

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392466** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.02.08

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

(22) Дата подачи заявки
2022.03.30

(54) **НОВЫЕ МУЛЬТИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА**

(31) **2027891**

(32) **2021.03.31**

(33) **NL**

(86) **PCT/NL2022/050174**

(87) **WO 2022/211625 2022.10.06**

(71) Заявитель:
МЕРУС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:

**Плите Саймон Эдвард, Де Крёйф
Корнелис Адриан (NL)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к мультиспецифичному антителу, содержащему связывающий домен, который связывается с LAG-3, и связывающий домен, который связывается с PD-L1. Такое мультиспецифичное антитело имеет сравнимую, или равную, или более высокую активность по сравнению с комбинацией эталонных антител к LAG-3 и PD-L1. Также предложен способ лечения заболевания, в частности заболевания, связанного с супрессией иммунной системы, такого как рак, с помощью мультиспецифичного антитела согласно настоящему изобретению. Настоящее изобретение также относится к вектору и клетке, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи LAG-3- и PD-L1-связывающих доменов.

202392466

A1

A1

202392466

НОВЫЕ МУЛЬТИСПЕЦИФИЧНЫЕ АНТИТЕЛА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 Настоящее изобретение относится к области антител. В частности, оно относится к области терапевтических антител для лечения заболеваний, связанных с аберрантными клетками. Более конкретно, оно относится к новым мультиспецифичным антителам и их вариантам, которые связываются с LAG-3 и белком семейства B7, в частности, PD-L1.

10

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Рак по-прежнему остается основной причиной смерти в мире, несмотря на многие успехи, достигнутые в лечении этого заболевания, и расширение знаний о молекулярных событиях, которые приводят к раку. Традиционно большинство открытий противораковых лекарственных средств было сосредоточено на агентах, которые блокируют основные функции клеток и уничтожают делящиеся клетки. Однако в случаях распространенного рака, независимо от того, насколько агрессивно они применяются, даже до того момента, когда пациенты страдают от опасных для жизни побочных эффектов от лечения, химиотерапия редко приводит к полному излечению. В большинстве случаев после того, как опухоли у пациентов прекращают расти или временно уменьшаются (что называется ремиссией), они вновь начинают пролиферировать, иногда быстрее (что называется рецидивом), и лечить их становится еще сложнее. За последние годы основное внимание при разработке противораковых лекарственных средств перешло от цитотоксической химиотерапии широкого спектра к таргетной цитостатической терапии с меньшей токсичностью. Лечение распространенного рака с помощью таргетной терапии было клинически подтверждено при лейкозе и некоторых других видах рака. Однако при большинстве карцином подходы таргетной терапии все еще оказываются недостаточно эффективными для полной ликвидации рака у большинства пациентов.

30

Нацеливание на рак было достигнуто с использованием различных способов, включая, например, малые молекулы, направленные на сигнальные белки, от которых зависит выживание и/или рост рака; вакцины с опухолеспецифичными белками; клеточную терапию иммунными клетками, которые активно уничтожают опухолевые

клетки, и антитела, которые нацелены на цитотоксические молекулы в опухоли, препятствуют передаче сигналов и/или (пере)направляют иммунную систему хозяина на опухолевые клетки.

Развивающийся класс терапевтических антител представляет собой

5 биспецифичные антитела, которые содержат два разных сайта связывания, которые связывают разные антигены или разные эпитопы на одном и том же антигене. Биспецифичные антитела могут быть сконструированы для нескольких областей применения. Во-первых, биспецифичные антитела могут обеспечивать большую тканеспецифичность, чем моноспецифичное антитело. Несколько
10 опухолеассоциированных антигенов не только (сверх)экспрессируются опухолевыми клетками, но также экспрессируются на нормальных, здоровых клетках. Биспецифичное антитело, направленное против двух разных опухолеассоциированных антигенов, участвующих в развитии определенного типа рака, может специфично нацеливать антитело на очаг опухоли, где антитело индуцирует уничтожение
15 опухолевых клеток, тем самым предотвращая связывание с неопухолевыми клетками, экспрессирующими только один из антигенов, и, таким образом, снижая токсичность вне очага опухоли. Другие механизмы действия включают, например, связывание иммунных клеток с опухолевыми клетками и нарушение двух сигнальных путей, необходимых для роста опухоли.

20 Белки иммунных контрольных точек, такие как, например, PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3 и TIM-3, представляют собой интересную мишень для терапии антителами. На сегодняшний день описан ряд моноспецифичных антител, нацеленных на LAG-3 или PD-L1, а также некоторые биспецифичные антитела, связывающие LAG-3 и PD-L1. Однако каждое из этих биспецифичных антител имеет свои собственные
25 сложности в получении эффективного терапевтического лекарственного средства. Таким образом, сохраняется потребность в разработке новых, эффективных биспецифичных антител к LAG-3хPD-L1.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

30

Одной из задач настоящего изобретения является обеспечение нового фармацевтического агента для лечения заболевания человека, в частности, для лечения рака. Указанная задача решена путем обеспечения мультиспецифичного антитела,

содержащего связывающий домен к LAG-3 человека и связывающий домен к PD-L1 человека.

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложено мультиспецифичное антитело, содержащее связывающий домен, который связывается с LAG-3, и связывающий домен, который связывается с PD-L1, или его вариант, который сохраняет специфичность связывания указанного антитела, причем указанное антитело или вариант имеет по меньшей мере сравнимую или равную, или более высокую активность (эффективность) по сравнению с комбинацией эталонных антител. В отдельных вариантах осуществления указанная комбинация эталонных антител включает эталонное антитело, содержащее две переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, и две переменные области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28 (антитело-аналог релатлимаба), и эталонное антитело, содержащее две переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, и две переменные области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26 (антитело-аналог атезолизумаба).

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительно предложено мультиспецифичное антитело или его вариант, который сохраняет специфичность связывания указанного антитела, причем указанное антитело или его вариант содержит связывающий домен, который специфично связывается с внеклеточным доменом LAG-3, и связывающий домен, который специфично связывается с внеклеточным доменом белка семейства B7, причем указанный LAG-3-связывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-17 или SEQ ID NO: 52-59.

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество мультиспецифичного антитела или его варианта, как описано в настоящем документе.

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительно предложено мультиспецифичное антитело или его вариант, или фармацевтическая

композиция, как описано в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства.

5 В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительно предложено мультиспецифичное антитело или его вариант, или фармацевтическая композиция, как описано в настоящем документе, для применения при лечении заболевания, связанного с супрессией иммунной системы. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложено мультиспецифичное антитело или его вариант, или фармацевтическая композиция, как описано в настоящем документе, для применения при лечении рака.

10 В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительно предложен способ лечения (а) заболевания или (b) заболевания, связанного с супрессией иммунной системы, или с) рака, включающий введение эффективного количества мультиспецифичного антитела или его варианта, или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, нуждающемуся в этом
15 индивидууму.

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительно предложен вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи LAG-3-связывающего домена, как описано в настоящем документе, и последовательность нуклеиновой кислоты,
20 кодирующую переменную область тяжелой цепи PD-L1-связывающего домена, как описано в настоящем документе.

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительно предложена клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи LAG-3-связывающего домена, как описано в настоящем документе, и последовательность нуклеиновой кислоты,
25 кодирующую переменную область тяжелой цепи PD-L1-связывающего домена, как описано в настоящем документе.

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительно предложена клетка, продуцирующая мультиспецифичное антитело или его вариант,
30 как описано в настоящем документе.

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ получения варианта мультиспецифичного антитела, как описано в настоящем документе, а также вариант, полученный таким способом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложено мультиспецифичное антитело, содержащее связывающий домен, который связывается с LAG-3, и связывающий домен, который связывается с PD-L1, или его вариант, который сохраняет специфичность связывания указанного антитела, причем указанное антитело или вариант имеет по меньшей мере сравнимую или равную, или более высокую активность по сравнению с комбинацией эталонных антител, причем указанная комбинация эталонных антител включает эталонное антитело, содержащее две переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, и две переменные области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, и эталонное антитело, содержащее две переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, и две переменные области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26.

LAG-3 известен под рядом различных названий, таких как активирующий лимфоциты 3; ген-3 активации лимфоцитов; антиген CD223; белок FDC; CD223; LAG-3; или FDC. Регистрационные номера LAG3 во внешних базах данных представляют собой следующие: HGNC: 6476; Entrez Gene: 3902; Ensembl: ENSG00000089692; OMIM: 153337; и UniProtKB: P18627. LAG-3 тесно связан с CD4. LAG-3 расположен на 12-й хромосоме человека (12p13.32) рядом с геном CD4, и его последовательность приблизительно на 20% идентична CD4. Белок LAG-3 связывает неголоморфную область главного комплекса гистосовместимости 2 (ГКСГ (МНС) II класса) с большей аффинностью, чем CD4. LAG-3 представляет собой один из различных рецепторов иммунных контрольных точек, которые координированно активируются как на регуляторных Т-клетках (Treg), так и на анергических Т-клетках. LAG-3 может отрицательно регулировать пролиферацию, активацию и гомеостаз Т-клеток.

PD-L1 представляет собой трансмембранный белок 1 типа, который играет роль в подавлении (супрессии) иммунного ответа при определенных событиях, таких как беременность, аллотрансплантация тканей, аутоиммунное заболевание и другие патологические состояния, такие как гепатит. PD-L1 экспрессируется при различных типах рака, особенно при НМРЛ (Boland et al., 2013; Velcheti et al., 2014), меланоме, почечно-клеточной карциноме, раке желудка, гепатоцеллюлярном раке, а также

различных лейкозах и множественной миеломе (Bernstein et al., 2014; Thompson et al., 2005). PD-L1 присутствует в цитоплазме и плазматической мембране раковых клеток, но не все виды рака или клетки в опухоли экспрессируют PD-L1 (Dong et al., 2002).

Множество клеток в микроокружении опухоли способствуют подавлению иммунитета путем повышения экспрессии PD-L1. Этот эффект называется «адаптивной иммунорезистентностью», потому что опухоль защищает себя, индуцируя PD-L1 в ответ на IFN- γ , продуцируемый активированными Т-клетками (Sharma et al., 2017). PD-L1 также может регулироваться онкогенами, этот механизм известен как врожденная иммунорезистентность (Akbay et al., 2013). В микроокружении опухоли PD-L1 также экспрессируется на миелоидных клетках и активированных Т-клетках (Tumeh et al., 2014). Экспрессия PD-L1 индуцируется несколькими провоспалительными молекулами, включая типы I и II IFN- γ , TNF- α , LPS, GM-CSF и VEGF, а также цитокины IL-10 и IL-4, причем IFN- γ является наиболее мощным индуктором (Sznol and Chen, 2013).

Мультиспецифичное антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело в любом формате антитела, которое содержит по меньшей мере два связывающих домена, обладающих специфичностью по меньшей мере к двум разным мишеням или эпитопам. В отдельных вариантах осуществления мультиспецифичное антитело согласно настоящему изобретению представляет собой биспецифичное антитело. В отдельных вариантах осуществления мультиспецифичное антитело согласно настоящему изобретению содержит Fc-область или ее часть. В отдельных вариантах осуществления мультиспецифичное антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело IgG1.

«Вариант» мультиспецифичного антитела, как описано в настоящем документе, содержит функциональную часть, производное и/или аналог мультиспецифичного антитела. Вариант может представлять собой структурный вариант, включая, не ограничиваясь перечисленным, фрагмент антитела, такой как, например, Fab-фрагмент или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). Вариант может представлять собой вариант последовательности. Вариант может представлять собой структурный вариант и вариант последовательности. Вариант сохраняет специфичность связывания, но необязательно аффинность связывания, антитела.

В отдельных вариантах осуществления LAG-3- и/или PD-L1-связывающий домен содержит по меньшей мере вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи. Вариабельная область легкой цепи может

представлять собой любую подходящую переменную область легкой цепи, как описано далее в настоящем документе. В отдельных вариантах осуществления переменная область легкой цепи предпочтительно представляет собой переменную область легкой цепи, которая способна спариваться с несколькими тяжелыми цепями, имеющими разные эпитопные специфичности. Такая легкая цепь также называется в данной области техники «общей легкой цепью».

В отдельных вариантах осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит один связывающий домен, который связывается с LAG-3, и/или один связывающий домен, который связывается с PD-L1. Другими словами, в отдельных вариантах осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант является одновалентным в отношении связывания с LAG-3 и/или одновалентным в отношении связывания с PD-L1. В отдельных вариантах осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант является одновалентным в отношении связывания как с LAG-3, так и с PD-L1.

Определение того, имеет ли мультиспецифичное антитело или вариант сравнимую или равную, или более высокую активность, чем комбинация эталонных антител, может быть выполнено путем измерения активности как мультиспецифичного антитела, так и указанной комбинации антител в одном и том же типе исследования с использованием одних и тех же условий исследования. Таким образом, в отдельных вариантах осуществления активность мультиспецифичного антитела или его варианта измеряют в одном и том же типе исследования с использованием одних и тех же условий исследования.

В отдельных вариантах осуществления по меньшей мере сравнимая активность представляет собой активность в пределах 5-кратного диапазона активности комбинации эталонных антител и включает 5-, 4-, 3- или 2-кратное, предпочтительно 3- или 2-кратное, отклонение от активности комбинации эталонных антител.

В контексте настоящего изобретения термин «активность» относится к функциональной активности мультиспецифичного антитела или его варианта, которая может быть определена в исследованиях *in vitro* или *in vivo*.

В отдельных вариантах осуществления активность мультиспецифичного антитела или его варианта определяют в исследовании *in vivo*, предпочтительно на мышинной модели *in vivo*, такой как, например, мышинная модель HuNSG™, несущая опухоли MDA-231 человека. В отдельных вариантах осуществления активность мультиспецифичного антитела или его варианта определяют путем измерения

уменьшения объема опухоли в таком исследовании *in vivo* на мышах. Уменьшение объема опухоли, индуцированное мультиспецифичными антителами, предложенными в настоящем документе, определяют способом, описанным в примере 4.

5 В отдельных вариантах осуществления сравнимая активность представляет собой уменьшение объема опухоли в пределах 5-кратного диапазона уменьшения объема опухоли, обеспечиваемого комбинацией эталонных антител, и включает 5-, 4-, 3- или 2-кратное, предпочтительно 3- или 2-кратное, отклонение от уменьшения объема опухоли, обеспечиваемого комбинацией эталонных антител.

10 В отдельных вариантах осуществления активность определяют в исследовании *in vitro*, таком как, например, анализ блокирования, включая, не ограничиваясь перечисленным, репортерный анализ PD-1/LAG-3 или PD-L1/LAG-3, предпочтительно репортерный анализ PD-1/LAG-3, такой как, например, описанный в примере 2; или анализ активации Т-клеток, включая, не ограничиваясь перечисленным, анализ с использованием SEB (стафилококковый энтеротоксин В), предпочтительно такой
15 анализ с использованием SEB, как, например, описано в примере 2; анализ с панелью антигенов; или анализ MLR. В отдельных вариантах осуществления активность мультиспецифичного антитела или его варианта и комбинации эталонных антител определяют путем измерения их активности в отношении блокирования связывания лиганда или рецептора с LAG-3 и/или PD-L1, предпочтительно связывания лиганда
20 или рецептора с LAG-3 и PD-L1. Активность в отношении блокирования связывания лиганда или рецептора с LAG-3 и/или PD-L1 мультиспецифичных антител, предложенных в настоящем документе, измеряют способом, описанным в примере 2. Вкратце, репортерный анализ PD-1/LAG-3 проводят с использованием Т-клеток Jurkat, экспрессирующих PD-1 и LAG-3, в качестве эффекторных клеток, и клеток Raji,
25 экспрессирующих PD-L1, в качестве клеток-мишеней. Эффекторные клетки PD-1 и LAG-3 подготавливают и высевают с плотностью 100000 клеток на лунку. Тестируемый и контрольный IgG добавляют в 6-стадийном полулогарифмическом титровании в эквимольных количествах, а затем добавляют клетки Raji (25000 на лунку). Т-клетки активируют путем добавления частично очищенного
30 стафилококкового энтеротоксина D (ppSED, с использованием концентрации, которая обеспечивает наивысший ответ при положительном контрольном анализе, такой как 16,6 нг/мл в примере 2 или 150 нг/мл в примере 5). Через 6 часов инкубации при 37 °C определяют активность репортерного гена люциферазы.

В отдельных вариантах осуществления сравнимая активность представляет собой активность в отношении блокирования связывания лиганда или рецептора с LAG-3 и/или PD-L1, предпочтительно LAG-3 и PD-L1, которая находится в пределах 5-кратного диапазона активности в отношении блокирования связывания лиганда или рецептора с LAG-3 и/или PD-L1, предпочтительно LAG-3 и PD-L1, комбинации эталонных антител, и включает 5-, 4-, 3- или 2-кратное, предпочтительно 3- или 2-кратное отклонение от активности в отношении блокирования связывания лиганда или рецептора с LAG-3 и/или PD-L1, предпочтительно LAG-3 и PD-L1, комбинации эталонных антител. В отдельных вариантах осуществления комбинация эталонных антител включает аналог антитела к LAG-3 релатлимаба и аналог антитела к PD-L1 атезолизумаба. Аналог релатлимаба имеет ту же последовательность вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 27), что и релатлимаб. Антитело-аналог релатлимаба имеет ту же последовательность вариабельной области легкой цепи (SEQ ID NO: 28), что и релатлимаб. Аналог атезолизумаба имеет ту же последовательность вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 25), что и атезолизумаб. Антитело-аналог атезолизумаба имеет ту же последовательность вариабельной области легкой цепи (SEQ ID NO: 26), что и атезолизумаб. Эталонные антитела предпочтительно получают с использованием того же способа получения, что и мультиспецифичное антитело или его вариант. Предпочтительно LAG-3- и PD-L1-связывающие домены мультиспецифичного антитела или его варианта согласно настоящему изобретению и комбинацию эталонных антител используют в эквимольных концентрациях, то есть, когда мультиспецифичное антитело или его вариант используют в концентрации 100 мкг/мл, комбинация эталонных антител содержит 50 мкг/мл LAG-3-связывающего эталонного антитела и 50 мкг/мл PD-L1-связывающего эталонного антитела.

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложено мультиспецифичное антитело или его вариант, который сохраняет специфичность связывания указанного антитела, причем указанное антитело или его вариант содержит связывающий домен, который специфично связывается с внеклеточным доменом LAG-3, и связывающий домен, который специфично связывается с внеклеточным доменом белка семейства B7.

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта согласно настоящему изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3

тяжелой цепи (HCDR3) одной из переменных областей тяжелой цепи, имеющих аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1-17 или SEQ ID NO: 52-59. Последовательности HCDR, согласно Kabat, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты в перечне последовательностей, представленном в настоящем документе.

5 Последовательности CDR могут быть определены различными способами, включая, не ограничиваясь перечисленным, в соответствии со схемой нумерации согласно 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)), схемой нумерации согласно 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)), системой нумерации согласно Honegger и Plückthun (Honegger and Plückthun, *J. Mol. Biol.*, 309:657-670 (2001)), системой нумерации согласно MacCallum (MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996); и/или Abhinandan and Martin, *Mol. Immunol.*, 45: 3832-3839 (2008)), системой нумерации согласно 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 (обсуждается в Giudicelli et al., *Nucleic Acids Res.* 25: 206-211 (1997)).

В каждой из этих схем нумерации определение CDR основано на прогнозируемом вкладе аминокислотных остатков в переменную область тяжелой или легкой цепи в связывание антигена. Следовательно, каждый способ 20 идентификации CDR может быть использован для идентификации CDR связывающих доменов согласно настоящему изобретению. В отдельных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи связывающего домена согласно настоящему изобретению соответствуют Kabat, Chothia или IMGT. В отдельных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи связывающего домена согласно настоящему изобретению соответствуют Kabat. В отдельных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи связывающего домена согласно настоящему изобретению соответствуют Chothia. В отдельных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи связывающего домена согласно настоящему изобретению соответствуют IMGT.

30 В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую:

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57;

5 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58; или

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59;

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

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

15 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62, соответственно;

20 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 62, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, соответственно;

25 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 69, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72, соответственно;

30 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 75, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78, соответственно;

5 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 81, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 84, соответственно;

10 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 87, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в
15 SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 90, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 92, соответственно;

20 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 93, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95 и SEQ ID NO: 96, соответственно;

25 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в
30 SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 100, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 118, соответственно;

5 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 119, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 120, соответственно;

10 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 121, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 122, соответственно;

15 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 123, соответственно;

20 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 124, соответственно; или

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 125, соответственно;

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

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

30 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57;

5 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58; или

10 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59; где каждая из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены.

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

15 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, соответственно;

20 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72, соответственно;

25 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 75, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, соответственно;

30 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 100, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 118, соответственно;

5 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 119, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 120, соответственно;

10 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 121, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 122, соответственно;

15 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 123, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 124, соответственно; или

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 125, соответственно;

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

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

30 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17,

5 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53;

10 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55;

15 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56;

20 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58; или

25 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59;

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

30 В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72, соответственно;

5 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 118, соответственно;

10 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 119, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 120, соответственно;

15 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 121, соответственно;

20 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 122, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 123, соответственно;

25 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 124, соответственно; или

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 125, соответственно;

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

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит переменную область

тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5,

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

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52,

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

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72, соответственно;

15

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

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 118, соответственно;

25

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

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

30

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) варибельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58; или

5 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) варибельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59.

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую:

10 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в
15 SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 62, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в
SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, соответственно;

20 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 69, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в
SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72, соответственно;

25 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 75, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в
30 SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в
SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 81, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 84, соответственно;

5 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 87, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 90, соответственно;

10 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 92, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в
15 SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 93, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95 и SEQ ID NO: 96, соответственно;

20 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 100, соответственно;

25 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в
30 SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 118, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 119, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 120, соответственно;

5 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 121, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 122, соответственно;

10 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 123, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 124, соответственно; или

15 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 125, соответственно.

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую:

20 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1;

25 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5;

30 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6;

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

- 5 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62, соответственно;
- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, соответственно;
- 10 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72, соответственно;
- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 75, соответственно;
- 15 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, соответственно;
- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 100, соответственно;
- 20 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, соответственно;
- 25 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 118, соответственно;
- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 119, соответственно;
- 30 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 120, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 121, соответственно;

5 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 122, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 123, соответственно;

10 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 124, соответственно; или

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в
15 SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 125, соответственно.

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую:

20 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17,

25 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную
30 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55;

5 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57;

10 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58; или

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59.

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

20 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, соответственно;

25 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 118, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 119, соответственно;

30 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 120, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 121, соответственно;

5 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 122, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 123, соответственно;

10 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 124, соответственно; или

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в
15 SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 125, соответственно.

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи,
20 имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную
25 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72, соответственно.

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи,
30 имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52.

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит переменную область

тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 118, соответственно.

5 В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-17 или SEQ ID NO: 52-59, или идентичную ей по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95%.

10 В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта включает варианты LAG-3-связывающего домена, где каждая из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. Ожидается, что такие варианты сохранят специфичность связывания LAG-3.

15 Например, подходящие положения для введения аминокислотной вариации включают, не ограничиваясь перечисленным, вторую и/или третью аминокислоту HCDR1; третью, седьмую, десятую, тринадцатую и/или шестнадцатую аминокислоту HCDR2; и/или первую аминокислоту HCDR3. Последовательности CDR согласно Kabat выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты в перечне последовательностей, представленном в настоящем документе.

