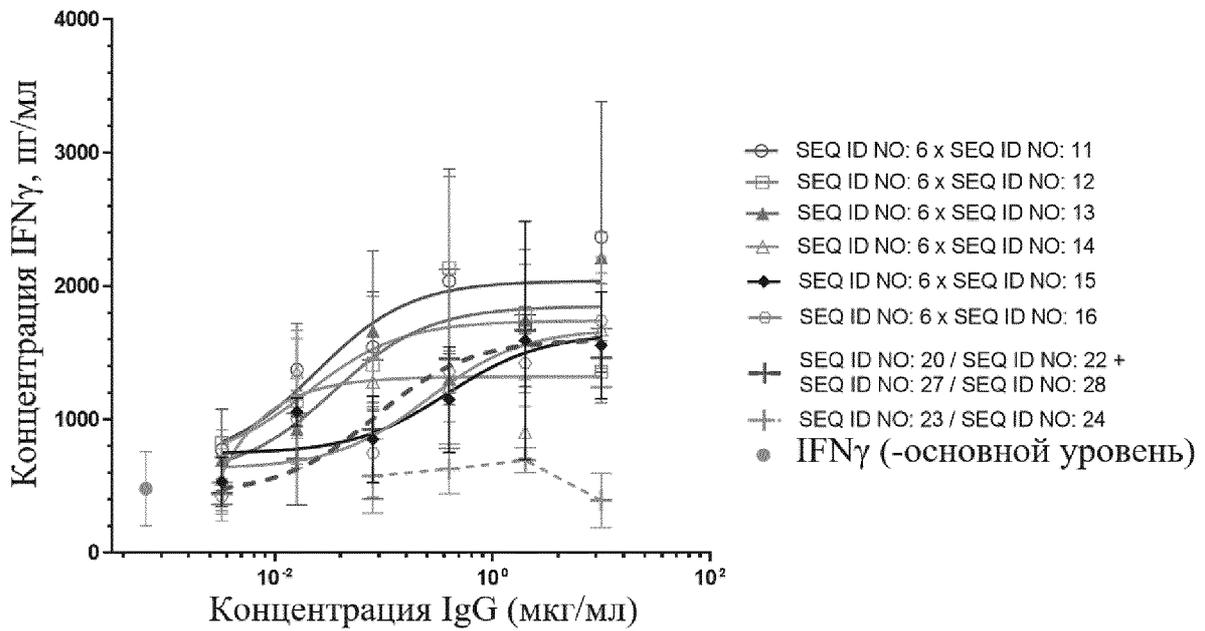
Фиг. 6С



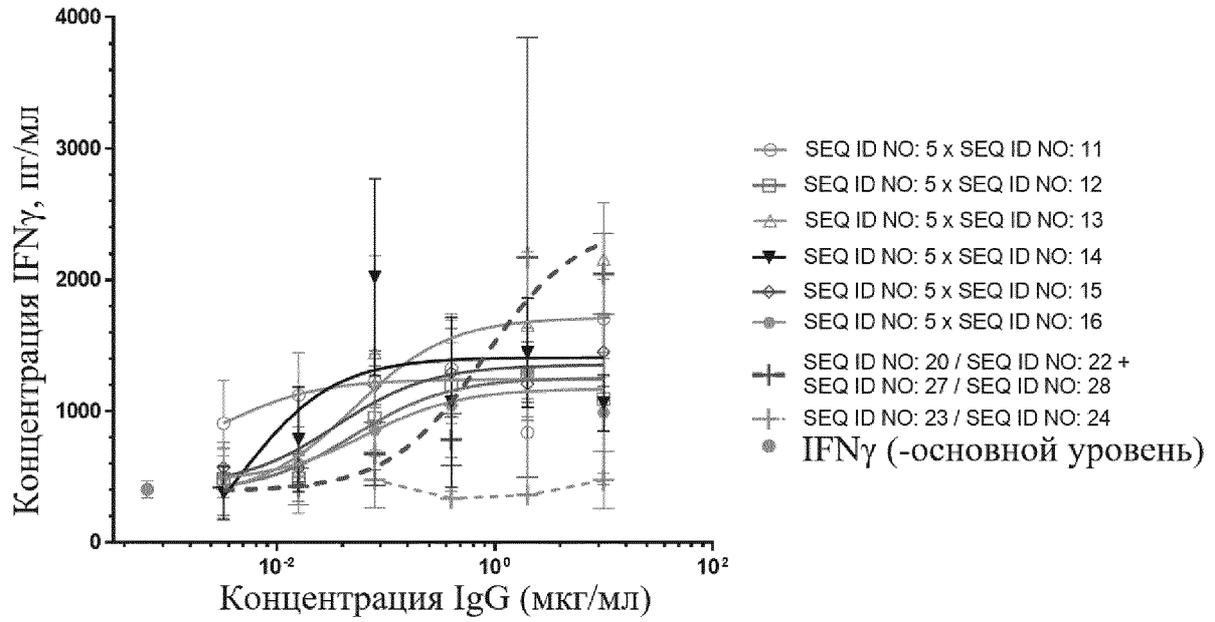
Фиг. 7А



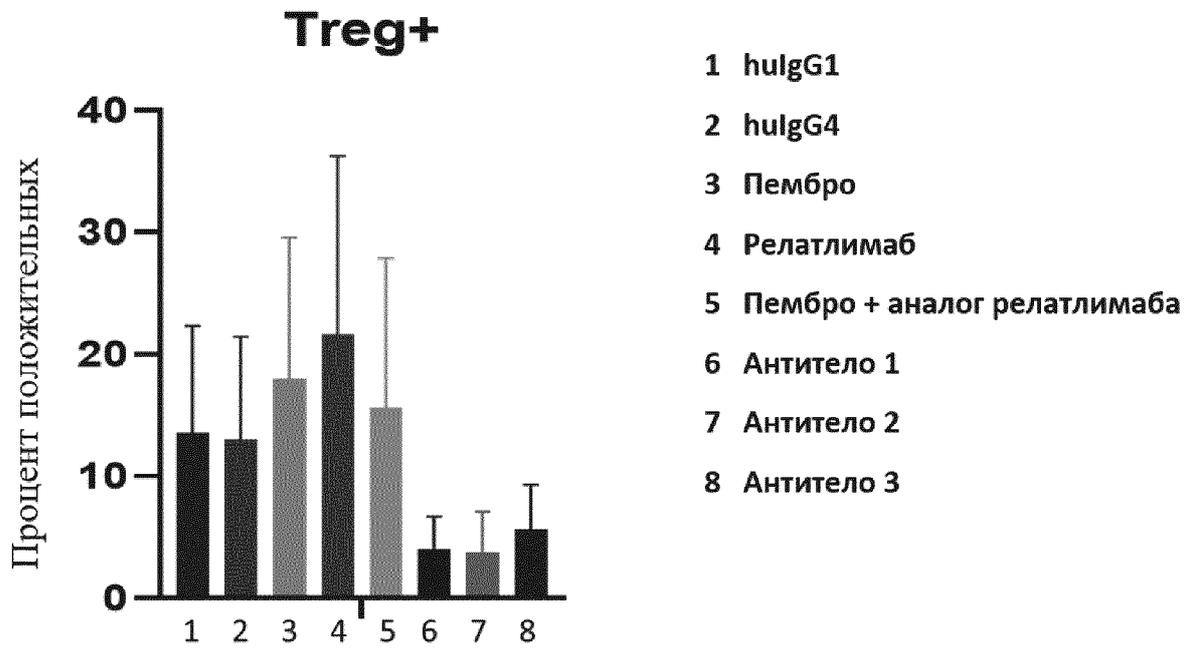
Фиг. 7В



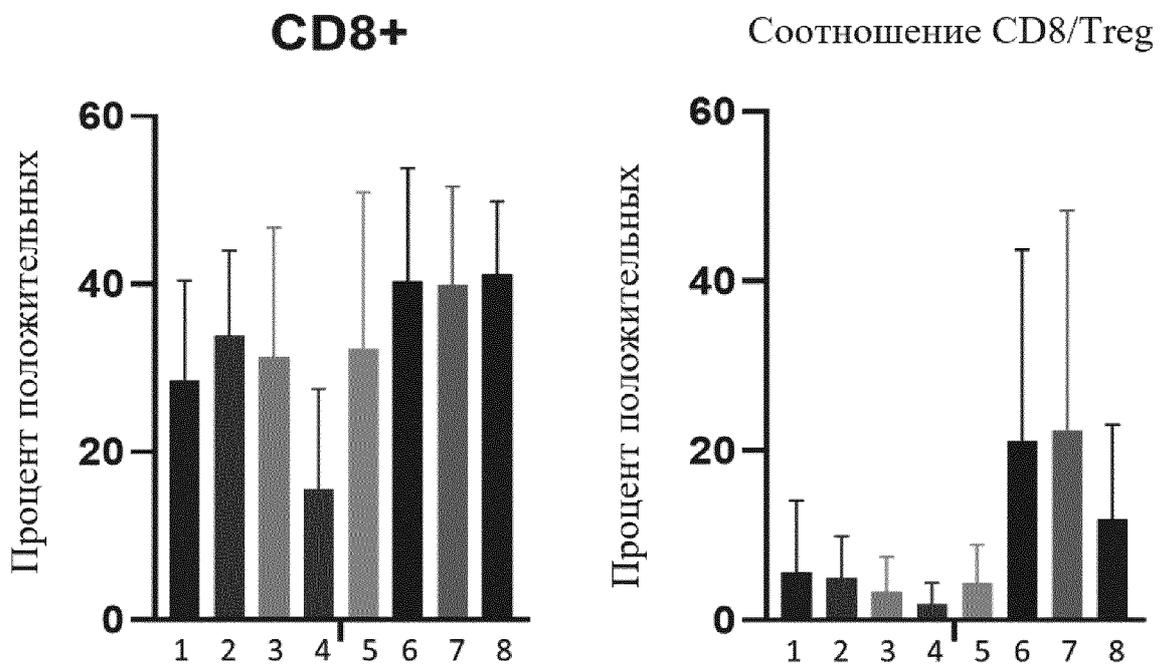
Фиг. 7С



Фиг. 8С



Фиг. 8D



Антиген	huLAG-3			cyLAG-3			huPD-1			cyPD-1			Одновременное связывание
	K _{on} (1/Mc)	K _{off} (1/c)	K _D (нМ)	K _{on} (1/Mc)	K _{off} (1/c)	K _D (нМ)	K _{on} (1/Mc)	K _{off} (1/c)	K _D (нМ)	K _{on} (1/Mc)	K _{off} (1/c)	K _D (нМ)	
SEQ ID NO: 7 x SEQ ID NO: 17	9,32 E+05	1,07 E-03	1,15	2,16 E+06	4,24 E-04	0,20	3,08 E+05	1,20 E-04	0,39	2,94 E+05	1,29 E-04	0,44	Да
SEQ ID NO: 8 x SEQ ID NO: 17	9,92 E+05	1,15 E-03	1,16	2,19 E+06	7,39 E-04	0,34	3,23 E+05	1,05 E-04	0,32	3,35 E+05	9,76 E-04	2,91	Да
SEQ ID NO: 27 / SEQ ID NO: 28	1,39 E+06	3,54 E-04	0,26	N.D.	N.D.	N.D.	-	-	-	-	-	-	-
SEQ ID NO: 21 / SEQ ID NO: 22	-	-	-	-	-	-	2,18 E+05	1,44 E-03	6,66	2,20 E+05	8,50 E-04	3,89	-

Фиг. 9