В отдельных вариантах осуществления связывающий домен к LAG-3 человека содержит:

- HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SX_1X_2WS , где
 - 25 X_1 может представлять собой Y или F;
 - X_2 может представлять собой Y или S; и/или
- HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность $YIX_1YSGX_2TNX_3NPX_4LKX_5$, где
 - 30 X_1 может представлять собой Y или D;
 - X_2 может представлять собой S или T;
 - X_3 может представлять собой Y или F;
 - X_4 может представлять собой S или F;

X_5 может представлять собой S или I; и/или

- HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность $X_1LLYKWN YVEGFDI$, где

X_1 может представлять собой D или H.

5 Например, подходящие положения для введения аминокислотной вариации включают, не ограничиваясь перечисленным, первую, третью и/или четвертую аминокислоту HCDR1; седьмую, десятую и/или двенадцатую аминокислоту HCDR2; и/или третью аминокислоту HCDR3. Последовательности CDR согласно Kabat выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты в перечне последовательностей, представленном в настоящем документе.

10 В отдельных вариантах осуществления связывающий домен к LAG-3 человека содержит:

- HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность $X_1YX_2X_3H$, где

X_1 может представлять собой S, N или R;

15 X_2 может представлять собой G или D;

X_3 может представлять собой M, T или I; и/или

- HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность $VISYDGX_1NKX_2YX_3DSVKG$, где

X_1 может представлять собой S или N;

20 X_2 может представлять собой Y, F или H;

X_3 может представлять собой A, E или V; и/или

- HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность $ERX_1WDVFDI$, где

X_1 может представлять собой G или D.

25 Например, подходящие положения для введения аминокислотной вариации включают, не ограничиваясь перечисленным, первую и/или третью аминокислоту HCDR1; пятую и/или восьмую аминокислоту HCDR2; и/или третью аминокислоту HCDR3. Последовательности CDR согласно Kabat выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты в перечне последовательностей, представленном в настоящем документе.

30 В отдельных вариантах осуществления связывающий домен к LAG-3 человека содержит:

- HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность X_1YX_2MH , где

X_1 может представлять собой S или N;

X_2 может представлять собой G или A; и/или

- HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность

5 VISYX₁GSX₂KYYADSVKG, где

X_1 может представлять собой D или H;

X_2 может представлять собой N или D; и/или

- HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность DGDNWDX₁FDI,

где

10

X_1 может представлять собой V или A.

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен

мультиспецифичного антитела или его варианта также включает варианты LAG-3-связывающего домена, которые помимо вариаций в HCDR содержат одну или более

15 вариаций в каркасных областях. В отдельных вариантах осуществления вариант LAG-3-связывающего домена мультиспецифичного антитела или его варианта не содержит

вариаций в областях CDR, но содержит одну или более вариаций в каркасных областях. Такие варианты по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более

предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичны

20 последовательностям, раскрытым в настоящем документе, и, как ожидается, сохраняют специфичность связывания LAG-3. Таким образом, в отдельных вариантах

осуществления LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению

содержит:

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%,

25 предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее

предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности,

представленной в SEQ ID NO: 1, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности,

представленной в SEQ ID NO: 1;

30 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%,

предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее

предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2;

5 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3;

10 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4;

15 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5;

20 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6;

25 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи
5 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи
10 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10, причем указанная вариабельная область тяжелой
15 цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11, причем указанная вариабельная область тяжелой
20 цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12, причем указанная вариабельная область тяжелой
25 цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13, причем указанная вариабельная область тяжелой
30

цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13;

5 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14;

10 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 15;

15 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16;

20 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17;

25 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 52, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 52;

30 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее

предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 53;

5 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 54;

10 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 55, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 55;

15 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 56, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 56;

20 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 57, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 57;

25 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 58, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 58; или

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 59, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 59.

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению содержит:

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62, соответственно;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

представленную в SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 62, соответственно;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, соответственно;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

представленную в SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 69, соответственно;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее

предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72, соответственно;

5 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 75, соответственно;

10 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 7, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 и SEQ ID NO: 78, соответственно;

15 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 81, соответственно;

20 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83 и SEQ ID NO: 84, соответственно;

25 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 87, соответственно;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11, причем указанная вариабельная область тяжелой
- 5 цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 90, соответственно;
- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности,
- 10 представленной в SEQ ID NO: 12, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 92, соответственно;
- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее
- 15 предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 13, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 91 и SEQ ID NO: 93, соответственно;
- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%,
- 20 предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95 и SEQ ID NO: 96, соответственно;
- 25 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности,
- представленной в SEQ ID NO: 15, причем указанная вариабельная область тяжелой
- 30 цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, соответственно;
- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности,
- представленной в SEQ ID NO: 16, причем указанная вариабельная область тяжелой

цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 100, соответственно;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%,

предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее

5 предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности,

представленной в SEQ ID NO: 17, причем указанная вариабельная область тяжелой

цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, соответственно;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%,

10 предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее

предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности,

представленной в SEQ ID NO: 52, причем указанная вариабельная область тяжелой

цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 118, соответственно;

15 - вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%,

предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее

предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности,

представленной в SEQ ID NO: 53, причем указанная вариабельная область тяжелой

цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

20 представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 119, соответственно;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%,

предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее

предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности,

представленной в SEQ ID NO: 54, причем указанная вариабельная область тяжелой

25 цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 120, соответственно;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%,

предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее

предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности,

30 представленной в SEQ ID NO: 55, причем указанная вариабельная область тяжелой

цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 121, соответственно;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%,

предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее

предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 56, причем указанная переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 122, соответственно;

5 - переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 57, причем указанная переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 123, соответственно;

10 - переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 58, причем указанная переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 124, соответственно; или

15 - переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 59, причем указанная переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 125, соответственно.

25 В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта дополнительно содержит переменную область легкой цепи. В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит переменную область общей легкой цепи. Примером подходящей переменной области легкой цепи является переменная область легкой цепи, содержащая CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 33, соответственно, причем каждая из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. В отдельных вариантах осуществления подходящая переменная область легкой цепи представляет

собой переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 33, соответственно. В отдельных вариантах осуществления изобретения такая

5 переменная область легкой цепи может содержать переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, или идентичную ей по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95%. Легкая цепь или

10 переменная область легкой цепи, содержащая эти LCDR и/или переменную область легкой цепи, представляет собой легкую цепь, обозначаемую в данной области техники как VK1-39/JK1. Она представляет собой общую легкую цепь.

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению содержит переменную область легкой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее

15 предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 30, причем указанная переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность LCDR1, представленную в SEQ ID NO: 31; аминокислотную последовательность LCDR2, представленную в SEQ ID NO: 32; и аминокислотную последовательность LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 33.

20 Термин «общая легкая цепь» согласно изобретению относится к легкой цепи, которая способна спариваться с несколькими различными тяжелыми цепями, то есть тяжелыми цепями, имеющими различную антигенную или эпитопную специфичность связывания. Общая легкая цепь особенно подходит для получения, например,

25 биспецифичных антител, где продукция антител является более эффективной, когда оба связывающих домена содержат одну и ту же легкую цепь. Термин «общая легкая цепь» охватывает легкие цепи, которые являются идентичными или имеют некоторые различия в аминокислотных последовательностях, и при этом специфичность связывания полноразмерного антитела не изменяется. Например, в рамках определения

30 общих легких цепей в контексте настоящего документа можно получить или найти легкие цепи, которые не являются идентичными, но при этом по-прежнему функционально эквивалентны, например, путем введения и тестирования консервативных аминокислотных изменений, изменений аминокислот в областях, которые не способствуют или только частично способствуют специфичности связывания в паре с тяжелой цепью, и тому подобного.

Помимо общей легкой цепи, содержащей LCDR и/или переменную область легкой цепи, упомянутые выше, могут быть использованы другие общие легкие цепи, известные в данной области техники. Примеры таких общих легких цепей включают, не ограничиваясь перечисленным: VK1-39/JK5, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) переменной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34. LCDR в соответствии с IMGT в них выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты. В отдельных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) переменной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34, причем каждая из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. В отдельных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34, или идентичную ей по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95%; VK3-15/JK1, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) переменной области легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35. LCDR в соответствии с IMGT в них выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты. В отдельных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) переменной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35, причем каждая из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. В отдельных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35, или идентичную ей по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95%; VK3-20/JK1, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) переменной области легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36. LCDR в

соответствии с IMGT в них выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты. В отдельных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) переменной области легкой цепи, имеющей

5 аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, причем каждая из LCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. В отдельных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36, или идентичную ей по меньшей мере на 80%, предпочтительно на

10 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95%; и VL3-21/JL3, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) переменной области легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37. LCDR в соответствии с IMGT в них выделены

15 полужирным шрифтом и подчеркнуты. В отдельных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) переменной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, причем каждая из LCDR может содержать не более трех, двух или

20 одной аминокислотной замены. В отдельных вариантах осуществления легкая цепь содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, или идентичную ей по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95%.

25 VK1-39 - это сокращение от гена переменной области домена каппа иммуноглобулина 1-39. Этот ген также известен как переменный домен каппа иммуноглобулина 1-39; IGKV139; IGKV1-39; IgVκ1-39. Регистрационные номера этого гена во внешних базах данных представляют собой следующие: HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. Предпочтительная аминокислотная

30 последовательность VK1-39 представлена как SEQ ID NO: 38. Она представляет собой последовательность V-области. V-область может быть объединена с одной из пяти J-областей. Две предпочтительные соединенные последовательности обозначены как VK1-39/JK1 и VK1-39/JK5; альтернативные названия представляют собой IgVκ1-39_01/IGJκ1_01 или IgVκ1-39_01/IGJκ5_01 (классификация в соответствии с базой

данных IMGT по адресу в сети Интернет imgt.org). Эти названия являются иллюстративными и охватывают аллельные варианты сегментов гена.

VK3-15 - это сокращение от гена варибельного домена каппа иммуноглобулина 3-15. Этот ген также известен как варибельный домен каппа иммуноглобулина 3-15; IGKV315; IGKV3-15; IgV κ 3-15. Регистрационные номера этого гена во внешних базах данных представляют собой следующие: HGNC: 5816; Entrez Gene: 28913; Ensembl: ENSG00000244437. Предпочтительная аминокислотная последовательность VK3-15 представлена как SEQ ID NO: 39. Она представляет собой последовательность V-области. V-область может быть объединена с одной из пяти J-областей. Предпочтительная соединенная последовательность обозначена как VK3-15/JK1; альтернативное название представляет собой V κ 3-15_01/IGJ κ 1_01 (классификация в соответствии с базой данных IMGT по адресу в сети Интернет imgt.org). Это название является иллюстративным и охватывает аллельные варианты сегментов гена.

VK3-20 - это сокращение от гена варибельного домена каппа иммуноглобулина 3-20. Этот ген также известен как варибельный домен каппа иммуноглобулина 3-20; IGKV320; IGKV3-20; IgV κ 3-20. Регистрационные номера этого гена во внешних базах данных представляют собой следующие: HGNC: 5817; Entrez Gene: 28912; Ensembl: ENSG00000239951. Предпочтительная аминокислотная последовательность VK3-20 представляет собой SEQ ID NO: 40. Она представляет собой последовательность V-области. V-область может быть объединена с одной из пяти J-областей. Предпочтительная соединенная последовательность обозначена как VK3-20/JK1; альтернативное название представляет собой IgV κ 3-20_01/IGJ κ 1_01 (классификация в соответствии с базой данных IMGT по адресу в сети Интернет imgt.org). Это название является иллюстративным и охватывает аллельные варианты сегментов гена.

VL3-21 - это сокращение от гена варибельного домена лямбда иммуноглобулина 3-21. Этот ген также известен как варибельный домен лямбда иммуноглобулина 3-21; IGLV321; IGLV3-21; IgV λ 3-21. Регистрационные номера этого гена во внешних базах данных представляют собой следующие: HGNC: 5905; Entrez Gene: 28796; Ensembl: ENSG00000211662.2. Предпочтительная аминокислотная последовательность VL3-21 представлена как SEQ ID NO: 41. Она представляет собой последовательность V-области. V-область может быть объединена с одной из пяти J-областей. Предпочтительная соединенная последовательность обозначена как VL3-

21/JL3; альтернативное название представляет собой IgV λ 3-21/IGJ λ 3 (классификация в соответствии с базой данных IMGT по адресу в сети Интернет imgt.org). Это название является иллюстративным и охватывает аллельные варианты сегментов гена.

5 Кроме того, может быть использована любая переменная область легкой цепи антитела к LAG-3, доступная в данной области техники, или любая другая переменная область легкой цепи, которая может быть легко получена, например, из библиотеки дисплея антител, путем демонстрации антигенсвязывающей активности в паре с LAG-3-связывающим доменом согласно настоящему изобретению.

10 В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта может дополнительно содержать область СН1 и СL. Может быть использован любой домен СН1, в частности, домен СН1 человека. Пример подходящего домена СН1 представлен аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 42. Может быть использован любой домен СL, в частности, СL человека. Пример подходящего домена СL представлен аминокислотной
15 последовательностью SEQ ID NO: 43.

В отдельных вариантах осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит связывающий домен, который специфично связывается с внеклеточным доменом LAG-3, и связывающий домен, который специфично связывается с внеклеточным доменом белка семейства В7.

20 Семейство В7 содержит ряд структурно родственных белков клеточной поверхности, которые связываются с рецепторами на лимфоцитах, регулируемыми иммунные ответы. Активация лимфоцитов инициируется связыванием с антигенспецифичными Т-клеточными рецепторами или В-клеточными рецепторами клеточной поверхности. Дополнительные сигналы, доставляемые одновременно
25 лигандами В7, дополнительно определяют иммунный ответ этих клеток. Эти так называемые «костимулирующие» или «коингибирующие» сигналы доставляются членами семейства В7 посредством семейства CD28 рецепторов на лимфоцитах. Связывание членов семейства В7 с костимулирующими рецепторами усиливает иммунные ответы, а связывание с коингибирующими рецепторами ослабляет
30 иммунные ответы. В настоящее время считается, что в это семейство входят следующие члены: В7.1 (CD80), В7.2 (CD86), лиганд индуцибельного костимулятора (ICOS-L), лиганд программируемой смерти-1 (PD-L1), лиганд программируемой смерти-2 (PD-L2), В7-Н3 (CD276), В7-Н4, В7-Н5, В7-Н6 и В7-Н7. Члены семейства В7 экспрессируются в лимфоидных и нелимфоидных тканях. Влияние членов на

регуляцию иммунных ответов проявляется в развитии иммунодефицита и аутоиммунных заболеваний у мышей с мутациями в генах семейства B7. Был показан потенциал манипулирования сигналами, доставляемыми лигандами B7, при лечении аутоиммунитета, воспалительных заболеваний и рака.

5 В отдельных вариантах осуществления указанный белок семейства B7 выбран из группы, состоящей из PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, B7-H4, TNFRSF14 и B7-H7. В отдельных вариантах осуществления белок семейства B7 представляет собой PD-L1.

10 В отдельных вариантах осуществления вариабельный домен, специфично связывающийся с внеклеточным доменом белка семейства B7, блокирует связывание PD-L1 с его рецептором. В отдельных вариантах осуществления рецептор представляет собой PD-1 и/или CD80.

15 В отдельных вариантах осуществления PD-L1-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта согласно настоящему изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) одной из вариабельных областей тяжелой цепи, имеющих аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20-24. HCDR согласно Kabat выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты в перечне последовательностей, представленном в настоящем документе.

20 В отдельных вариантах осуществления связывающий домен, связывающийся с PD-L1, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20;

25 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21,

30 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22,

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; или

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

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

В отдельных вариантах осуществления связывающий домен, связывающийся с PD-L1, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

10 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 112, соответственно;

15 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114 и SEQ ID NO: 115, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 116 и SEQ ID NO: 109, соответственно;

20 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно,

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

25 В отдельных вариантах осуществления связывающий домен, связывающийся с PD-L1, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20; или

30 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

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

В отдельных вариантах осуществления связывающий домен, связывающийся с PD-L1, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую:

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в

5 SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109, соответственно; или

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно,

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

В отдельных вариантах осуществления связывающий домен, связывающийся с PD-L1, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую:

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20,

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

В отдельных вариантах осуществления связывающий домен, связывающийся с PD-L1, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую:

20 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109, соответственно,

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

В отдельных вариантах осуществления связывающий домен, связывающийся с PD-L1, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую:

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20;

30 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21,

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22,

5 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; или

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

10 В отдельных вариантах осуществления связывающий домен, связывающийся с PD-L1, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109, соответственно;

15 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 112, соответственно;

20 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114 и SEQ ID NO: 115, соответственно;

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 116 и SEQ ID NO: 109, соответственно;

25 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно.

30 В отдельных вариантах осуществления связывающий домен, связывающийся с PD-L1, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20; или

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

5 В отдельных вариантах осуществления связывающий домен, связывающийся с PD-L1, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

- CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109, соответственно; или

10 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно.

В отдельных вариантах осуществления связывающий домен, связывающийся с PD-L1, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

15 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

В отдельных вариантах осуществления связывающий домен, связывающийся с PD-L1, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

20 - CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109, соответственно.

В отдельных вариантах осуществления PD-L1-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в 25 любой из SEQ ID NO: 20-24, или идентичную ей по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95%.

В отдельных вариантах осуществления PD-L1-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта включает варианты PD-L1- 30 связывающего домена, где каждая из HCDR может содержать не более трех, двух или одной аминокислотной замены. Ожидается, что такие варианты сохранят специфичность связывания PD-L1.

В отдельных вариантах осуществления PD-L1-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта также включает варианты PD-L1-

связывающего домена, которые помимо вариаций в HCDR содержат одну или более вариаций в каркасных областях. В отдельных вариантах осуществления вариант PD-L1-связывающего домена мультиспецифичного антитела или его варианта не содержит вариаций в областях CDR, но содержит одну или более вариаций в каркасных областях. Такие варианты по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичны последовательностям, раскрытым в настоящем документе, и, как ожидается, сохраняют специфичность связывания PD-L1. Таким образом, в отдельных вариантах осуществления PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению содержит:

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23; или

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24.

В отдельных вариантах осуществления PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению содержит:

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109, соответственно;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111 и SEQ ID NO: 112, соответственно;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114 и SEQ ID NO: 115, соответственно;

- вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23, причем указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 116 и SEQ ID NO: 109, соответственно; или

- переменную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24, причем указанная переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно.

10

В отдельных вариантах осуществления PD-L1-связывающий домен мультиспецифического антитела или его варианта дополнительно содержит переменную область легкой цепи. Примером подходящей переменной области легкой цепи является переменная область легкой цепи, как описано в настоящем документе. Могут быть использованы переменные области легкой цепи антител к PD-L1, доступные в данной области техники, или любая другая переменная область легкой цепи, которая может быть легко получена, например, из библиотеки дисплея антител, путем демонстрации антигенсвязывающей активности в паре с PD-L1-связывающим доменом согласно настоящему изобретению. Предпочтительно PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению содержит переменную область легкой цепи VK1-39/JK1, VK1-39/JK5, VK3-15/JK1, VK3-20/JK1 или VL3-21/JL3.

15

20

25

30

В отдельных вариантах осуществления PD-L1-связывающий домен мультиспецифического антитела или его варианта может дополнительно содержать область CH1 и CL. Может быть использован любой домен CH1, в частности, домен CH1 человека. Пример подходящего домена CH1 представлен аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 42. Может быть использован любой домен CL, в частности, CL человека. Пример подходящего домена CL представлен аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 43.

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен, раскрытый в настоящем документе, может быть объединен с любым PD-L1-связывающим доменом, раскрытым в настоящем документе, с получением мультиспецифического антитела или его варианта согласно настоящему изобретению. В отдельных вариантах

осуществления настоящего изобретения предложены мультиспецифичные антитела PB1-PB125, или их варианты, представленные в таблице 1.

	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 20
SEQ ID NO: 1	PB1	PB2	PB3	PB4	PB69
SEQ ID NO: 2	PB5	PB6	PB7	PB8	PB70
SEQ ID NO: 3	PB9	PB10	PB11	PB12	PB71
SEQ ID NO: 4	PB13	PB14	PB15	PB16	PB72
SEQ ID NO: 5	PB17	PB18	PB19	PB20	PB73
SEQ ID NO: 6	PB21	PB22	PB23	PB24	PB74
SEQ ID NO: 7	PB25	PB26	PB27	PB28	PB75
SEQ ID NO: 8	PB29	PB30	PB31	PB32	PB76
SEQ ID NO: 9	PB33	PB34	PB35	PB36	PB77
SEQ ID NO: 10	PB37	PB38	PB39	PB40	PB78
SEQ ID NO: 11	PB41	PB42	PB43	PB44	PB79
SEQ ID NO: 12	PB45	PB46	PB47	PB48	PB80
SEQ ID NO: 13	PB49	PB50	PB51	PB52	PB81

SEQ ID NO: 14	PB53	PB54	PB55	PB56	PB82
SEQ ID NO: 15	PB57	PB58	PB59	PB60	PB83
SEQ ID NO: 16	PB61	PB62	PB63	PB64	PB84
SEQ ID NO: 17	PB65	PB66	PB67	PB68	PB85
SEQ ID NO: 52	PB86	PB87	PB88	PB89	PB90
SEQ ID NO: 53	PB91	PB92	PB93	PB94	PB95
SEQ ID NO: 54	PB96	PB97	PB98	PB99	PB100
SEQ ID NO: 55	PB101	PB102	PB103	PB104	PB105
SEQ ID NO: 56	PB106	PB107	PB108	PB109	PB110
SEQ ID NO: 57	PB111	PB112	PB113	PB114	PB115
SEQ ID NO: 58	PB116	PB117	PB118	PB119	PB120
SEQ ID NO: 59	PB121	PB122	PB123	PB124	PB125

Таблица 1. Связывающие фрагменты, содержащие комбинации переменных областей тяжелой цепи, специфичных к LAG-3, и переменных областей тяжелой цепи, специфичных к PD-L1. Каждый из PB1-PB125 может быть объединен с легкой цепью, раскрытой в настоящем документе.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1; и

5 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 23 или 24.

10 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3; и

15 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 23 или 24.

20 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5; и

25 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 23 или 24. В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

30 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 23 или 24.

5 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15; и

10

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 23 или 24.

15 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную

20 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 23 или 24.

25 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную

30 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 23 или 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

5 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52; и

10 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 23 или 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

15 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53; и

20 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 23 или 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

25 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54; и

30 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 23 или 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

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

(HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 23 или 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 23 или 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 23 или 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи

(HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 23 или 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

5 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59; и

10 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, 23 или 24.

15 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

20 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17; и

25 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

30 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

35 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, соответственно; и

40 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 119, соответственно; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 120, соответственно; и

5 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно.

10 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную

15 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

20 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

25 NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 121, соответственно; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно.

30

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

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

(HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 122, соответственно; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 123, соответственно; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно.

5

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58; и

10

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

15

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 124, соответственно; и

20

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно.

25

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59; и

30

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи

(HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

5 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 125, соответственно; и

10 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно.

15 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

20 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5; и

20 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

25 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

30 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72, соответственно; и

30 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109, соответственно.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 118, соответственно; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109, соответственно. В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3

легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

5 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, соответственно; и

10 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно,

 причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, 15 представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

20 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) 25 вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53; и

 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) 30 вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

 причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, 35 представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3

легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

5 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 119, соответственно; и

10 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно,

причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, 15 представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

20 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную 25 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

30 причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3

легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

5 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 120, соответственно; и

10 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно,

причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, 15 представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

20 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55; и

25 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат 30 CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 121, соответственно; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно,

причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 122, соответственно; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно,

причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 123, соответственно; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно,

причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 124, соответственно; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно,

причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 125, соответственно; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 и SEQ ID NO: 109, соответственно,

причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20,

причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72, соответственно; и

5 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109, соответственно,

10 причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

15

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

20 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52; и

25 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20,

30 причем LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 118, соответственно; и

5 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108 и SEQ ID NO: 109, соответственно,

10 причём LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33.

15 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17; и

20 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

25 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53; и

30 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54; и

5 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

10 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

15 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56; и

20 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

25 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57; и

30 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58; и

5 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

10 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24.

15 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5; и

20 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

25 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52; и

30 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20. В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

5 причём LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

10 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

15 причём LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

20 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54; и

25 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

причём LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

30 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

5 причём LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

10 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

15 причём LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

20 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57; и

25 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

причём LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

30 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

5 причём LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

10 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24,

15 причём LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

20 - LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5; и

25 - PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20,

причём LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

30 В одном из вариантов осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант содержит:

- LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52; и

- PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20,

5 причём LAG-3-связывающий домен и PD-L1-связывающий домен содержат переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

Мультиспецифичное антитело к LAG-3хPD-L1 или его вариант согласно настоящему изобретению нацелено на две иммунные контрольные точки, проявляя транс-активность: оно связывается с PD-L1, экспрессируемым на опухолевых клетках или антигенпрезентирующих клетках, и одновременно с LAG-3, экспрессируемым на Т-клетках. Оно также может быть цис-активным путем связывания с PD-L1, активированным на истощенных Т-эффекторных клетках в микроокружении опухоли. Таким образом, мультиспецифичное антитело к LAG-3хPD-L1 или его вариант
10 согласено настоящему изобретению предотвращает передачу сигналов, ингибирующих Т-клетки, и повышает противоопухолевый иммунитет.

В отдельных вариантах осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант имеет аффинность связывания с LAG-3 человека в диапазоне приблизительно 1-2 нМ, в частности, в диапазоне приблизительно 1,45-1,93 нМ, при измерении с помощью ППР, как описано в настоящем документе. Термин «приблизительно»
20 допускает отклонение на 10% от указанных значений.

В отдельных вариантах осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант имеет аффинность связывания с LAG-3 человека в диапазоне 1-2 нМ, в частности, в диапазоне 1,45-1,93 нМ, при измерении с помощью ППР, как описано в настоящем документе.

25 В отдельных вариантах осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант имеет аффинность связывания с PD-L1 человека в диапазоне 0,1-0,5 нМ, в частности, в диапазоне 0,17-0,41 нМ, при измерении с помощью ППР, как описано в настоящем документе.

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложено
30 мультиспецифичное антитело, содержащее связывающий домен, который связывается с LAG-3, и связывающий домен, который связывается с PD-L1, или его вариант, который сохраняет специфичность связывания указанного антитела, причём указанное антитело или вариант имеет более высокую аффинность к LAG-3 яванского макака по сравнению с эталонным антителом, содержащим две переменные области тяжелой

цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, и две переменные области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, и более высокую аффинность к PD-L1 яванского макака по сравнению с эталонным антителом, содержащим две

5 переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, и две переменные области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26.

Определение того, имеет ли мультиспецифичное антитело или его вариант более высокую аффинность связывания, чем эталонное антитело, может быть

10 выполнено путем измерения аффинности связывания как мультиспецифичного антитела или его варианта, так и эталонного антитела в одном и том же типе анализа с использованием одних и тех же условий анализа. Таким образом, в отдельных вариантах осуществления аффинность связывания мультиспецифичного антитела или его варианта и аффинность связывания эталонного антитела измеряют в одном и том

15 же типе анализа с использованием одних и тех же условий анализа. В отдельных вариантах осуществления анализ представляет собой анализ, в котором используется поверхностный плазмонный резонанс (ППР). ППР представляет собой анализ, в котором используется поверхностный плазмонный резонанс (ППР) для измерения аффинности связывания, такой как биосенсорная система Biacore® или система

20 равновесного титрования 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 LAG-3- и PD-L1-связывающих доменов, представленные в настоящем документе, получены способом, описанным в примере 3.

Вкратце, Fcγ к huIgG ковалентно связывают с поверхностью сенсорного чипа CM5 с

25 использованием химии свободных аминов. Мультиспецифичные антитела вводят в концентрациях до 20 нМ при 30 мкл/мин в течение 2 минут в проточную ячейку. Затем антиген (0,6-20 нМ) пропускают по поверхности сенсорного чипа CM5 при 30 мкл/мин в течение 2 минут. Получают сенсограммы фаз ассоциации и диссоциации для различных антигенов. С помощью программного обеспечения для оценки ВИА и

30 аппроксимации кривой с использованием модели взаимодействия 1:1 (для одновалентного взаимодействия) определяют аффинности отдельных плеч Fab.

В отдельных вариантах осуществления аффинность связывания измеряют с помощью мультиспецифичного антитела к LAG-3хPD-L1 согласно настоящему изобретению в двухвалентном биспецифичном формате и эталонного антитела к LAG-

3 человека в двухвалентном биспецифичном формате IgG. Таким образом, аффинность связывания мультиспецифичного антитела к LAG-3 человека представляет собой одновалентную аффинность связывания.

5 В отдельных вариантах осуществления аффинность связывания измеряют с помощью мультиспецифичного антитела к LAG-3хPD-L1 согласно настоящему изобретению в двухвалентном биспецифичном формате и эталонного антитела к PD-L1 человека в двухвалентном биспецифичном формате IgG. Таким образом, аффинность связывания мультиспецифичного антитела к PD-L1 человека представляет собой одновалентную аффинность связывания.

10 В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта обладает по меньшей мере в десять, предпочтительно в десять-двадцать, раз более высокой аффинностью связывания с LAG-3 яванского макака по сравнению с эталонным доменом, связывающим LAG-3 человека, как описано в настоящем документе, при измерении с помощью ППР, как описано в настоящем документе.

15 В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или его варианта обладает в десять раз более высокой аффинностью связывания с LAG-3 яванского макака по сравнению с эталонным доменом, связывающим LAG-3 человека, как описано в настоящем документе, при измерении с помощью ППР, как описано в настоящем документе.

20 В отдельных вариантах осуществления PD-L1-связывающий домен мультиспецифичного антитела или варианта обладает по меньшей мере в десять, предпочтительно в десять-пятьдесят, в частности, в десять-сорок, в десять-тридцать, в десять-двадцать, раз более высокой аффинностью связывания с PD-L1 яванского макака по сравнению с эталонным доменом, связывающим PD-L1 человека, как описано в настоящем документе, при измерении с помощью ППР, как описано в настоящем документе.

25 В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или варианта обладает аффинностью связывания с LAG-3 яванского макака в диапазоне приблизительно 0,1-2 нМ, в частности, в диапазоне приблизительно 0,3-1,5 нМ; приблизительно 0,35-1,5 нМ или приблизительно 0,4-1,2 нМ, более конкретно, в диапазоне приблизительно 0,41-1,15 нМ, при измерении с помощью ППР, как описано в настоящем документе. Термин «приблизительно» допускает отклонение на 10% от указанных значений.

В отдельных вариантах осуществления LAG-3-связывающий домен мультиспецифичного антитела или варианта обладает аффинностью связывания с LAG-3 яванского макака в диапазоне 0,1-2 нМ, в частности, в диапазоне 0,3-1,5 нМ; 0,35-1,5 нМ или 0,4-1,2 нМ, более конкретно, в диапазоне 0,41-1,15 нМ, при измерении с помощью ППР, как описано в настоящем документе.

В отдельных вариантах осуществления PD-L1-связывающий домен мультиспецифичного антитела или варианта обладает аффинностью связывания с PD-L1 яванского макака в диапазоне приблизительно 0,05-1 нМ, в частности, в диапазоне приблизительно 0,05-0,5 нМ; приблизительно 0,1-0,4 нМ или приблизительно 0,1-0,35 нМ, более конкретно, в диапазоне приблизительно 0,15-0,34 нМ, при измерении с помощью ППР, как описано в настоящем документе. Термин «приблизительно» допускает отклонение на 10% от указанных значений.

В отдельных вариантах осуществления PD-L1-связывающий домен мультиспецифичного антитела или варианта обладает аффинностью связывания с PD-L1 яванского макака в диапазоне 0,05-1 нМ, в частности, в диапазоне 0,05-0,5 нМ; 0,1-0,4 нМ или 0,1-0,35 нМ, более конкретно, в диапазоне 0,15-0,34 нМ, при измерении с помощью ППР, как описано в настоящем документе.

В отдельных вариантах осуществления аффинность связывания с LAG-3 яванского макака измеряют как с LAG-3-связывающим доменом мультиспецифичного антитела, так и с эталонным анти-LAG-3-связывающим доменом в двухвалентном биспецифичном формате IgG. Двухвалентный биспецифичный формат IgG может, например, содержать LAG-3-связывающий домен согласно настоящему изобретению или эталонного антитела и связывающий домен, который связывает PD-L1 или другую неродственную мишень. Таким образом, измеряют одновалентное взаимодействие с LAG-3 яванского макака.

В отдельных вариантах осуществления аффинность связывания с PD-L1 яванского макака измеряют как с PD-L1-связывающим доменом мультиспецифичного антитела, так и с эталонным PD-L1-связывающим доменом в двухвалентном биспецифичном формате IgG. Двухвалентный биспецифичный формат IgG может, например, содержать PD-L1-связывающий домен согласно настоящему изобретению или эталонного антитела и связывающий домен, который связывает LAG-3 или другую неродственную мишень. Таким образом, измеряют одновалентное взаимодействие с PD-L1 яванского макака.

В отдельных вариантах осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант способно усиливать пролиферацию CD4⁺ и/или CD8⁺ опухолев-инфильтрирующих Т-клеток. В отдельных вариантах осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант способно увеличивать количество CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток, в частности, пролиферирующих CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток, в микроокружении опухоли. Это можно определить, например, путем измерения количества CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток, в частности, пролиферирующих CD4⁺ и/или CD8⁺ Т-клеток, в биоптате опухоли, как описано, например, в примере 4.

В отдельных вариантах осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант приводит к уменьшению количества регуляторных Т-клеток в микроокружении опухоли по сравнению с количеством регуляторных Т-клеток в ответ на комбинацию эталонных антител, как описано в настоящем документе.

В отдельных вариантах осуществления мультиспецифичное антитело или его вариант представляет собой полноразмерное антитело, в частности, полноразмерное биспецифичное антитело, более конкретно, полноразмерное биспецифичное антитело IgG1.

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложен вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи LAG-3-связывающего домена, как описано в настоящем документе, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи PD-L1-связывающего домена, как описано в настоящем документе. В отдельных вариантах осуществления вектор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую область CH1 и предпочтительно шарнирную область, область CH2 и CH3. В отдельных вариантах осуществления вектор дополнительно содержит по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий переменную область легкой цепи, и предпочтительно область CL. В отдельных вариантах осуществления переменная область легкой цепи представляет собой переменную область легкой цепи, которая способна спариваться с несколькими тяжелыми цепями, имеющими разные эпитопные специфичности.

В настоящем изобретении дополнительно предложена клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи LAG-3-связывающего домена, как описано в настоящем документе, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи PD-L1-связывающего домена, как описано в настоящем

документе. В отдельных вариантах осуществления клетка может дополнительно содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую область СН1 и предпочтительно шарнирную область, область СН2 и СН3. В отдельных вариантах осуществления клетка может дополнительно содержать по меньшей мере одну

5 полинуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи, и предпочтительно область CL. В отдельных вариантах осуществления переменная область легкой цепи представляет собой переменную область легкой цепи, которая способна спариваться с несколькими тяжелыми цепями, имеющими разные эпитопные специфичности.

10 В настоящем изобретении дополнительно предложена клетка, продуцирующая мультиспецифичное антитело или его вариант, как описано в настоящем документе. В отдельных вариантах осуществления клетка представляет собой рекомбинантную клетку, которая была трансформирована вектором, как описано в настоящем документе.

15 Кроме того, в настоящем документе предложен способ получения мультиспецифичного антитела или его варианта согласно настоящему изобретению, включающий культивирование клетки, как описано в настоящем документе, и выделение мультиспецифичного антитела или его варианта из указанной клетки или супернатанта.

20 Кроме того, в настоящем документе предложен способ получения варианта LAG-3-связывающего домена и/или PD-L1-связывающего домена согласно настоящему изобретению, включающий:

- генерирование варианта последовательности переменной области тяжелой цепи, как описано в настоящем документе; и

25 - экспрессию указанного варианта или вариантов последовательности и переменной области легкой цепи, как описано в настоящем документе, в клетке.

Способы получения вариантов последовательности хорошо известны в данной области техники. Можно использовать случайный подход при генерации вариантов последовательностей или направленный подход, целью которого, например, может

30 быть введение вариаций, которые, вероятно, будут увеличивать или уменьшать аффинность связывания. В данной области техники широко известны стандартные способы созревания аффинности связывающих доменов антитела, см., например, Tabasinezhad M. *et al.* Immunol Lett. 2019;212:106-113. Целью также может быть введение вариаций, которые снижают риски при промышленном производстве, с

целью получения связывающего домена или мультиспецифичного антитела, содержащего такой связывающий домен, в больших масштабах. Могут быть введены вариации, которые, вероятно, не приведут к потере специфичности связывания и/или не повлияют на аффинность связывания. Разрешенные замены включают, не
5 ограничиваясь перечисленным, замены, которые приводят к схожим биофизическим свойствам варианта, например, замены изолейцина на лейцин или валин, треонин на серин, аргинин на лизин, аспартат на глутамат и триптофан на тирозин. Вариации также могут быть введены в определенные положения на основе частоты в зародышевых линиях или естественных репертуарах.

10 То, можно ли заменить аминокислотные остатки в CDR и/или каркасных областях, например, консервативным аминокислотным остатком, и без, или практически без, потери специфичности связывания и/или аффинности, можно определить с помощью способов, хорошо известных в данной области техники. Экспериментальные примеры включают, не ограничиваясь перечисленным,
15 аланиновое сканирование (Cunningham BC, Wells JA. Science. 1989;244(4908):1081-5) и глубокое мутационное сканирование (Araya CL, Fowler DM. Trends Biotechnol. 2011;29(9):435-42). Также были разработаны вычислительные способы, которые могут прогнозировать влияние аминокислотной вариации, такие как, например, описанные в Sruthi CK, Prakash M. PLoS One. 2020;15(1):e0227621, Choi Y. et al. PLoS One.
20 2012;7(10):e46688, и Munro D, Singh M. Bioinformatics. 2020;36(22-23):5322-9.

Кроме того, в настоящем документе предложены мультиспецифичные антитела, содержащие любой вариант LAG-3- и/или PD-L1-связывающих доменов, полученные вышеуказанным способом; фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифичное антитело, которое содержит любой из указанных вариантов LAG-
25 3- и/или PD-L1-связывающих доменов; нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из указанных вариантов связывающих доменов; векторы и клетки, содержащие указанные нуклеиновые кислоты; и применение мультиспецифичного антитела, содержащего любой из указанных вариантов LAG-3- и/или PD-L1-связывающих доменов, или указанной фармацевтической композиции для лечения рака.

30

Фармацевтическая композиция и способы

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифичное антитело или его

вариант, как описано в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

5 В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложено мультиспецифичное антитело или его вариант, или фармацевтическая композиция, как описано в настоящем документе, для применения в качестве лекарственного средства.

10 В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложено мультиспецифичное антитело или его вариант, как описано в настоящем документе, или фармацевтическая композиция, как описано в настоящем документе, для применения при лечении заболевания, связанного с супрессией иммунной системы, в частности, рака.

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения заболевания, включающий введение эффективного количества мультиспецифичного антитела или его варианта, или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, нуждающемуся в этом индивидууму.

15 В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения заболевания, связанного с супрессией иммунной системы, в частности, рака, включающий введение эффективного количества мультиспецифичного антитела или его варианта, или фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе, нуждающемуся в этом индивидууму.

20 В контексте настоящего документа 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 тому подобное (например, пациенту, такому как пациент-человек, страдающему раком).

25 Термины «лечить», «осуществление лечения» и «лечение» в контексте настоящего документа относятся к любому типу вмешательства или процесса, выполняемого в отношении субъекта, или введению активного агента или комбинации активных агентов субъекту с целью излечения или положительной динамики заболевания или его симптома. Это включает реверсию, облегчение, купирование, ингибирование или замедление симптома, осложнения, патологического состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием, а также предотвращение возникновения, прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения, патологического состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием.

30

В контексте настоящего документа «эффективное лечение» или «положительный терапевтический ответ» относится к лечению, обеспечивающему благоприятный эффект, например, купированию по меньшей мере одного симптома заболевания или расстройства, например, рака. Положительный эффект может иметь вид улучшения по сравнению с исходным уровнем, включая улучшение по сравнению с измерением или наблюдением, сделанным до начала терапии в соответствии со способом. Например, положительный эффект может иметь вид замедления, стабилизации, остановки или обращения вспять прогрессирования рака у субъекта на любой клинической стадии, о чем свидетельствует снижение или устранение клинического или диагностического симптома заболевания или маркера рака. Эффективное лечение может, например, уменьшать размер опухоли, уменьшать наличие циркулирующих опухолевых клеток, уменьшать или предотвращать метастазы опухоли, замедлять или останавливать рост опухоли и/или предотвращать или задерживать рецидив или повторное проявление опухоли.

Термин «терапевтическое количество» или «эффективное количество» относится к количеству агента или комбинации агентов, которое обеспечивает желаемый биологический, терапевтический и/или профилактический результат. Указанный результат может представлять собой уменьшение, купирование, паллиативное лечение, уменьшение, задержку и/или облегчение одного или более признаков, симптомов или причин заболевания, или любое другое желаемое изменение биологической системы. В отдельных вариантах осуществления терапевтическое количество представляет собой количество, достаточное для задержки развития опухоли. В отдельных вариантах осуществления терапевтическое количество представляет собой количество, достаточное для предотвращения или задержки рецидива опухоли.

Эффективное количество агента или композиции может: (i) уменьшать количество раковых клеток; (ii) уменьшать размер опухоли; (iii) ингибировать, замедлять, замедлять до некоторой степени и может останавливать инфильтрацию раковыми клетками периферических органов; (iv) ингибировать метастазы опухоли; (v) ингибировать рост опухоли; (vi) предотвращать или отсрочивать возникновение и/или рецидив опухоли; и/или (vii) облегчать до некоторой степени один или более симптомов, связанных с раком.

Эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, возраст, пол и масса индивидуума,

подлежащего лечению, и способность агента или комбинации агентов вызывать желаемый ответ у индивидуума.

Эффективное количество может быть введено в один или более приемов.

5 Терапевтическое количество также включает количество, которое уравнивает любые токсические или вредные эффекты агента или комбинации агентов и терапевтически благоприятные эффекты.

Термин «агент» относится к терапевтически активному веществу, в данном случае мультиспецифичному антителу или его варианту согласно настоящему изобретению, или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

10

Общие определения

15 В контексте настоящего документа «содержать» и его спряжения используются в неограничивающем смысле для обозначения того, что элементы, следующие за этим словом, включены, но не исключены специально не упомянутые элементы.

Термины в единственном числе используются в настоящем документе для обозначения одного или более грамматических объектов изделия. Например, «элемент» означает один или более элементов.

20 Ссылка в настоящем документе на патентный документ или материал не должна рассматриваться как признание того, что этот документ или материал был известен, или что содержащаяся в нем информация была частью общей информации, известной на дату приоритета любого из пунктов формулы изобретения.

25 Все ссылки на патенты и литературу, цитированные в настоящем описании, настоящим включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Следует отметить, что в настоящем описании, если не указано иное, положения аминокислот, отнесенные к CDR и каркасам в переменной области антитела или фрагмента антитела, указаны в соответствии с нумерацией согласно Kabat (см. Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, 30 Md., 1987 and 1991)). Аминокислоты в константных областях указаны в соответствии с системой нумерации EU.

Регистрационные номера в первую очередь приведены для обеспечения дополнительного способа идентификации мишени, фактическая последовательность связанного белка может варьироваться, например, из-за мутации в кодирующем гене,

такой как мутации, встречающиеся при некоторых видах рака, или тому подобного. Антигенсвязывающий сайт связывает антиген и различные его варианты, например, экспрессируемые некоторыми антиген-положительными иммунными или опухолевыми клетками.

5 Когда в настоящем документе приводится ссылка на ген, белок, указанная ссылка предпочтительно относится к человеческой форме этого гена или белка. Когда в настоящем документе приводится ссылка на ген или белок, указанная ссылка относится к природному гену или белку и вариантным формам гена или белка, которые могут быть обнаружены в опухолях, злокачественных новообразованиях и т. п.,
10 предпочтительно которые могут быть обнаружены в опухолях, злокачественных новообразованиях и т. п. человека.

 HGNC означает комитет по номенклатуре генов в составе организации HUGO. Число после аббревиатуры представляет собой регистрационный номер, с помощью которого информация о гене и белке, кодируемых геном, может быть получена из базы
15 данных HGNC. Entrez Gene предоставляет регистрационный номер или идентификатор гена, с помощью которого информация о гене или белке, кодируемом геном, может быть получена из базы данных NCBI (Национальный центр биотехнологической информации). Ensemble предоставляет регистрационный номер, с помощью которого информация о гене или белке, кодируемом геном, может быть получена из базы
20 данных Ensemble. Ensembl - это совместный проект EMBL-EBI и Wellcome Trust Sanger Institute по разработке технологического решения, которое производит и поддерживает автоматическую аннотацию выбранных эукариотических геномов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

25 На фигурах двухвалентные моноспецифичные антитела представлены в формате SEQ ID NO: A, где SEQ ID NO: A относится к вариательной последовательности тяжелой цепи обоих связывающих доменов. Каждый связывающий домен моноспецифичных антител содержит легкую цепь. В примерах,
30 которые используются для иллюстрации настоящего изобретения, но никоим образом не подразумевают ограничения настоящего изобретения, каждый связывающий домен моноспецифичных антител содержит вариательную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, и константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 43. Моноспецифичные антитела предпочтительно представляют собой антитела IgG1, содержащие CH1, шарнир, CH2 и CH3. В примерах, которые используются для иллюстрации настоящего изобретения, но никоим образом не подразумевают ограничения настоящего изобретения,

5 моноспецифичные антитела подвергали скринингу в формате IgG1, причем LAG-3- и PD-L1-связывающие тяжелые цепи содержат CH1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, CH2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, и CH3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47.

10 Биспецифичные антитела представлены в формате SEQ ID NO: A x SEQ ID NO: B, где обе из SEQ ID NO: A и B относятся к переменным последовательностям тяжелой цепи. Каждый связывающий домен биспецифичных антител содержит легкую цепь. В примерах, которые используются для иллюстрации настоящего изобретения, но никоим образом не подразумевают ограничения настоящего изобретения, каждый

15 связывающий домен биспецифичных антител содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, и константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43. Биспецифичные антитела представляют собой антитела IgG1, содержащие CH1, шарнир, CH2 и CH3.

20 В примере 1, который используется для иллюстрации настоящего изобретения, но никоим образом не подразумевает ограничения настоящего изобретения, биспецифичные антитела подвергали скринингу в формате IgG1, причем PD-L1-связывающая тяжелая цепь содержит CH1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, CH2, который может иметь

25 аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, и CH3, который может иметь аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50; и LAG-3-связывающая тяжелая цепь содержит CH1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, CH2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, и

30 CH3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51.

В примере 2, который используется для иллюстрации настоящего изобретения, но никоим образом не подразумевает ограничения настоящего изобретения, биспецифичные антитела подвергали скринингу в формате IgG1, причем PD-L1-

связывающая тяжелая цепь содержит CH1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, CH2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, и CH3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50; и

5 LAG-3-связывающая тяжелая цепь содержит CH1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, CH2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, и CH3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51.

В примерах 3 и 4, которые используются для иллюстрации настоящего изобретения, но никоим образом не подразумевают ограничения настоящего изобретения, биспецифичные антитела подвергали скринингу в формате IgG1.

Для SEQ ID NO: 17 x SEQ ID NO: 24 PD-L1-связывающая тяжелая цепь содержит CH1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, CH2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, и CH3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50; и LAG-3-связывающая тяжелая цепь содержит CH1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, CH2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, и CH3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51.

Для SEQ ID NO: 5 x SEQ ID NO: 20 PD-L1-связывающая тяжелая цепь может содержать CH1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, CH2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, и CH3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51; и LAG-3-связывающая тяжелая цепь содержит CH1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, CH2, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, и CH3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50.

30 В примере 5, который используется для иллюстрации настоящего изобретения, но никоим образом не подразумевает ограничения настоящего изобретения, биспецифичные антитела подвергали скринингу в формате IgG, причем PD-L1-связывающая тяжелая цепь содержит CH1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, CH2, имеющий

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, и CH3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50 или 51; и LAG-3-связывающая тяжелая цепь содержит CH1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, CH2, имеющий

5 аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45, и CH3, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 51 или 50, как указано в таблице 10. Двухвалентное моноспецифичное антитело-аналог релатлимаба и двухвалентное моноспецифичное антитело-аналог атезолизумаба представлены в формате SEQ ID NO: A/SEQ ID NO: B, где SEQ ID NO: A относится к

10 соответствующей последовательности тяжелой цепи, а SEQ ID NO: B относится к соответствующей последовательности легкой цепи. Двухвалентное моноспецифичное антитело-аналог релатлимаба содержит два LAG-3-связывающих домена. Двухвалентное моноспецифичное антитело-аналог атезолизумаба содержит два PD-L1-связывающих домена. Каждый связывающий домен антител-аналогов содержит

15 легкую цепь. Комбинация аналогов релатлимаба и атезолизумаба представлены 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, а SEQ ID NO: B относится к последовательности легкой цепи аналога релатлимаба или атезолизумаба, и SEQ ID NO: C - к последовательности тяжелой цепи, а SEQ ID NO: D - к последовательности

20 легкой цепи второго аналога.

На **фиг. 1А** показаны результаты связывания LAG-3 методом FACS.

Биспецифичные антитела, содержащие переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO:

25 23 (a), SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 23 (b), SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 23 (c), SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 23 (d), SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 23 (e) и SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 23 (f), сравнивали с двухвалентными моноспецифичными антителами, содержащими соответствующие LAG-3-связывающие домены, положительным контролем, представляющим собой аналог релатлимаба (SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO:

30 28), и антителом отрицательного контроля (SEQ ID NO: 29/SEQ ID NO: 30). На каждом графике показан результат связывания с LAG-3 человека и макака-резуса.

На оси X показана концентрация антитела в мкг/мл. На оси Y показан уровень связывания, выраженный в средней интенсивности флуоресценции (MFI).

На **фиг. 1В** показаны результаты связывания PD-L1 методом FACS.

Биспецифичные антитела, содержащие переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 6 и
 5 SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 23, и SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 23, сравнивали с двухвалентным моноспецифичным антителом, содержащим PD-L1-связывающий домен, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, положительным контролем, представляющим собой аналог атезолизумаба (SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO: 26), и антителом отрицательного контроля
 10 (SEQ ID NO: 29/SEQ ID NO: 30). На верхнем графике показан результат связывания с PD-L1 человека; на нижнем графике показан результат связывания с PD-L1 макака-резуса.

На оси X показана концентрация антитела в мкг/мл. На оси Y показан уровень связывания, выраженный в средней интенсивности флуоресценции (MFI).

15 На **фиг. 2** показаны результаты репортерного анализа PD-1/LAG-3.

Биспецифичные антитела, содержащие переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 6 и
 20 SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 23, и SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 23, сравнивали с положительным контролем, представляющим собой аналог атезолизумаба (SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO: 26), положительным контролем, представляющим собой аналог релатлимаба (SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 28), комбинацией аналогов атезолизумаба и релатлимаба (SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO: 26 +
 25 SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 28) и антителом отрицательного контроля (SEQ ID NO: 29/SEQ ID NO: 30).

На оси X показана концентрация антитела в мкг/мл. На оси Y показана кратность индукции.

На **фиг. 3** показаны результаты анализа с использованием SEB от донора 1 (фиг. 3А) и донора 2 (фиг. 3В).

30 На **фиг. 3А1** и **3В1** показано сравнение кратности индукции IL-2

биспецифичными антителами, содержащими переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 23, и SEQ ID NO: 16 и SEQ ID

NO: 23, и положительным контролем, представляющим собой аналог атезолизумаба (SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO: 26), комбинацией аналогов атезолизумаба и релатлимаба (SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO:26 + SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 28) и антителом отрицательного контроля (SEQ ID NO: 29/SEQ ID NO: 30).

5 На фиг. 3A2 и 3B2 показано сравнение кратности индукции TNF α теми же антителами.

На оси X показана концентрация антитела в мкг/мл. На оси Y показана кратность индукции IL-2 или TNF α . Кратность индукции для каждого антитела рассчитывали относительно контрольных лунок, не содержащих IgG.

10 На **фиг. 4** показаны данные по аффинности связывания для двух биспецифичных антител.

На **фиг. 5** показаны результаты для двух биспецифичных антител в анализе связывания методом FACS, репортерном анализе PD-1/LAG-3 и анализе с использованием SEB.

15 На фиг. 5A сравнивается связывание с LAG-3 человека биспецифичных антител, содержащих вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 24, и SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 20, с таковым для положительного контроля, представляющего собой аналог релатлимаба (SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO:28), и антитела отрицательного

20 контроля.

На фиг. 5B сравнивается связывание с LAG-3 макака-резуса тех же антител.

На фиг. 5C сравнивается связывание с PD-L1 человека биспецифичных антител, содержащих вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 24, и SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 20, с таковым для положительного контроля, представляющего собой аналог атезолизумаба (SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO:26), и антитела отрицательного

25 контроля.

На фиг. 5D сравнивается связывание с PD-L1 макака-резуса тех же антител.

На оси X показана концентрация антитела в мкг/мл. На оси Y показан уровень связывания, выраженный в средней интенсивности флуоресценции (MFI).

30

На фиг. 5E показаны результаты репортерного анализа PD-1/LAG-3, в котором биспецифичные антитела, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 24, и SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 20, сравнивали с положительными контролями,

представляющими собой аналог атезолизумаба (SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO:26) и аналог релатлимаба (SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO:28), комбинацией аналогов релатлимаба и атезолизумаба (SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO:28 + SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO: 26) и антителом отрицательного контроля.

5 На фиг. 5F показаны результаты анализа с использованием SEB, в котором сравнивали кратность индукции IL-2 биспецифичными антителами, содержащими
вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность,
представленную в SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 24, и SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 20, с
таковой для положительных контролей, представляющих собой аналог атезолизумаба
10 (SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO:26) и аналог релатлимаба (SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO:28),
комбинации аналогов релатлимаба и атезолизумаба (SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO:28 +
SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO: 26) и антитела отрицательного контроля, у четырех разных
доноров. На четырех графиках представлены результаты для четырех разных доноров.
На оси X показана концентрация антитела в мкг/мл. На оси Y показана концентрация
15 IL-2 в пг/мл.

На **фиг. 6** показаны данные исследования *in vivo*. Оценивали влияние на объем
опухоли мышей hu-CD34 NSG™ с опухолями MDA-MB-231 для биспецифичных
антител, содержащих вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную
последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 24, и SEQ ID NO:
20 5 и SEQ ID NO: 20, и сравнивали с аналогом атезолизумаба (атезолизумаб*), аналогом
релатлимаба (релатлимаб*) и комбинацией аналогов релатлимаба и атезолизумаба
(релатлимаб* + атезолизумаб*).

На фиг. 6A1 показаны данные мышей, иммунизированных CD34⁺ HSC от
донора 1, на фиг. 6A2 - данные мышей, иммунизированных CD34⁺ HSC от донора 2, и
25 на фиг. 6A3 - данные мышей, иммунизированных CD34⁺ HSC от донора 3. На фиг. 6A4
показаны данные от всех доноров в совокупности.

На фиг. 6B показаны результаты анализа популяций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и
регуляторных Т-клеток (Treg) в образцах опухолей MDA-MB-231. Влияние на
процентное содержание CD3⁺ Т-клеток (фиг. 6B1), CD8⁺ Т-клеток (фиг. 6B2),
30 регуляторных FOXP3⁺ Т-клеток (фиг. 6B3), пролиферирующих CD8⁺ Т-клеток (фиг.
6B4) и пролиферирующих CD4⁺ Т-клеток (фиг. 6B5) оценивали для биспецифичных
антител, содержащих вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную
последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 24, и SEQ ID NO:

5 и SEQ ID NO: 20, и сравнивали с аналогом атезолизумаба, аналогом релатлимаба и комбинацией аналогов релатлимаба и атезолизумаба.

На **фиг. 7** показаны результаты анализа связывания методом FACS.

Биспецифичные антитела, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую
5 аминокислотную последовательность, представленную в таблице 10, тестировали вместе с контрольным антителом к RSV (SEQ ID NO: 29/SEQ ID NO: 30). На оси X показана концентрация антитела в мкг/мл. На оси Y показана кратность индукции, полученная путем нормализации средних значений MFI относительно значений в лунках без антитела.

10 На **фиг. 7A** показаны результаты связывания с LAG-3 человека.

На **фиг. 7B** показаны результаты связывания с LAG-3 макака-резуса.

На **фиг. 7C** показаны результаты связывания с PD-L1 человека.

На **фиг. 8** показаны результаты репортерного анализа PD-1/LAG-3.

Биспецифичные антитела, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую
15 аминокислотную последовательность, представленную в таблице 10, сравнивали с комбинацией аналогов атезолизумаба и релатлимаба (SEQ ID NO: 25/SEQ ID NO:26 + SEQ ID NO: 27/SEQ ID NO: 28) и контрольным антителом к RSV (SEQ ID NO: 29/SEQ ID NO: 30).

20 На оси X показана концентрация антитела в мкг/мл. На оси Y показана кратность индукции.

Следующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение, но никоим образом не подразумевают ограничения настоящего изобретения.

25 ПРИМЕРЫ

Пример 1 – Получение и идентификация биспецифичных антител к LAG-3xPD-L1

30 Домены, связывающие LAG-3 человека, могут быть получены способами, известными в данной области техники, такими как, например, описанные в WO 2019/009728. Большую панель вариабельных областей тяжелой цепи получали путем иммунизации трансгенных мышей, содержащих общую легкую цепь IGKV1-39 (мыши

MeMo®), антигенными фрагментами LAG-3 человека, включая применение различных форм доставки ДНК, белка и клеточной доставки антигена.

Домены, связывающие PD-L1 человека, могут быть получены способами, известными в данной области техники, такими как, например, описанные в WO 2018/056821 и WO 2019/009726. Большую панель переменных областей тяжелой цепи получали путем иммунизации трансгенных мышей, содержащих общую легкую цепь IGKV1-39 (мыши MeMo®), антигенными фрагментами PD-L1 человека, включая применение различных форм доставки ДНК, белка и клеточной доставки антигена.

10 Был выбран ряд Fab к LAG-3 человека, переменные области тяжелой цепи которых использовали для получения биспецифичных антител к LAG-3 x PD-L1. Аминокислотные последовательности этих переменных областей тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 1-16. Fab, содержащие эти переменные области тяжелой цепи, связывают домен 1 или домен 2 LAG-3 человека и демонстрируют функциональную активность в репортерном анализе LAG-3 (данные не показаны).

15 Были выбраны два дополнительных Fab, переменные области тяжелой цепи которых содержат аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 18 и 19. Fab, содержащие эти переменные области тяжелой цепи, связывают домен 3 и домен 4 LAG-3 человека. Эти два Fab не проявляли функциональной активности в репортерном анализе LAG-3 и были отобраны для получения биспецифичных антител отрицательного контроля.

20 Был выбран ряд Fab к PD-L1 человека, переменные области тяжелой цепи которых использовали для получения биспецифичных антител. Аминокислотные последовательности этих переменных областей тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 21-23. Fab, содержащие эти переменные области тяжелой цепи, блокируют связывание PD-L1 с PD-1 (данные не показаны). Переменные домены тяжелой цепи проявляют различную аффинность, как определено в биспецифичном формате IgG, содержащем один PD-L1-связывающий Fab и один отличающийся Fab (связывающий столбчатый анатоксин (ТТ) или анти-PD-1), при измерении с помощью ППР. Таким образом была измерена аффинность связывания одновалентного взаимодействия с PD-L1.

30 Аффинность к PD-L1 плеч Fab к PD-L1 определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Аффинность измеряли в биспецифичном формате IgG, имеющем только одно плечо, специфичное к PD-L1. Для определения кинетики связывания плеч Fab к PD-L1 с антигеном использовали поверхностный плазмонный

резонанс (SPR) с использованием BIAcore T100. Рекомбинантный, очищенный, Fc-меченый PD-L1 человека (R&D Systems, кат. № 156-B7-100) связывали с проточной ячейкой (FC) 2 сенсорного чипа CM5 (FC1 служила холостой ячейкой для вычитания и ее активировали, а затем инактивировали непосредственно с использованием этаноламина) до уровня приблизительно 200 резонансных единиц (RU) с использованием химии NHS/EDC при pH 5,0 (буфер NaAc), концентрации антигена 2 мкг/мл и скорости потока 10 мкл/мин. Затем биспецифичный IgG, состоящий из плеча Fab к PD-L1 и нерелевантного плеча Fab, пропускали по поверхности FC1 и 2 в различных концентрациях (100 нМ и последовательные 2-кратные разведения в HBS, 6 разведений) в кинетическом цикле при 30 мкл/мин. Регенерацию проводили с использованием импульса 50 мМ HCl в воде (15 мкл при скорости потока 10 мкл/мин). Полученные сенсограммы оценивали с использованием программного обеспечения BIAevaluation и определяли кинетические константы скорости ассоциации и диссоциации. Несколько измерений проводили на разных поверхностях разных размеров в течение нескольких дней. Разные измерения дали очень похожие результаты, что подчеркивает их достоверность. Все измерения проводили при 25 °С.

Аффинности связывания представлены в таблице 2.

IgG, содержащий:	Аффинность связывания (нМ)
SEQ ID NO: 21	2,5
SEQ ID NO: 22	5,5
SEQ ID NO: 23	0,6

Таблица 2.

Биспецифичные антитела IgG получали путем временной совместной трансфекции двух плазмидных векторов: одного, кодирующего тяжелую цепь IgG с LAG-3-связывающей областью VH, и другого, кодирующего тяжелую цепь IgG с PD-L1-связывающей областью VH. Для обеспечения эффективной гетеродимеризации и образования биспецифичных антител использовали технологию конструирования CH3, описанную в WO 2013/157954 и WO 2013/157953. Оба вектора дополнительно кодируют общую легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи IGKV1-39/Jk1. Трансфекцию клеток, культивирование клеток, а также сбор и очистку антител проводили способами, известными в данной области техники.

Пример 2 – Скрининг биспецифичных антител к LAG-3 x PD-L1*Эталонные и контрольные антитела*

5 Биспецифичные антитела сравнивали с антителом-аналогом релатлимаба к LAG-3, которое содержит две переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, и две переменные области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28 (аналог релатлимаба), и антителом-аналогом атезолизумаба к PD-L1, которое содержит две переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, и две переменные области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26 (аналог атезолизумаба), или их комбинацией.

15 В качестве антитела отрицательного контроля (контрольного антитела к RSV) использовали антитело к RSV с подавленным Fc, содержащее две переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29, и две переменные области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30.

20

Был выбран ряд биспецифичных антител для дальнейшего скрининга, включая биспецифичные антитела, содержащие следующую комбинацию переменных областей тяжелой цепи:

VH к LAG-3	VH к PD-L1
SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 23
SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 23
SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 23
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 23
SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 23
SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 23

25

Биспецифичные антитела получали в формате IgG1 с подавленным Fc и очищали с помощью колонки с белком А и гель-фильтрации. Потенциальные гомодимерные примеси удаляли с помощью CIEX. Образование гомодимера LAG-3 было уменьшено с помощью технологии конструирования СНЗ для сокращения

потенциального влияния в функциональных анализах. Моноспецифичные исходные антитела включали в скрининговые анализы для сравнения активности биспецифичных антител с их исходным IgG и для определения чувствительности функциональных анализов для нацеливающих агентов, по отдельности нацеленных на PD-L1 и LAG-3. Моноспецифичные исходные антитела были получены и охарактеризованы аналогично биспецифичным антителам.

Связывание антигена

Связывание биспецифичных антител с LAG-3 и PD-L1 анализировали методом FACS с использованием клеточной линии 293FF, стабильно трансфицированной LAG-3 человека и макака-резуса, и клеточной линии CHO-K1, стабильно трансфицированной PD-L1 человека и макака-резуса.

Биспецифичные антитела и исходные антитела анализировали в 8-стадийном 5-кратном титровании, начиная с 50 мкг/мл. В качестве вторичного антитела использовали козье античеловеческое антитело PE (Invitrogen, H10104) в концентрации 3 мкг/мл. Во всех планшетах, содержащих клетки, экспрессирующие LAG-3, аналог релатлимаба использовали в качестве положительного контроля, тогда как аналог атезолизумаба использовали в качестве положительного контроля для планшетов, содержащих клетки, экспрессирующие PD-L1. 6-стадийное 5-кратное титрование, начиная с 50 мкг/мл контрольного антитела к RSV, включали во все планшеты в качестве отрицательного контроля. В качестве дополнительного контроля использовали две лунки только для вторичного антитела и неокрашенных клеток. В качестве отрицательного контроля были включены клетки, не экспрессирующие мишень, клетки 293FF и CHO-K1, где IgG были протестированы только в двух самых высоких концентрациях (50 и 10 мкг/мл).

Результаты связывания LAG-3 показаны на фиг. 1A. Значения EC50 рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 7.02 (нелинейная регрессия, 3-параметрическая кривая доза-ответ). Каждое из биспецифичных антител наносили на график вместе с антителом положительного контроля, антителом отрицательного контроля и его исходным LAG-3-связывающим антителом.

Антитело-аналог релатлимаба положительного контроля продемонстрировало непоследовательное связывание с LAG-3 человека на трех планшетах, использованных

в этом анализе: степень связывания на планшете с плечом LAG-3, содержащим SEQ ID NO: 16, была намного ниже, чем наблюдаемая на других планшетах. Значения EC50 были выше для биспецифичных антител (одновалентных в отношении LAG-3), чем для моноспецифичных исходных антител (двухвалентных в отношении LAG-3). Плечи к LAG-3, содержащие SEQ ID NO: 3 и 5, продемонстрировали самую высокую степень связывания с LAG-3 человека. Обзор значений EC50 приведен в таблице 3.

Формат	LAG-3	PD-L1	EC50 (нМ) для LAG-3 человека
Одновалентное в отношении LAG-3	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:23	52,13
Двухвалентное в отношении LAG-3	SEQ ID NO:1	н/д	0,54
Одновалентное в отношении LAG-3	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:23	9,45
Двухвалентное	SEQ ID NO:3	н/д	0,40
Одновалентное в отношении LAG-3	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:23	8,64
Двухвалентное в отношении LAG-3	SEQ ID NO:5	н/д	1,88
Одновалентное в отношении LAG-3	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:23	23,92
Двухвалентное в отношении LAG-3	SEQ ID NO:6	н/д	0,80
Одновалентное в отношении LAG-3	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:23	113,16
Двухвалентное в отношении LAG-3	SEQ ID NO:15	н/д	0,94
Одновалентное в отношении LAG-3	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:23	24,05
Двухвалентное в отношении LAG-3	SEQ ID NO:16	н/д	13,27

Таблица 3. Значения EC50.

10

Результаты связывания PD-L1 показаны на фиг. 1В. Значения EC50 рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 7.02 (нелинейная регрессия, 3-параметрическая кривая доза-ответ). Биспецифичные антитела наносили на график вместе с антителом положительного контроля, антителом отрицательного контроля и исходным PD-L1-связывающим антителом.

15

Все биспецифичные антитела продемонстрировали связывание с клетками СНО, экспрессирующими huPD-L1. Максимальный эффект при самой высокой

концентрации лекарственного средства (E_{max}) был выше для биспецифичного антитела, содержащего SEQ ID NO: 23, одновалентного в отношении PD-L1, чем для двухвалентного моноспецифичного исходного антитела. Ряд биспецифичных антител, содержащих плечо к PD-L1, имеющее SEQ ID NO: 23, продемонстрировал лучшее связывание по сравнению с аналогом атезолизумаба или сравнимое с ним связывание. Обзор значений EC_{50} приведен в таблице 4.

Формат	LAG-3	PD-L1	EC_{50} (нМ) для PD-L1 человека
Одновалентное в отношении PD-L1	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:23	0,74
Одновалентное в отношении PD-L1	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:23	3,02
Одновалентное в отношении PD-L1	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:23	1,21
Одновалентное в отношении PD-L1	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:23	1,21
Одновалентное в отношении PD-L1	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:23	2,41
Одновалентное в отношении PD-L1	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:23	1,01
Двухвалентное в отношении PD-L1	н/д	SEQ ID NO:23	0,54
Двухвалентное в отношении PD-L1	н/д	SEQ ID NO: 25	1,12

Таблица 4. Значения EC_{50} .

10

Репортерный анализ PD-1/LAG-3

Репортерный анализ PD-1/LAG-3 проводили с использованием Т-клеток Jurkat, экспрессирующих PD-1 и LAG-3, в качестве эффекторных клеток, и клеток Raji, экспрессирующих PD-L1, в качестве клеток-мишеней. Эффекторные клетки PD-1 и LAG-3 подготавливали и высевали с плотностью 100000 клеток на лунку. Добавляли раствор антитела с последующим добавлением клеток Raji (25000 на лунку). Т-клетки активировали путем добавления частично очищенного стафилококкового энтеротоксина D (ppSED, конечная концентрация 16,6 нг/мл). Через 6 часов инкубации при 37 °C определяли активность репортерного гена люциферазы путем добавления реагента Bio-Glo и измерения люминесценции на планшет-ридере EnVision.

20

Биспецифичные IgG тестировали в 6-стадийном полулогарифмическом титровании, начиная со 100 мкг/мл (конечная концентрация). Разведения IgG готовили в 3-х кратной конечной концентрации в среде для анализа. В качестве положительного контроля в каждый планшет включали 6-стадийное полулогарифмическое титрование комбинации аналога атезолизумаба и аналога релатлимаба с самой высокой концентрацией 50 мкг/мл + 50 мкг/мл. Аналог атезолизумаба и аналог релатлимаба также тестировали в качестве отдельных агентов в начальной концентрации 100 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля в каждом планшете использовали 4-стадийное полулогарифмическое титрование контрольного антитела к RSV, начиная со 100 мкг/мл. Две лунки оставляли без IgG в качестве контроля базального уровня активности.

Результаты показаны на фиг. 2. Биспецифичные антитела сравнивали друг с другом и с аналогом атезолизумаба, аналогом релатлимаба, а также с комбинацией аналогов релатлимаба и атезолизумаба. Площадь под кривой (AUC) ответа антитела определяли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 7.02. AUC выражали относительно AUC положительного контроля.

Обзор AUC приведен в таблице 5.

LAG-3	PD-L1	AUC по сравнению с контролем
SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:23	83,9
SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:23	76,6
SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:23	71,5
SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:23	71,0
SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:23	58,3
SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:23	54,8

Таблица 5. Значения AUC.

20

Анализ с использованием SEB

Биспецифичные антитела и исходные антитела анализировали в анализе с использованием SEB с использованием клеток от двух доноров: донора 1 PBMC и донора 2 PBMC. Во-первых, было показано, что PBMC от этих доноров отвечают на эталонное антитело-аналог релатлимаба к LAG-3 и антитело-аналог атезолизумаба к PD-L1 (данные не показаны). Вкратце, к 2×10^5 клеткам PBMC добавляли серию

25

разведений IgG с последующим добавлением 2 мкг/мл SEB (конечная концентрация). IgG анализировали в 6-стадийной 7-кратной серии разведений, начиная с 50 мкг/мл (конечная концентрация). В качестве положительного контроля в каждый планшет включали 5-кратное титрование комбинации аналога атезолизумаба и аналога релатлимаба, начиная с 25 мкг/мл + 25 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля в каждом планшете использовали 4-стадийное полулогарифмическое титрование контрольного антитела к RSV, начиная со 50 мкг/мл. Две лунки оставляли без IgG в качестве контроля базального уровня активности. PBMC культивировали в течение трех дней, после чего измеряли уровни IL-2 и TNF α в супернатанте с помощью Luminex.

Результаты показаны на фиг. 3. AUC ответа антитела определяли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 7.02.

Стандартные кривые для измерений цитокинов с помощью Luminex были такими, как ожидалось, а значения MFI для всех образцов находились в диапазоне стандартных кривых для IL-2 и TNF α (данные не показаны). Данные для IL-2 из анализа с использованием SEB показаны на фиг. 3A1 (донор1) и фиг. 3B1 (донор2). Данные для TNF α представлены на фиг. 3A2 (донор1) и фиг. 3B2 (донор2).

В первом анализе (донор1 PBMC) положительный и отрицательный контроли соответствовали ожидаемым показаниям по IL-2 и TNF α . Активность комбинации аналогов атезолизумаба и релатлимаба была выше, чем для аналога атезолизумаба в отдельности, в части показания по IL-2. Как для показаний по IL-2, так и для показаний по TNF α биспецифичные антитела к LAG-3xPD-L1 были по меньшей мере столь же активными, как и комбинация аналогов атезолизумаба и релатлимаба.

Во втором анализе (донор2 PBMC) положительный и отрицательный контроли соответствовали ожидаемым по IL-2. Однако степень индукции TNF α для положительного контроля была довольно низкой. Опять же, активность комбинации аналогов атезолизумаба и релатлимаба была выше, чем для аналога атезолизумаба в отдельности, в части показания по IL-2. Для обоих показаний биспецифичные антитела к LAG-3xPD-L1 были по меньшей мере столь же активными, как и комбинация аналогов атезолизумаба и релатлимаба. Активность биспецифичных антител к LAG-3xPD-L1 хорошо коррелировала для двух доноров. Биспецифичные антитела с плечами к LAG-3, имеющими аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16, проявляли схожую друг с другом активность и

были по меньшей мере столь же активными, как и комбинация аналогов атезолизумаба и релатлимаба.

Пример 3 – Аффинность связывания биспецифичных антител, содержащих

5 дополнительные переменные области тяжелой цепи к LAG-3 и PD-L1

Аффинность связывания биспецифичных антител, содержащих LAG-3-
связывающий домен с переменной областью тяжелой цепи, имеющей
аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и PD-L1-
10 связывающий домен с переменной областью тяжелой цепи, имеющей
аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и
биспецифичного антитела, содержащего LAG-3-связывающий домен с переменной
областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность,
представленную в SEQ ID NO: 17, и PD-L1-связывающий домен с переменной
15 областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность,
представленную в SEQ ID NO: 24, определяли с помощью технологии ППР с
использованием VIAcore T200.

Связывание биспецифичного антитела с четырьмя рекомбинантными
белковыми антигенами, полученными от Sino Biological (LAG-3-His человека, кат. №
20 16498-H08H; LAG-3-His яванского макака, кат. № 90841-C08H; PD-L1-His человека,
кат. № 10084-H08H; PD-L1-His яванского макака, кат. № 90251-C08H), определяли в
отдельных экспериментах. В этих анализах Fcγ к huIgG (JIR; кат. № 109-005-098)
ковалентно связывали с поверхностью сенсорного чипа CM5 с использованием химии
свободных аминов: антитело захвата разбавляли в буфере kAc до 40 мкг/мл и
25 связывали с поверхностью, активированной NHS/EDC (в соответствии с
рекомендациями производителя). Затем в проточную ячейку вводили биспецифичные
антитела в концентрациях до 20 нМ при 30 мкл/мин в течение 2 минут. Затем антиген
(0,6-20 нМ) в 0,01 М буфере HEPES, 0,5 М NaCl, 0,003 М ЭДТА и 0,05% об./об.
поверхностно-активного вещества P20 пропускали по поверхности сенсорного чипа
30 CM5 при 30 мкл/мин в течение 2 минут. Таким образом были получены сенсограммы
фаз ассоциации и диссоциации для различных антигенов. С помощью программного
обеспечения для оценки VIA и аппроксимации кривой с использованием модели
взаимодействия 1:1 (для одновалентного взаимодействия) определяли аффинности
отдельных плеч Fab.

Результаты показаны на фиг. 4. Биспецифичное антитело, содержащее связывающий домен LAG-3-связывающий домен с вариабельной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, и PD-L1-связывающий домен с вариабельной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и биспецифичное антитело, содержащее LAG-3-связывающий домен с вариабельной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и PD-L1-связывающий домен с вариабельной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, имеют более низкую аффинность связывания с LAG-3 человека и более высокую аффинность связывания с LAG-3 яванского макака по сравнению с аналогом релатлимаба. Биспецифичные антитела обладают схожей аффинностью связывания с PD-L1 человека и более высокой аффинностью связывания с PD-L1 яванского макака по сравнению с аналогом атезолизумаба.

Оба биспецифичных антитела связываются с LAG-3 человека и PD-L1 человека одновременно (данные не показаны).

Эти антитела подвергали скринингу в анализах связывания, репортерном анализе PD-1/LAG-3 и анализе с использованием SEB, как описано в примере 2, для подтверждения их свойств. Результаты показаны на фиг. 5. Оба биспецифичных антитела связывают LAG-3 человека и макака-резуса (фиг. 5A и B) и PD-L1 человека и макака-резуса (фиг. 5C и D). Оба биспецифичных антитела демонстрируют активность, сравнимую с комбинацией аналогов релатлимаба и атезолизумаба, в репортерном анализе (фиг. 5E) и анализе с использованием SEB (фиг. 5F). Значения EC50 приведены в таблицах 6 и 7.

LAG-3	PD-L1	EC50 (нМ)
SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 24	14,80
SEQ ID NO: 5	SEQ ID: NO 20	10,43

Таблица 6. Значения EC50 из репортерного анализа PD-1/LAG-3.

LAG-3	PD-L1	EC50 ± SD (нМ)
SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 24	0,34 ± 0,29
SEQ ID NO: 5	SEQ ID: NO 20	0,27 ± 0,19

Таблица 7. Значения EC50 из анализа с использованием SEB.

Пример 4 – Исследование *in vivo*

Противоопухолевую эффективность биспецифичных антител по сравнению с аналогами релатлимаба и атезолизумаба оценивали в мышинной модели NSG, гуманизированной стволовыми клетками человека, несущей ортотопические опухоли MDA-MB-231.

Использовали самок мышей hu-CD34 NSG™ (JAX, учетный № 705557), которым прививали человеческие CD34+ клетки и которые имеют >25% человеческих CD45+ клеток в периферической крови через 14 недель после приживления, но не позднее чем через 24 недель. Использовали когорты мышей hu-CD34 NSG™, которым прививали CD34+ клетки от трех независимых доноров.

120 мышам HSC-NSG (72 + избыток) прививали 5×10^6 клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, ресуспендировали в PBS с матригелем в соотношении 1:1, имплантировали в жировую прокладку молочной железы. Мыши HSC-NSG представляют собой иммунодефицитных мышей NOD.Cg-Prkdc^{scid}112rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG™), которым привиты человеческие CD34+ гемопоэтические стволовые клетки (HSC) из пуповинной крови, которые претерпевают многолинейную дифференцировку во все основные типы иммунных клеток.

72 мыши были включены в исследование через 15 дней после инокуляции опухоли, когда объем опухоли (TV) составлял 50-150 мм³. Объем опухоли для включения в исследование измеряли накануне (день -1). Дозирование начинали в день включения в исследование, обозначенный как день 0 лечения. В каждой группе лечения (таблица 1) были мыши от 3 доноров HSC, по 4 мыши на донора (N=12).

Размер опухоли и массу тела измеряли два раза в неделю.

Группа	N	Лечение	Величина дозы (мг/кг)	Способ дозирования	Частота дозирования
1	12 (4X3 донора)	Носитель - PBS	-	в/б	1 р/5 днейX9
2	12 (4X3 донора)	релатлимаб*	5	в/б	1 р/5 днейX9
3	12 (4X3 донора)	атезолизумаб*	5	в/б	1 р/5 днейX9

4	12 (4X3 донора)	релатлимаб*	5	в/б	1 п/5 днейX9
		атезолизумаб*	5	в/б	1 п/5 днейX9
5	12 (4X3 донора)	SEQ ID NO: 5 x SEQ ID NO: 20	10	в/б	1 п/5 днейX9
6	12 (4X3 донора)	SEQ ID NO: 17 x SEQ ID NO: 24	10	в/б	1 п/5 днейX9

Таблица 8. Дизайн исследования. * Антитело-аналог

Терминальные опухоли выделяли через 24 часа после конечной дозы для анализа методом проточной цитометрии популяций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и регуляторных Т-клеток (Трег) в образцах опухоли MDA-MB-231, собранных в день прекращения исследования.

Результаты показаны на фиг. 6. Монотерапия и комбинированная терапия эталонным антителом-аналогом релатлимаба к LAG-3 и антителом-аналогом атезолизумаба к PD-L1 не было эффективным. Уменьшение размера опухоли у мышей, получавших биспецифичное антитело, содержащее варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, и две варибельные области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, является значимым при объединении данных от всех доноров (фиг. 6А).

Профиль роста опухоли представлен в таблице 9.

	Носитель	релатлимаб* 5 мг/кг	атезолизумаб* 5 мг/кг	релатлимаб* 5 мг/кг + атезолизумаб* 5 мг/кг	SEQ ID NO: 5 x SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 17 x SEQ ID NO: 24
ПРОГРЕССИРУЮЩИЙ	11	10	8	10	9	7
СТАБИЛЬНЫЙ	1	2	2	2	3	3

РЕГРЕССИРУЮЩИЙ	0	0	1	0	0	1
Полная регрессия (TV=0)	0	0	1	0	0	1
Всего	12	12	12	12	12	12
% прогрессирувания	92	83	67	83	75	58

Таблица 9. Профиль роста опухоли. * Антитело-аналог

На фиг. 6B4 показано, что лечение PD-L1 и LAG-3хPD-L1 увеличивает процент пролиферирующих CD8⁺. Лечение LAG-3, PD-L1 и LAG-3хPD-L1 увеличивает процент пролиферирующих CD4⁺ Т-клеток (фиг. 6B5). На фиг. 6B3 показано, что лечение биспецифичными антителами приводит к более низкому проценту Treg, чем лечение комбинацией аналогов релатлимаба и атезолизумаба.

Пример 5: Скрининг дополнительных биспецифичных антител к LAG-3хPD-L1

Биспецифичные антитела, описанные в таблице 10, подвергали скринингу, по существу как описано в примере 2.

Биспецифичное антитело	LAG-3-связывающий домен				PD-L1-связывающий домен			
	VH	CH1	CH2	CH3	VH	CH1	CH2	CH3
SEQ ID NO: 5 x SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 51
SEQ ID NO: 52 x SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 51
SEQ ID NO: 17 x SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 50
SEQ ID NO: 53 x SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 50
SEQ ID NO: 54 x SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 50
SEQ ID NO: 55 x SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 50
SEQ ID NO: 56 x SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 50
SEQ ID NO: 57 x SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 50
SEQ ID NO: 58 x SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 50
SEQ ID NO: 59 x SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 50

10 Таблица 10. Обзор дополнительных биспецифичных антител к LAG-3хPD-L1.

Связывание антигена

Связывание биспецифичных антител с LAG-3 и PD-L1 анализировали методом FACS с использованием клеточной линии 293FF, стабильно трансфицированной LAG-3 человека и макака-резуса, и клеточной линии CHO-K1, стабильно

5 трансфицированной PD-L1 человека и макака-резуса, как в примере 2.

Биспецифичные антитела анализировали в 8-стадийном 4-кратном титровании, начиная со 100 мкг/мл на клетках 293FF-huLAG-3 и 293FF-reLAG-3, и 25 мкг/мл на клетках CHO-K1-huPD-L1. В качестве вторичного антитела использовали козье античеловеческое антитело PE (Invitrogen, H10104) в концентрации 3 мкг/мл.

10 Контрольное антитело к RSV включали во все планшеты в качестве отрицательного контроля в 8-стадийном 4-кратном разведении, начиная со 100 мкг/мл на клетках 293FF-huLAG-3 и 293FF-reLAG-3, и начиная со 25 мкг/мл на клетках CHO-K1-huPD-L1. В качестве дополнительного контроля использовали две лунки только для вторичного антитела и неокрашенных клеток. В качестве отрицательного контроля
15 были включены клетки, не экспрессирующие мишень, клетки 293FF и CHO-K1, где IgG были протестированы в двух трех высоких концентрациях. 100, 25 и 6,3 мкг/мл на клетках 293FF и 25, 6,3 и 1,6 мкг/мл на клетках CHO-K1.

Результаты связывания LAG-3 человека и макака-резуса показаны на фиг. 7А и 7В. Результаты связывания PD-L1 показаны на фиг. 7С. Кратность индукции получали
20 путем нормализации средних значений MFI относительно значений в лунках без антитела и наносили на график в виде функции логарифма концентрации антитела. Значения EC50 рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 7.02 (нелинейная регрессия, 3-параметрическая кривая доза-ответ).

25 Каждое из биспецифичных антител наносили на график вместе с антителом отрицательного контроля.

Все биспецифичные антитела продемонстрировали связывание с LAG-3 человека и макака-резуса. Все биспецифичные антитела продемонстрировали связывание с клетками CHO, экспрессирующими huPD-L1. Значения EC50 приведены в таблице 11.

		293FF - LAG-3 человека	293FF - LAG-3 макака-резуса	CHO-K1 - PD-L1 человека
LAG-3	PD-L1	EC50 (мкг/мл)	EC50 (мкг/мл)	EC50 (мкг/мл)
SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 20	1,06	2,88	0,0135
SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 20	1,25	3,22	0,009
SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 24	0,27	0,98	0,0097
SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 24	0,35	1,09	0,0091
SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 24	0,63	1,13	0,0093
SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 24	0,23	0,72	0,0117
SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 24	0,24	0,57	0,0103
SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 24	0,4	0,86	0,0098
SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 24	0,24	0,67	0,0086
SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 24	0,52	0,54	0,0064

Таблица 11. Значения EC50 и AUC связывания биспецифичных антител с LAG-3 человека и макака-резуса и PD-L1 человека.

Репортерный анализ PD-1/LAG-3

Репортерный анализ PD-1/LAG-3 проводили, по существу как описано в примере 2. Стафилококковый энтеротоксин D (ppSED) был валидирован для использования в конечной концентрации 150 нг/мл.

Биспецифичные IgG тестировали в 6-стадийном полулогарифмическом титровании, начиная со 100 мкг/мл (конечная концентрация). Разведения IgG готовили в 3-х кратной конечной концентрации в среде для анализа. В качестве положительного контроля в каждый планшет включали 6-стадийное полулогарифмическое титрование комбинации аналога атезолизумаба и аналога релатлимаба с самой высокой концентрацией 50 мкг/мл + 50 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля в каждом планшете использовали 4-стадийное полулогарифмическое титрование контрольного антитела к RSV, начиная со 100 мкг/мл. Две лунки оставляли без IgG в качестве контроля базального уровня активности.

Результаты показаны на фиг. 8. Все биспецифичные антитела к LAG-3хPD-L1 демонстрируют активность по сравнению с комбинацией аналогов релатлимаба и атезолизумаба. EC50 и площадь под кривой (AUC) ответа антитела определяли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 7.02. AUC выражали относительно AUC комбинации аналогов релатлимаба и атезолизумаба.

LAG-3	PD-L1	EC50 (мкг/мл)	AUC (% от контроля)
SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 20	1,154	96,93

SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 20	1,132	86,25
SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 24	0,5736	77,11
SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 24	0,6303	85,47
SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 24	0,481	75,11
SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 24	0,9666	79,11
SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 24	0,6529	86,97
SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 24	0,5695	73,64
SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 24	0,6613	77,11
SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 24	0,815	76,53

Таблица 12. Значения EC50 и AUC биспецифичных антител, определенные в репортерном анализе PD-1/LAG-3.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO: 1

5 QVQLQESGPGGLVRPSETLSLTCTVSGGSISSYSWSWIRQPPGKGLEWIGYIDYSGSTN
YNPSLKSRVTISVDTSKTQFSLKLSSVSAADTAVYYCAKDLLYKWNYVEGFDIWG
 QGTTVTVSS

SEQ ID NO: 2

10

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYSWSWIRQPPGKGLEWIGYIDYSGTTN
FNPSLKSRVTISVDTSKTQFSLKLSSVSAADTAVYYCAKDLLYKWNYVEGFDIWGQ
 GTMVTVSS

15 SEQ ID NO: 3

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDTHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARERGWDVFDIWGQ
 GTLVTVSS

20

SEQ ID NO: 4

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSKYVVSWVRQAPGQGFDMGGIIPMF
GTANYAQMFOGRVTITADKSTSTVNMELSSLRSED TAVYYCVRDKAVAGLYYFDS

25 WGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 5

30 QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSDD SISDYYWSSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGNT
KYNPSLKNRVTISVDTSKSKQFSLKLTSVTAADTAVYYCARIPLTGEFDYWAQGLTV
 TVSS

SEQ ID NO: 6

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVVRQAPGKGLEWVAVISYHG
SDKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGDNWDVFDIW
 GQGLVTVSS

5 SEQ ID NO: 7

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGDTFSTYAINWIRQAPGQGLEWMGGIPIFG
TAYYAQEFQDRVTITADKSTSTGYMEMSSLISED TAVYYCAREERELGALYAFDIW
 GQGMVTVSS

10

SEQ ID NO: 8

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSHAISWVRQVPGQGLEWMGGIPLFD
TAKNAQKFOGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDRETGTLYYFDYW

15 GQGLVTVSS

SEQ ID NO: 9

EVQLVQSGSELKKPGASVKV SCKASGYTFTTNALNWVRQAPGQGLEWMGWINTH
 20 TGNPTYAQGFGRVFVSLDTSVSTAYLQIRSLKAEDTAVYYCAREEPNWGVYFDYW
 GQGLVTVSS

SEQ ID NO: 10

25 QVQLVQSGAEVKRPGASVKV SCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGSDPE
HGETVDAQKFOGRVTMTEDTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCTTGGTYYYGSGS
YYTLDFWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 11

30

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSNFAFSWVRQAPGQGLEWMGGIIPMF
DTAKYAQKFOGRVTIADKSTNTAYMDLNSLRSED TAVYYCVRDRAIGTLYYFDY
 WGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 12

QVQLVQSGAEVRKPGSSVMVSCKASGGTFNTYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPIF
GTPYYGQRFQGRVTITADKSTNTVFMELSSLRSEDAMYFCAREERDIGSLYYFDSW

5 QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 13

QVQLVQSGAEVRKPGSSVMVSCKASGGTFSTYAINWLRQAPGQGLEWMGGIIPIFG
 10 TPYYGQRFQGRVTITADKSTNTVFMELSSLRSEDATAIYYCARDDRDSGGLYYFDSWG
 QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 14

15 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKTSGGTFSNYAFSWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFG
STNYAQSFOGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDATAVYYCARDDREMGTLYFFDQW
 GGGTTVTVSS

SEQ ID NO: 15

20 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYS
GNTNYAOKLOGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDDGSGWDDFDY
 WGQGLVTVSS

25 SEQ ID NO: 16

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYS
GNTNYAOKLOGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDGSILAAQMWGD
IWGQGLVTVSS

30

SEQ ID NO: 17

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSSYDTHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTAMYYCARERGWDVFDIWG
 QGTTVTVSS

5 SEQ ID NO: 18

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSSISGGGV
STFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVPAAATPSGTYYWI
FDLWGRGTLTVSS

10

SEQ ID NO: 19

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSTISGSGV
STYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCAKDRGYDYSGSYHN

15 WFDPWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 20

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSTTYAISWVRQAPGQGLEWMGWIPIFG
 20 TGNYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELRSLRSED TAVHYCARHDYTNTVD AFDIW
 GQGMVTVSS

SEQ ID NO: 21

25 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGD TFRSYGITWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFG
TTNYAQKFQGRVTITADKSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARRRRGYSNPHWLDPW
 GQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 22

30

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSTTYGILWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFG
TANYAQKFQGRVTITADISTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARGGGNYEYFVYWGQ
 GTLTVTVSS

SEQ ID NO: 23

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYAISWVRQAPGQGLEWMGWIPIFD
TGNYAQKIQGRVTITADKSTSTAYMELTSLSRSEDTAVYYCARHDYTNTVDAFDIW
 5 GQGMVTVSS

SEQ ID NO: 24

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYAISWVRQAPGQGLEWMGWIPIFD
 10 TGNYAQKFOGRVTITADKSTSTAYMELTSLSRSEDTAVYYCARHDYTNTVDAFDIW
 GQGMVTVSS

SEQ ID NO: 25

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGG
 STYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQG
 TLVTVSA

SEQ ID NO: 26

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLHPATFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 27

25 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHRGS
 TNSNPSLKSrvTLSDTSKNQFSLKLRsvTAADTAVYYCAFGYSDYEYNWFDPWGQ
 GTLVTVSS

30 SEQ ID NO: 28

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP
 ARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIK

SEQ ID NO: 29

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
 STKYSADSLKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRADDTAVYYCAKEGWSFDSSGYRSW
 5 FDSWGQGT LVTVSS

SEQ ID NO: 30 LCDR, указанные согласно IMGT

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGV
 10 PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOYSTPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 31 CDR1 легкой цепи согласно IMGT

QSISSY

15 SEQ ID NO: 32 CDR2 легкой цепи согласно IMGT

AAS

SEQ ID NO: 33 CDR3 легкой цепи согласно IMGT

QOYSTPPT

20

SEQ ID NO: 34 LCDR, указанные согласно IMGT

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGV
 PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOYSTPPITFGQGTRLEIK

25

SEQ ID NO: 35 LCDR, указанные согласно IMGT

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI
 PARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQOYNNWPWTFGQGTKVEIK

30

SEQ ID NO: 36 LCDR, указанные согласно IMGT

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI
 PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOYGSSPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 37 LCDR, указанные согласно IMGТ

SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKSVYWYQQKSGQAPVLVIYYDSDRPSGI
5 PERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 38

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV
10 PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTP

SEQ ID NO: 39

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI
15 PARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWP

SEQ ID NO: 40

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI
20 PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP

SEQ ID NO: 41

SYVLTQPPSVSVAPGETARITCGGDNIGRKS VYWYQQKSGQAPVLVIYYDSDRPSGIP
25 ERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDGSSDH

SEQ ID NO: 42

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFPAVL
30 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV

SEQ ID NO: 43

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDYSLSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 44

5 EPKSCDKTHTCPPCP

SEQ ID NO: 45

APELGRGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

10

SEQ ID NO: 46

SEQ ID NO: 47

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
15 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 48

SEQ ID NO: 49

20

SEQ ID NO: 50

GQPREPQVYTDPPSREEMTKNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

25 SEQ ID NO: 51

GQPREPQVYTKPPSREEMTKNQVSLKCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 52

30 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSDDISDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGNT
KYNPSLKNRVTISVDTSKSKQFSLKLTSVTAADTAVYYCARIPLTGDFDFWAQGLV
TVSS

SEQ ID NO: 53

QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSSYDTHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
SNKYYADSVKGRRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTAMYYCAKERGWDVFDLWG
QGTTVTVSS

5 SEQ ID NO: 54

QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSSYDTHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
SNKYYADSVKGRRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTAMYYCAKERGWDVFDVWG
QGTTVTVSS

10 SEQ ID NO: 55

QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSSYDTHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
SNKYYADSVKGRRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTAMYYCAREEKGWDVFDLWG
QGTTVTVSS

15 SEQ ID NO: 56

QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSSYDTHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
SNKYYADSVKGRRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTAMYYCAREEKGWDVFDVWG
QGTTVTVSS

20 SEQ ID NO: 57

QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSSYDTHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
SNKYYADSVKGRRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTAMYYCAREERGWDIFDVWG
QGTTVTVSS

25 SEQ ID NO: 58

QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSSYDTHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
SNKYYADSVKGRRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTAMYYCAREERGWDLFDLWG
QGTTVTVSS

30 SEQ ID NO: 59

QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSSYDTHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
SNKYYADSVKGRRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAEDTAMYYCAREERGWDLFDVWG
QGTTVTVSS

SEQ ID NO: 60

SYSWS

SEQ ID NO: 61

5 YIDYSGSTNYNPSLKS

SEQ ID NO: 62

DLLYKWNHYVEGFDI

10 SEQ ID NO: 63

YIDYSGTTNPNPSLKS

SEQ ID NO: 64

SYDTH

15

SEQ ID NO: 65

VISYDGSNKYYADSVKG

SEQ ID NO: 66

20 ERGWDVFDI

SEQ ID NO: 67

KYVVS

25 SEQ ID NO: 68

GIIPMFGTANYAQMFGG

SEQ ID NO: 69

DKAVAGLYYFDS

30

SEQ ID NO: 70

DYYWS

SEQ ID NO: 71

YIYYSGNTKYNPSLKN

SEQ ID NO: 72

IPLTGEFDY

5

SEQ ID NO: 73

SYGMH

SEQ ID NO: 74

10 VISYHGSDKYYADSVKG

SEQ ID NO: 75

DGDNWDVFDI

15 SEQ ID NO: 76

TYAIN

SEQ ID NO: 77

GIPIFGTAYYAQEFQD

20

SEQ ID NO: 78

ERELGALYAFDI

SEQ ID NO: 79

25 SHAIS

SEQ ID NO: 80

GIPLFDTAKNAQKFQG

30 SEQ ID NO: 81

DRETGTLYYFDY

SEQ ID NO: 82

TNALN

SEQ ID NO: 83

WINTHTGNPTYAQQFIG

5 SEQ ID NO: 84

EPNWGVYFDY

SEQ ID NO: 85

ELSMH

10

SEQ ID NO: 86

GSDPEHGETVDAQKFQG

SEQ ID NO: 87

15 GGTYYYYGSGSYTDLDF

SEQ ID NO: 88

NFAFS

20 SEQ ID NO: 89

GIIPMFDTAKYAQKFQG

SEQ ID NO: 90

DRAIGTLYYFDY

25

SEQ ID NO: 91

GIPIFGTPYYGQRFQG

SEQ ID NO: 92

30 ERDIGSLYYFDS

SEQ ID NO: 93

DRDSGGLYYFDS

SEQ ID NO: 94

NYAFS

SEQ ID NO: 95

5 GIPIFGSTNYAQSFQG

SEQ ID NO: 96

DREMGTTYFFDQ

10 SEQ ID NO: 97

SYGIS

SEQ ID NO: 98

WISAYSGNTNYAQKLQG

15

SEQ ID NO: 99

DGSGWDDFDY

SEQ ID NO: 100

20 GSILAAQMWGDI

SEQ ID NO: 101

SYAMS

25 SEQ ID NO: 102

SISGGGVSTFYADSVKG

SEQ ID NO: 103

VPAAATPSGTYYWIFDL

30

SEQ ID NO: 104

SYAMN

SEQ ID NO: 105

TISGSGVSTYYADSVKG

SEQ ID NO: 106

DRGYDYSGSYHNWFDP

5

SEQ ID NO: 107

TYAIS

SEQ ID NO: 108

10 WIPIFGTGNYAQKFQG

SEQ ID NO: 109

HDYTNTVDAFDI

15 SEQ ID NO: 110

SYGIT

SEQ ID NO: 111

GIPIFGTTNYAQKFQG

20

SEQ ID NO: 112

RRGYSNPHWLDP

SEQ ID NO: 113

25 TYGIL

SEQ ID NO: 114

GIPIFGTANYAQKFQG

30 SEQ ID NO: 115

GGGNYEYEFVY

SEQ ID NO: 116

WIPIFDTGNYAQKIQG

SEQ ID NO: 117

WIIPIFDTGNYAQKFQG

5 SEQ ID NO: 118

IPLTGDFDF

SEQ ID NO: 119

ERGWDVFDL

10

SEQ ID NO: 120

ERGWDVFDV

SEQ ID NO: 121

15 EKGWDVFDL

SEQ ID NO: 122

EKGWDVFDV

20 SEQ ID NO: 123

ERGWDIFDV

SEQ ID NO: 124

ERGWDLFDL

25

SEQ ID NO: 125

ERGWDLFDV

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мультиспецифичное антитело, содержащее связывающий домен, который связывается с LAG-3, и связывающий домен, который связывается с PD-L1, или его вариант, который сохраняет специфичность связывания указанного антитела, причем указанное антитело или вариант имеет сравнимую или равную, или более высокую активность по сравнению с комбинацией эталонных антител, причем указанная комбинация эталонных антител включает эталонное антитело, содержащее две переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, и две переменные области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, и эталонное антитело, содержащее две переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, и две переменные области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26.

2. Мультиспецифичное антитело или его вариант по п. 1, где антитело или вариант содержит один связывающий домен, который связывается с LAG-3, и/или один связывающий домен, который связывается с PD-L1.

3. Мультиспецифичное антитело или его вариант по п. 1 или 2, где активность определяют путем измерения уменьшения объема опухоли в исследовании *in vivo* на мышах.

4. Мультиспецифичное антитело или его вариант по п. 3, где сравнимая активность представляет собой уменьшение объема опухоли в пределах 5-кратного диапазона уменьшения объема опухоли, обеспечиваемого комбинацией эталонных антител, и включает 5-2-кратное, предпочтительно 3-2-кратное, отклонение от уменьшения объема опухоли, обеспечиваемого комбинацией эталонных антител.

5. Мультиспецифичное антитело или его вариант по п. 1 или 2, где активность определяют по активности в отношении блокирования связывания лиганда или рецептора с LAG-3 и/или PD-L1.

6. Мультиспецифичное антитело или его вариант по п. 5, где активность в отношении блокирования связывания лиганда с LAG-3 и/или PD-L1 измеряют в репортерном анализе PD-1/LAG-3.

5 7. Мультиспецифичное антитело или его вариант по п. 5 или 6, где сравнимая активность представляет собой активность в отношении блокирования связывания лиганда или рецептора с LAG-3 и/или PD-L1 в пределах 5-кратного диапазона активности в отношении блокирования связывания лиганда или рецептора с LAG-3 и/или PD-L1 комбинации эталонных антител, и включает 5-2-кратное, 10 предпочтительно 3-2-кратное, отклонение от блокирующей активности в отношении LAG-3 и/или PD-L1 комбинации эталонных антител.

8. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 1-7, где связывающий домен, связывающийся с LAG-3, содержит вариабельную область 15 тяжелой цепи, содержащую:

a) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1;

20 b) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2;

c) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3;

25 d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4;

e) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей 30 аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5;

f) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6;

r) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52,

5 s) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53,

t) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54,

10 u) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55,

v) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей
15 аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56,

w) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57,

x) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей
20 аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58, или

y) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59,

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

9. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 1-8, где LAG-3-связывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-17
30 или SEQ ID NO: 52-59, или идентичную ей по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95%.

10. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 1-9, где LAG-3-связывающий домен дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи.

5 11. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 1-10, где LAG-3-связывающий домен дополнительно содержит область CH1 и CL.

10 12. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 1-11, где связывающий домен, связывающийся с PD-L1, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

а) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20;

15 б) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21;

в) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22;

20 д) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; или

25 е) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24;

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

30 13. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 1-12, где PD-L1-связывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 20-24, или идентичную ей по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95%.

14. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 1-13, где PD-L1-связывающий домен дополнительно содержит переменную область легкой цепи.

5 15. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 1-10, где PD-L1-связывающий домен дополнительно содержит область CH1 и CL.

10 16. Мультиспецифичное антитело или его вариант, который сохраняет специфичность связывания указанного антитела, причем указанное антитело или его вариант содержит связывающий домен, который специфично связывается с внеклеточным доменом LAG-3, и связывающий домен, который специфично связывается с внеклеточным доменом белка семейства B7,

где LAG-3-связывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую:

15 а) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1;

20 б) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2;

в) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3;

25 д) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4;

е) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5;

30 ф) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) переменной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6;

г) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52,

5 с) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53,

т) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54,

10 у) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55,

15 в) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56,

w) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57,

20 х) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 58, или

у) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59,

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

17. Мультиспецифичное антитело или его вариант по п. 16, где LAG-3-связывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую
30 аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-17 или SEQ ID NO: 52-59, или идентичную ей по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95%.

18. Мультиспецифичное антитело или его вариант по п. 16 или 17, где LAG-3-связывающий домен дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи.

5 19. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 16-18, где LAG-3-связывающий домен дополнительно содержит область CH1 и CL.

20. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 16-19, где антитело или вариант является одновалентным в отношении связывания с LAG-3.

10 21. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 16-20, где белок семейства B7 выбран из группы, состоящей из PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, B7-H4, TNFRSF14 и B7-H7.

15 22. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 16-21, где белок семейства B7 представляет собой PD-L1.

20 23. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 16-22, где вариабельный домен, специфично связывающийся с внеклеточным доменом белка семейства B7, блокирует связывание PD-L1 с его рецептором.

24. Антитело или его вариант по п. 23, где указанный рецептор представляет собой PD-1 и/или CD80.

25 25. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 16-24, где связывающий домен, связывающийся с PD-L1, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

а) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20;

30 б) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21;

с) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22;

5 d) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; или

е) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24;

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

26. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 16-25, где PD-L1-связывающий домен содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую
15 аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 20-24, или идентичную ей по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 85%, более предпочтительно на 90% или наиболее предпочтительно на 95%.

27. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 16-26, где
20 PD-L1-связывающий домен дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи.

28. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 16-27, где PD-L1-связывающий домен дополнительно содержит область CH1 и CL.

25 29. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 16-28, где антитело или вариант является одновалентным в отношении связывания с PD-L1.

30 30. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 16-29, где антитело или вариант имеет сравнимую или равную, или более высокую активность по сравнению с комбинацией эталонных антител, причем указанная комбинация эталонных антител включает эталонное антитело, содержащее две вариабельные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, и две вариабельные области легкой цепи, имеющие

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, и эталонное антитело, содержащее две переменные области тяжелой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, и две переменные области легкой цепи, имеющие аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26.

31. Мультиспецифичное антитело или его вариант по п. 30, где активность определяют путем измерения уменьшения объема опухоли в исследовании *in vivo* на мышах.

32. Мультиспецифичное антитело или его вариант по п. 30 или 31, где сравнимая активность включает 5-2-кратное, предпочтительно 3-2-кратное, отклонение от уменьшения объема опухоли, обеспечиваемого комбинацией эталонных антител.

33. Мультиспецифичное антитело или его вариант по п. 30, где активность определяют по активности в отношении блокирования связывания лиганда или рецептора с LAG-3 и/или PD-L1.

34. Мультиспецифичное антитело или его вариант по п. 33, где активность в отношении блокирования связывания лиганда с LAG-3 и/или PD-L1 измеряют в репортерном анализе PD-1/LAG-3.

35. Мультиспецифичное антитело или его вариант по п. 33 или 34, где сравнимая активность представляет собой активность в отношении блокирования связывания лиганда или рецептора с LAG-3 и/или PD-L1 в пределах 5-кратного диапазона активности в отношении блокирования связывания лиганда или рецептора с LAG-3 и/или PD-L1 комбинации эталонных антител, и включает 5-2-кратное, предпочтительно 3-2-кратное, отклонение от блокирующей активности в отношении LAG-3 и PD-L1 комбинации эталонных антител.

36. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 1-35, где антитело или вариант представляет собой полноразмерное антитело, в частности, полноразмерное биспецифичное антитело.

37. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 1-36 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

5 38. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 1-36 или фармацевтическая композиция по п. 37 для применения в качестве лекарственного средства.

10 39. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 1-36 или фармацевтическая композиция по п. 37 для применения при лечении заболевания, связанного с супрессией иммунной системы.

15 40. Мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 1-36 или фармацевтическая композиция по п. 37 для применения при лечении рака.

41. Способ лечения заболевания, включающий введение эффективного количества мультиспецифичного антитела или его варианта по любому из пп. 1-36 или фармацевтической композиции по п. 37 нуждающемуся в этом индивидууму.

20 42. Способ лечения заболевания, связанного с супрессией иммунной системы, в частности, рака, включающий введение эффективного количества мультиспецифичного антитела или его варианта по любому из пп. 1-36 или фармацевтической композиции по п. 37 нуждающемуся в этом индивидууму.

25 43. Способ лечения рака, включающий введение эффективного количества мультиспецифичного антитела или его варианта по любому из пп. 1-36 или фармацевтической композиции по п. 37 нуждающемуся в этом индивидууму.

30 44. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи LAG-3-связывающего домена, как определено в любом из пп. 16-20, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи PD-L1-связывающего домена, как определено в любом из пп. 25-28.

45. Вектор по п. 44, где вектор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую область СН1 и предпочтительно шарнирную область, область СН2 и СН3.

5 46. Вектор по п. 44 или 45, дополнительно содержащий по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи, и предпочтительно область СL.

10 47. Вектор по п. 46, где переменная область легкой цепи представляет собой переменную область легкой цепи, которая способна спариваться с несколькими тяжелыми цепями, имеющими разные эпитопные специфичности.

15 48. Клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи LAG-3-связывающего домена, как определено в любом из пп. 16-20, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи PD-L1-связывающего домена, как определено в любом из пп. 25-28.

20 49. Клетка по п. 48, где клетка дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую область СН1 и предпочтительно шарнирную область, область СН2 и СН3.

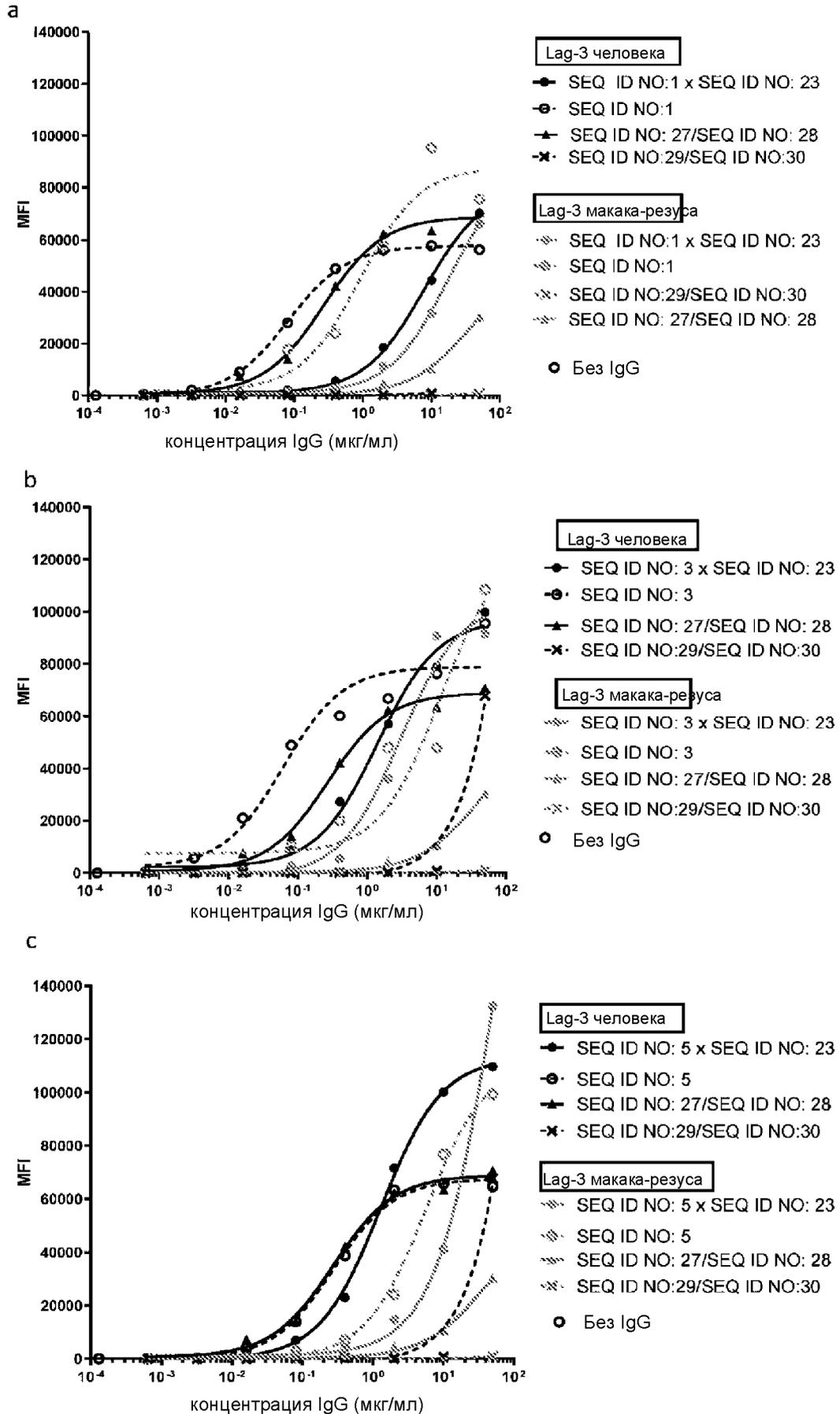
25 50. Клетка по п. 48 или 49, дополнительно содержащая по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область легкой цепи, и предпочтительно область СL.

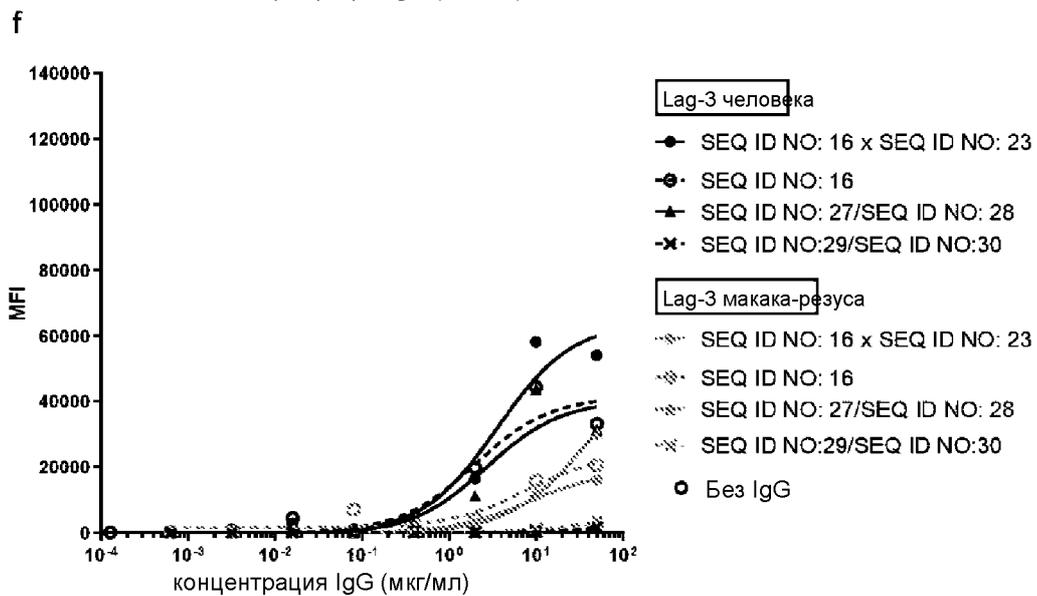
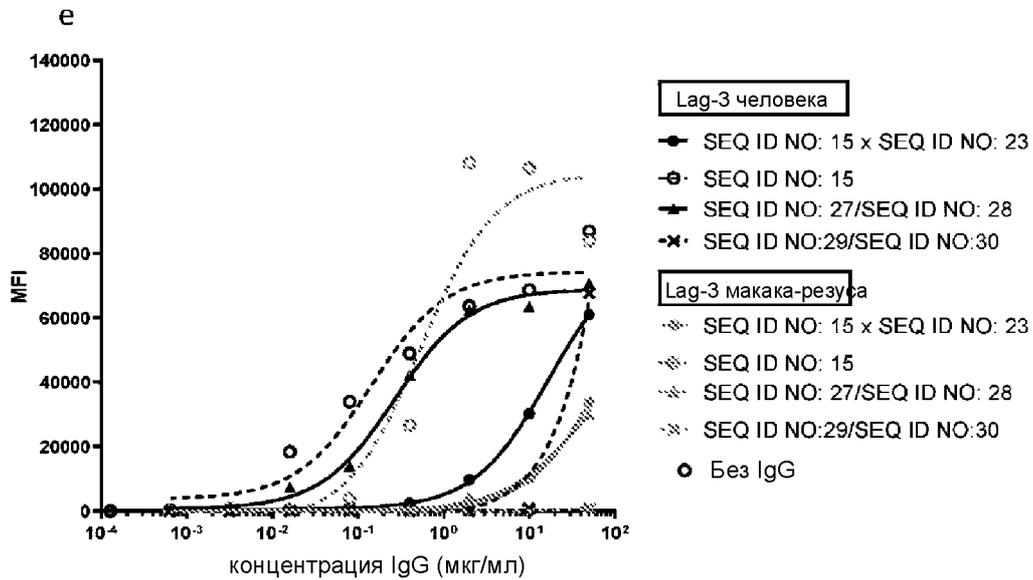
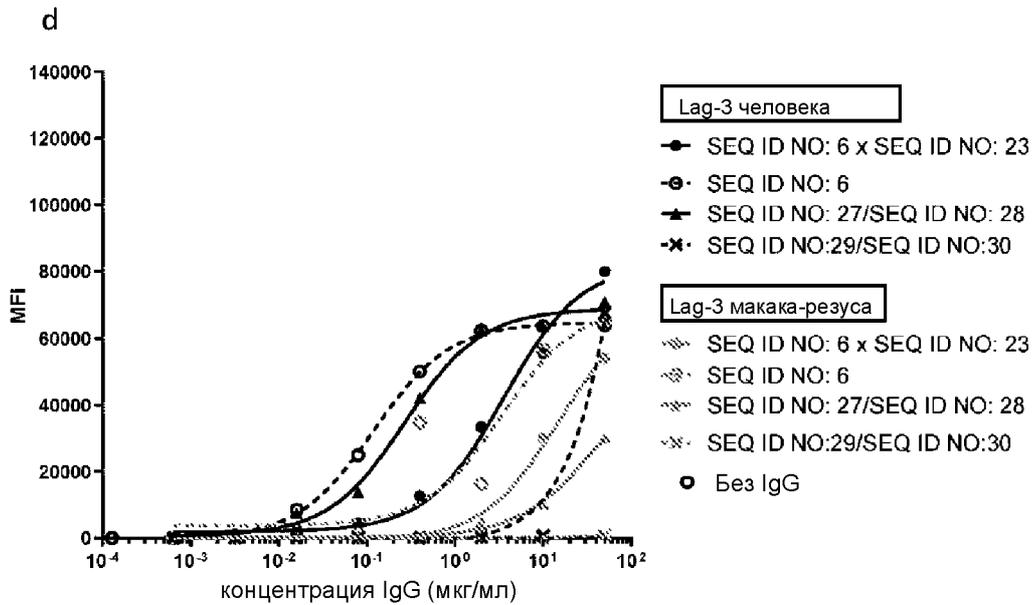
30 51. Клетка по п. 50, где переменная область легкой цепи представляет собой переменную область легкой цепи, которая способна спариваться с несколькими тяжелыми цепями, имеющими разные эпитопные специфичности.

52. Клетка, продуцирующая мультиспецифичное антитело или его вариант по любому из пп. 1-36.

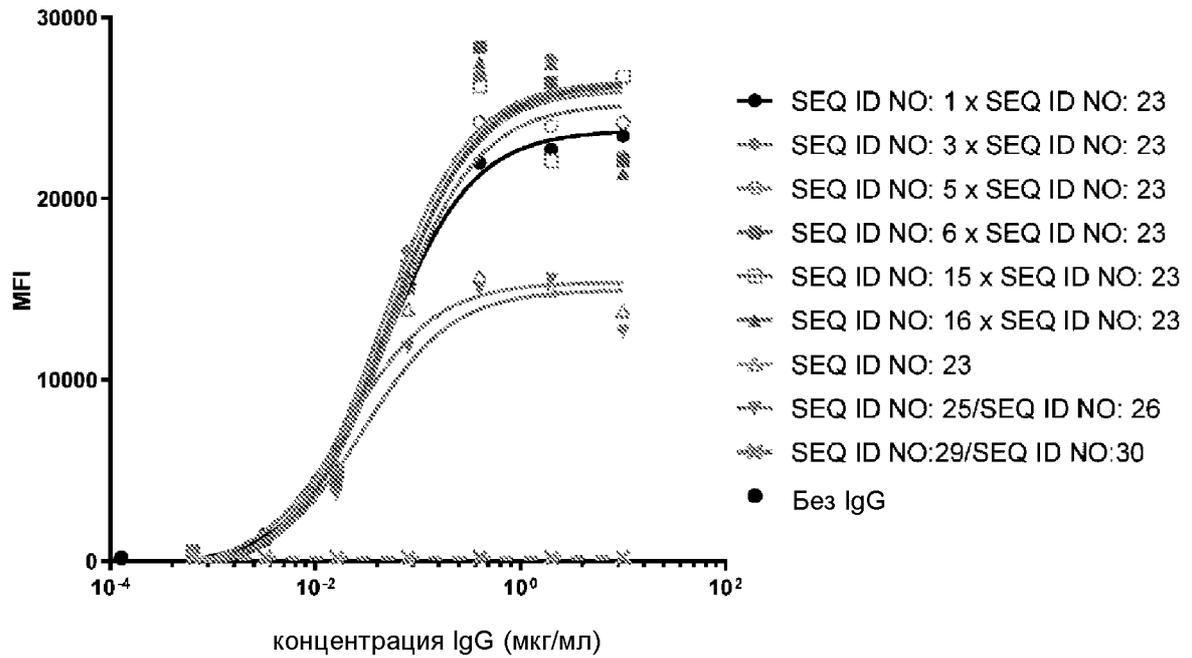
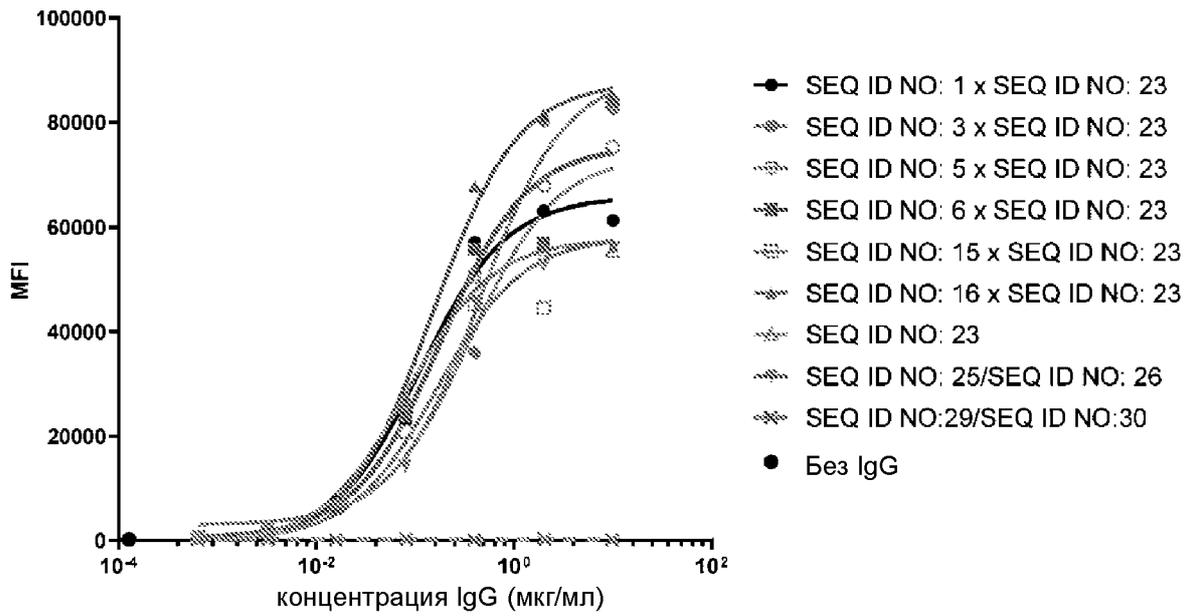
53. Клетка по п. 52, где клетка представляет собой рекомбинантную клетку, которая была трансформирована вектором по любому из пп. 44-47.

Фиг. 1А

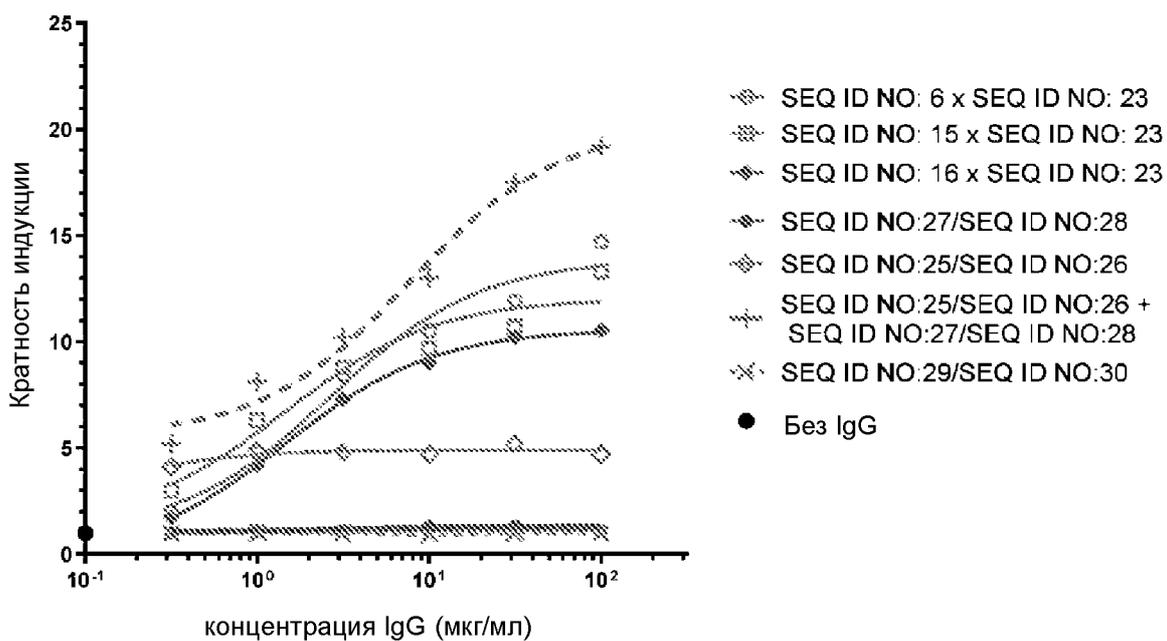
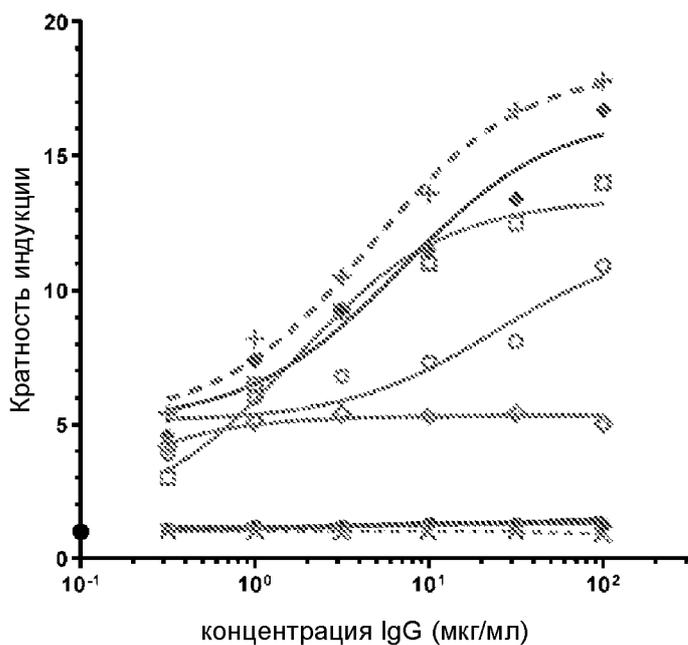




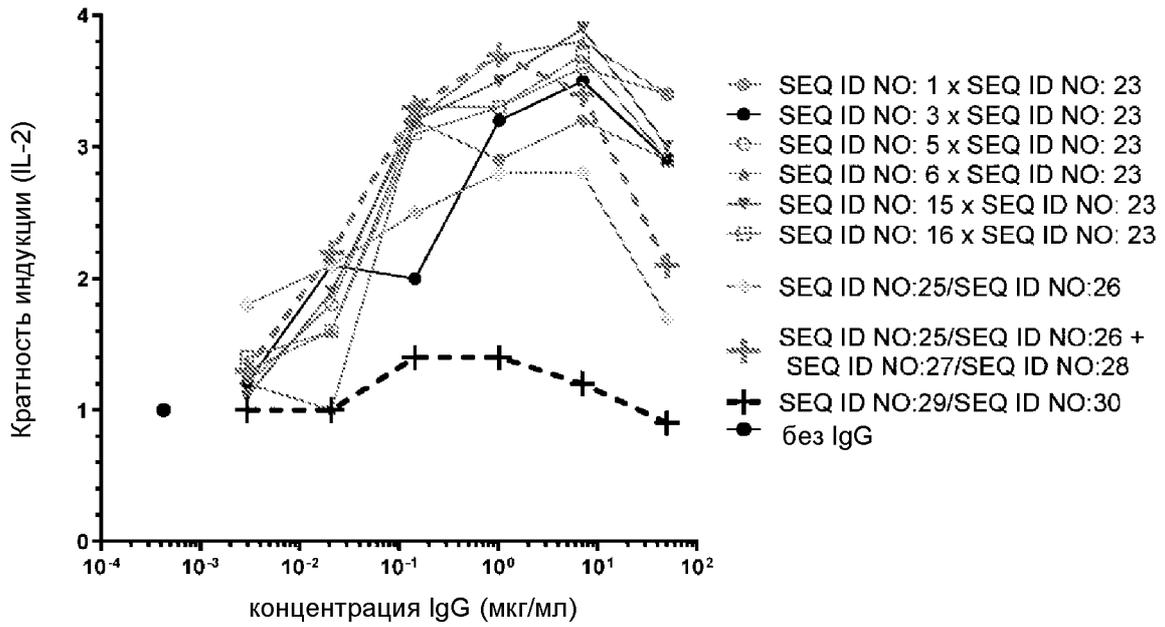
Фиг. 1В



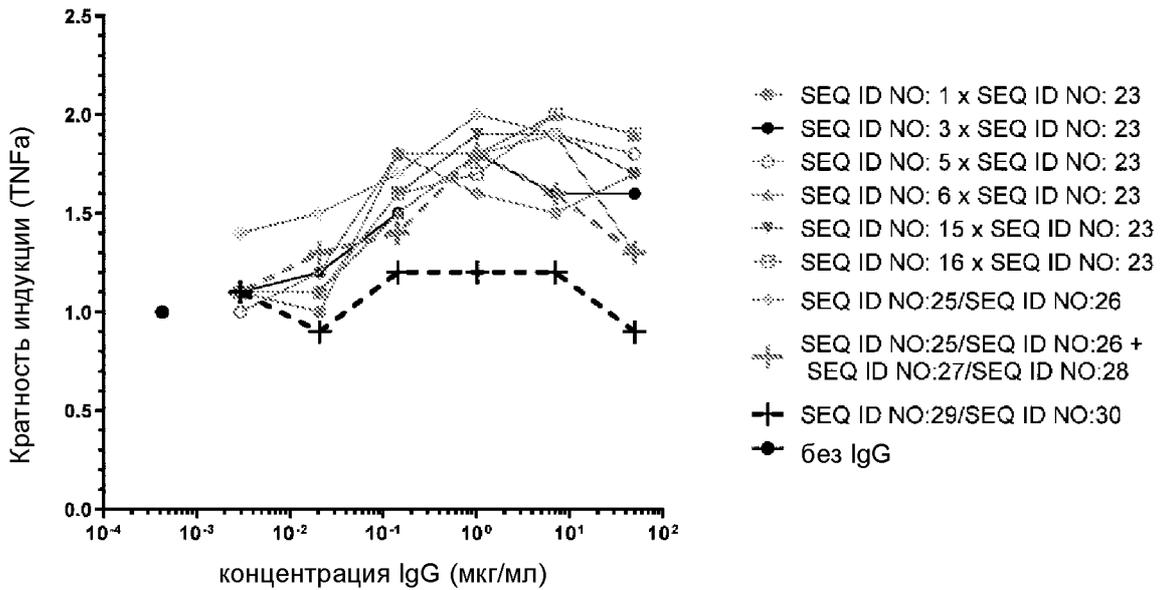
Фиг. 2



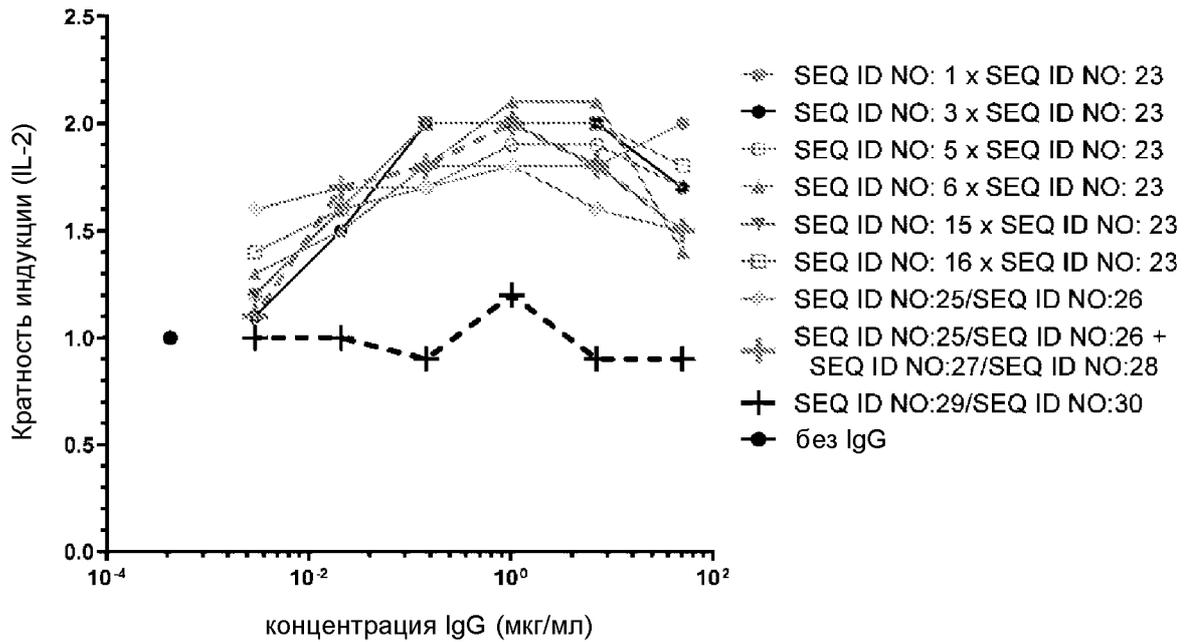
Фиг. 3А1



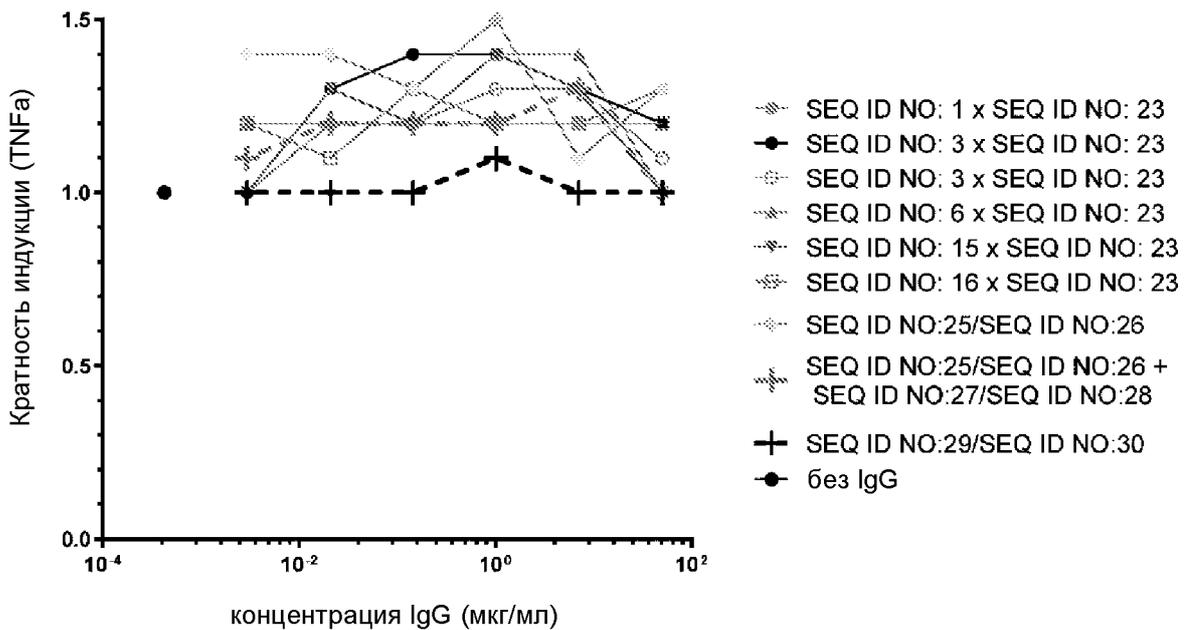
Фиг. 3А2



Фиг. 3B1



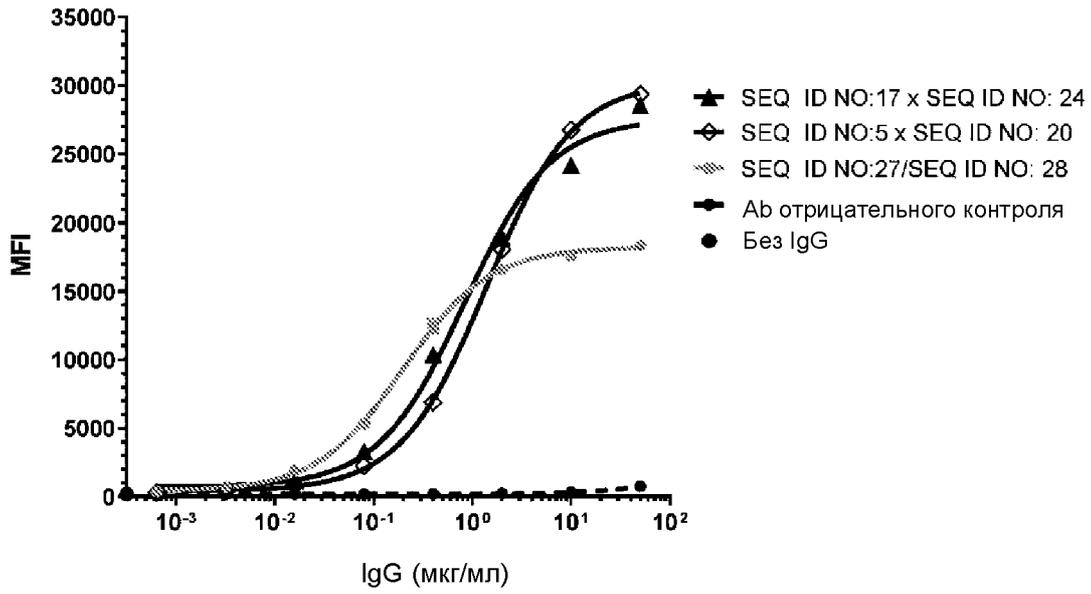
Фиг. 3B2



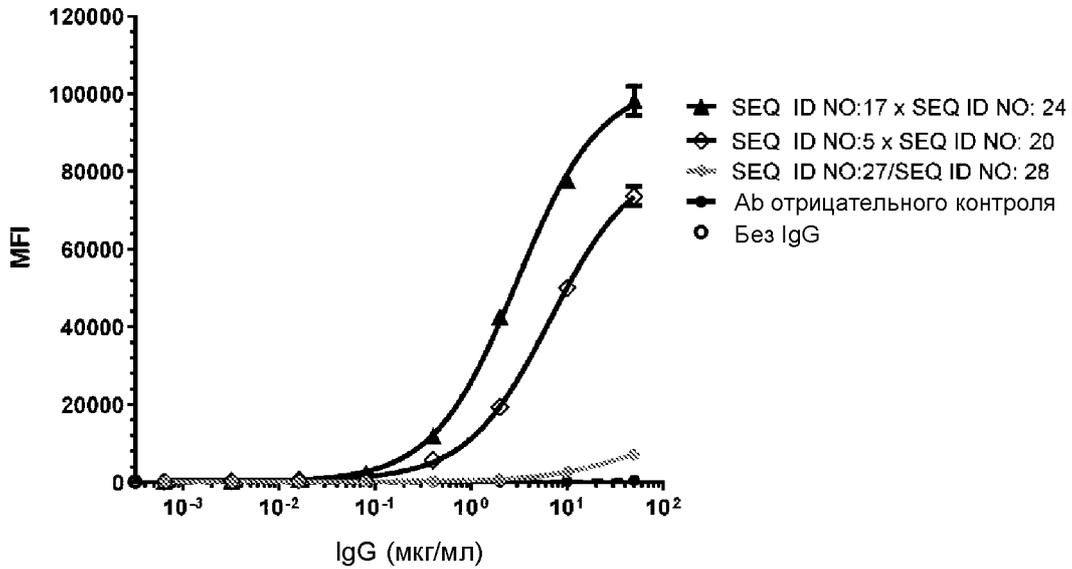
Фиг. 4

Антиген	huLAG-3			cyLAG-3			huPD-L1			cyPD-L1		
	Kon (1/Mc)	Koff (1/c)	KD (нМ)									
SEQ ID NO:17 x SEQ ID NO:24	2.38E+06	4.58E-03	1.93	3.42E+06	1.40E-03	0.41	1.28E+06	5.21E-04	0.41	1.39E+06	4.75E-04	0.34
SEQ ID NO:5 x SEQ ID NO:20	5.28E+05	7.66E-04	1.45	1.24E+06	1.42E-03	1.15	1.49E+06	2.52E-04	0.17	1.65E+06	2.44E-04	0.15
SEQ ID NO:27/ SEQ ID NO:28	2.28E+06	5.63E-04	0.25	6.08E+06	6.97E-02	11.50	-	-	-	-	-	-
SEQ ID NO:25/ SEQ ID NO:26	-	-	-	-	-	-	7.27E+05	1.34E-04	0.18	7.49E+05	4.43E-03	5.92

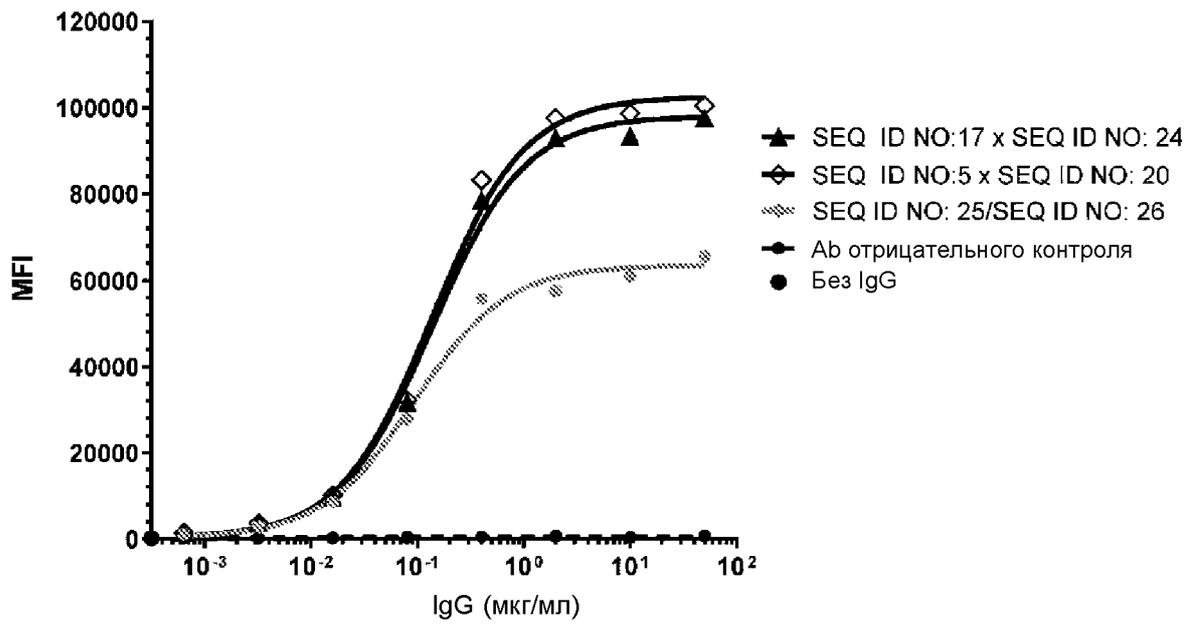
Фиг. 5А



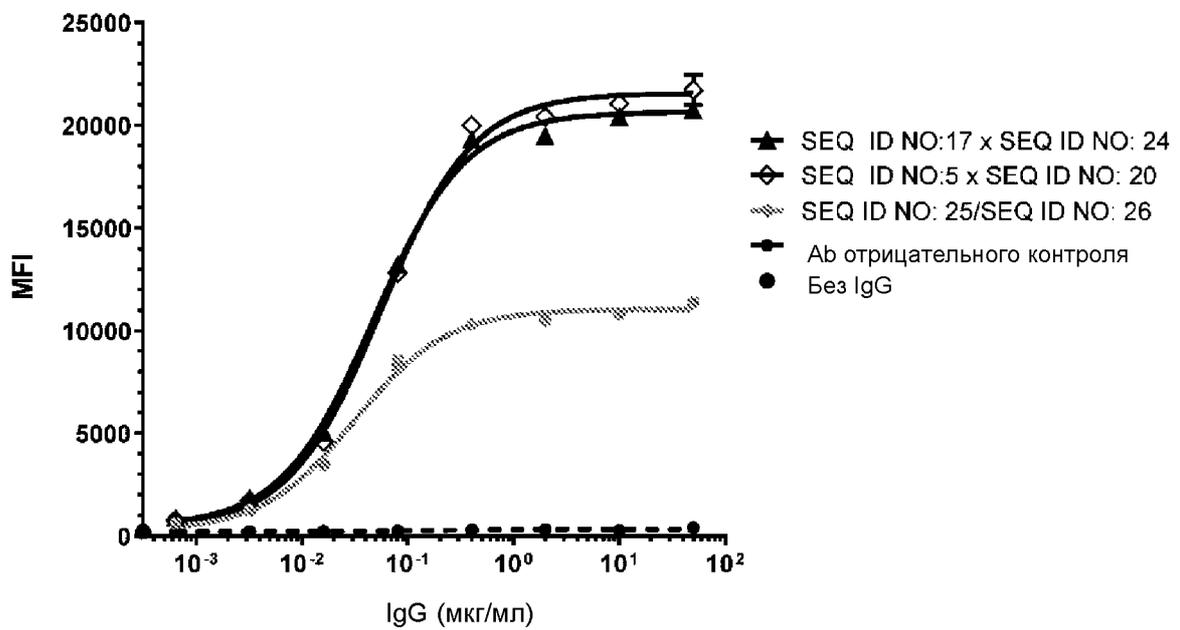
Фиг. 5В



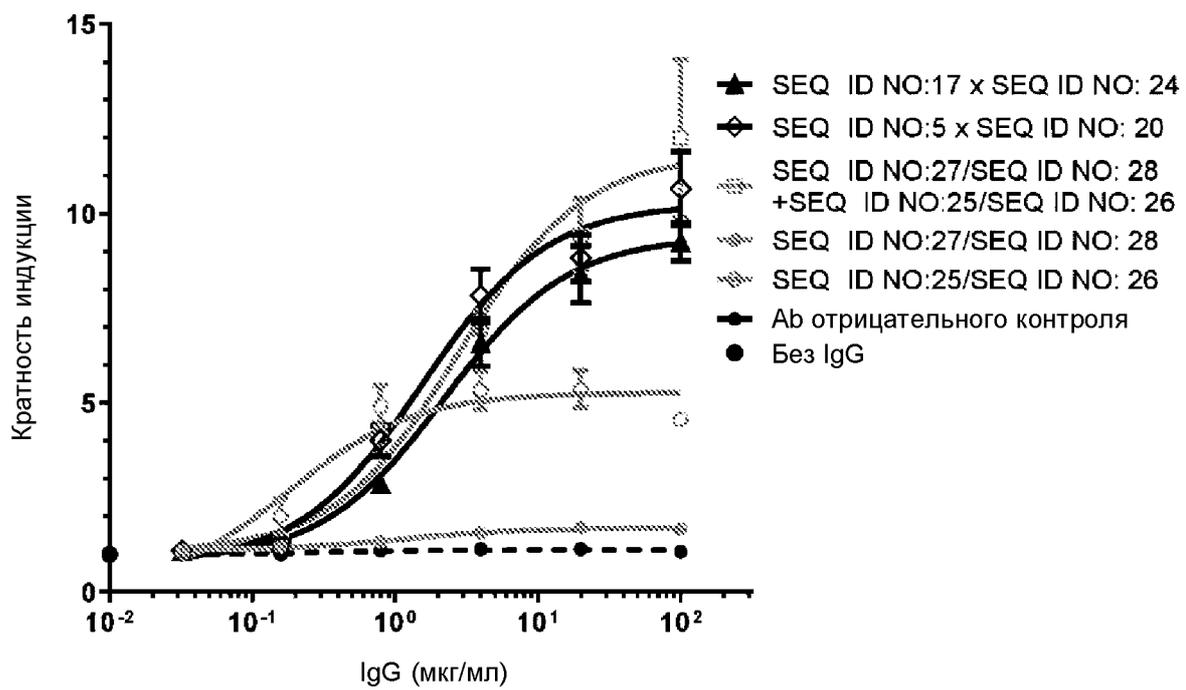
Фиг. 5С



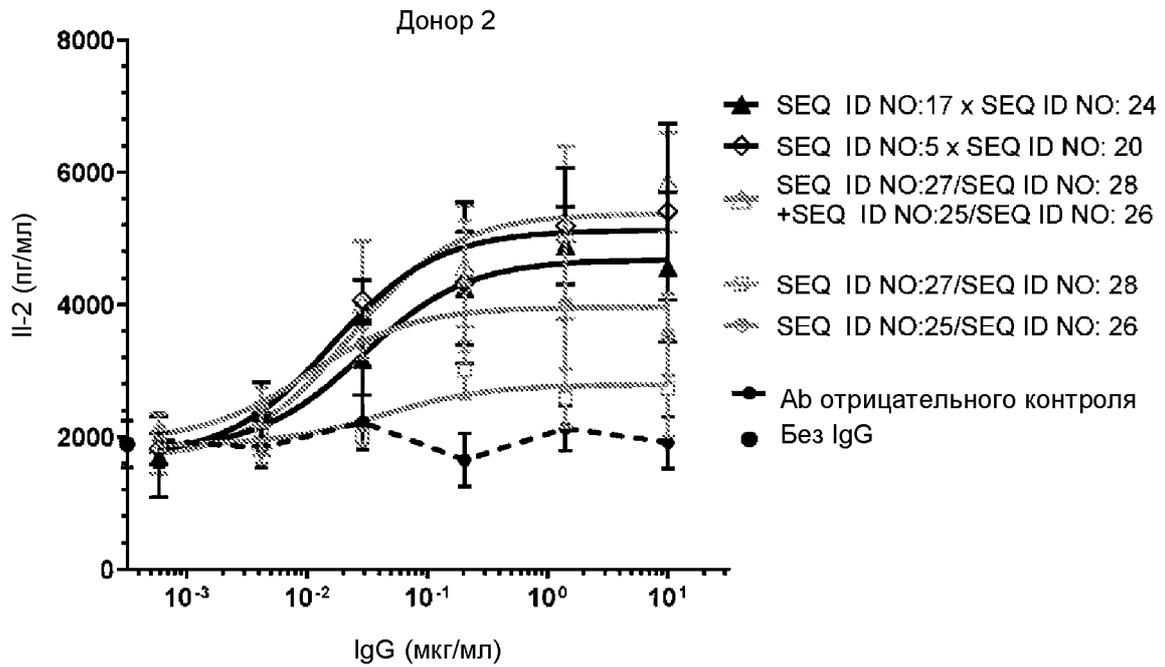
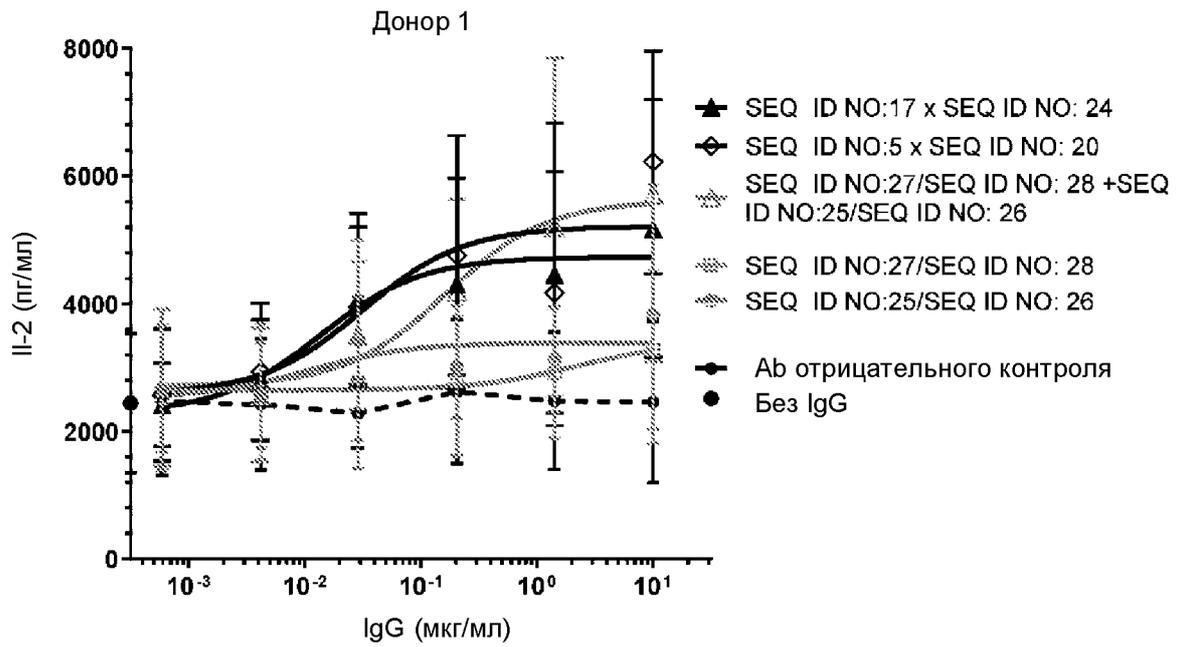
Фиг. 5D

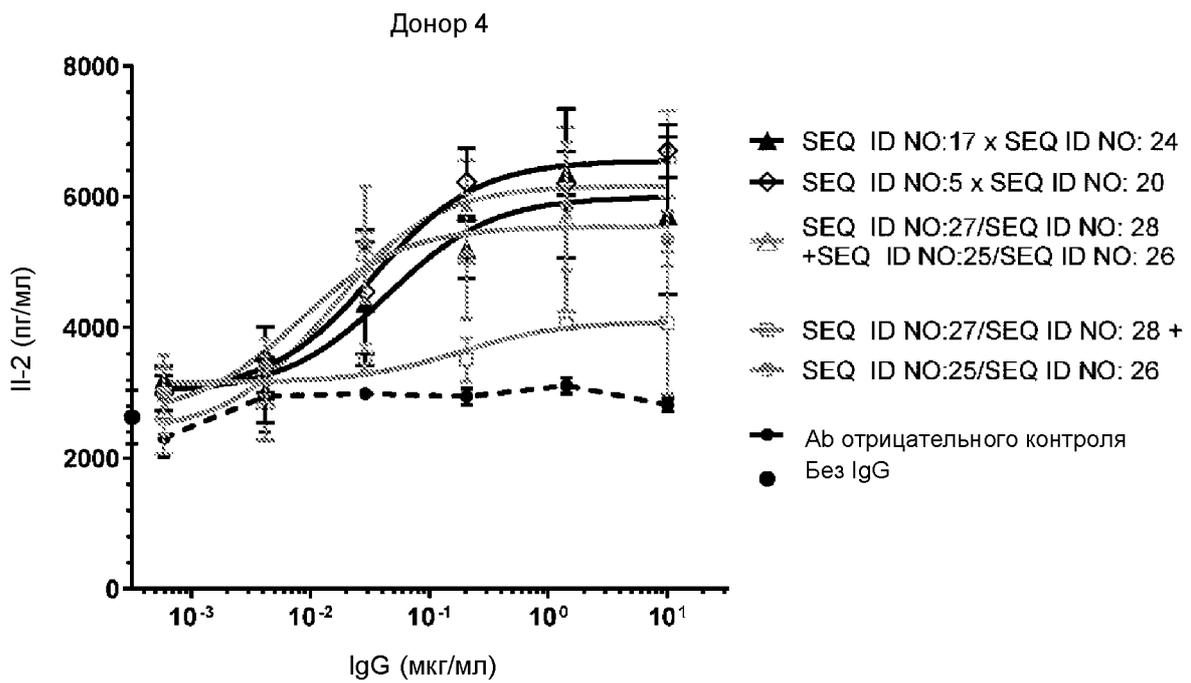
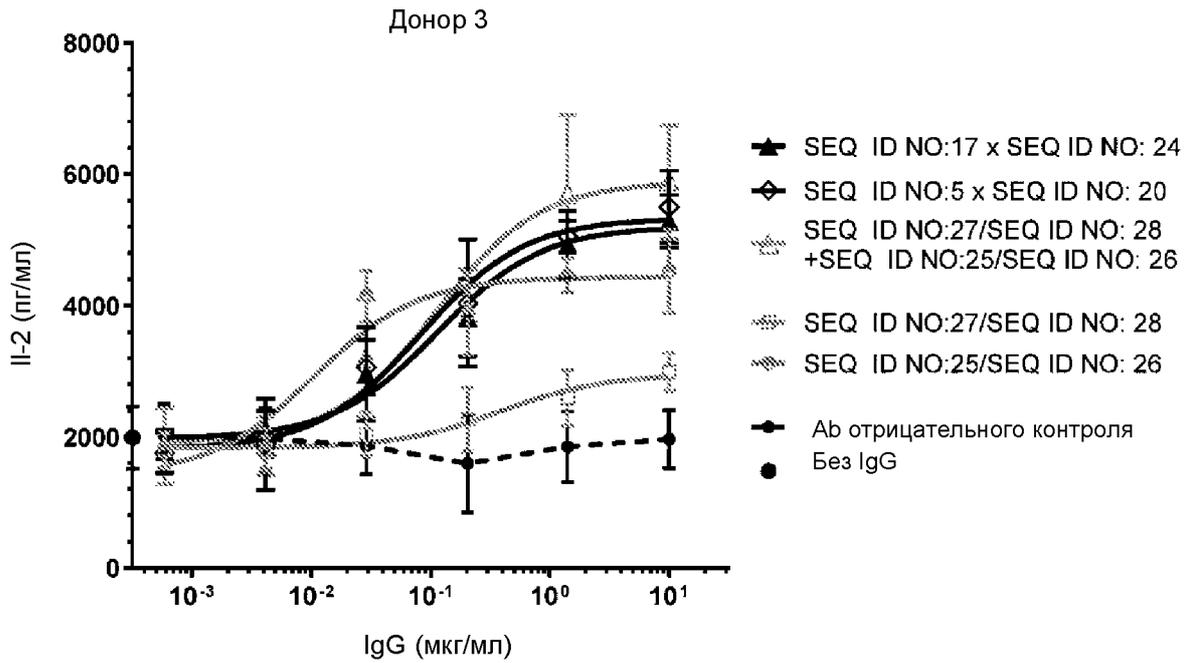


Фиг. 5Е

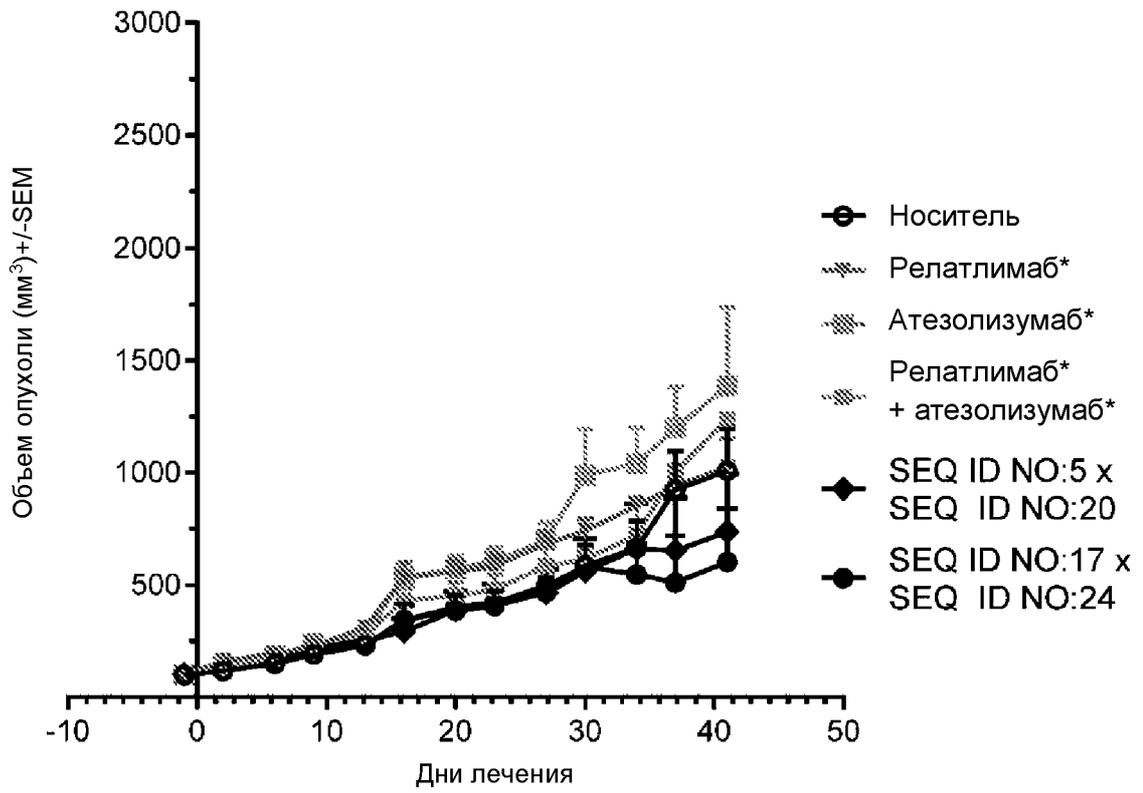


Фиг. 5F

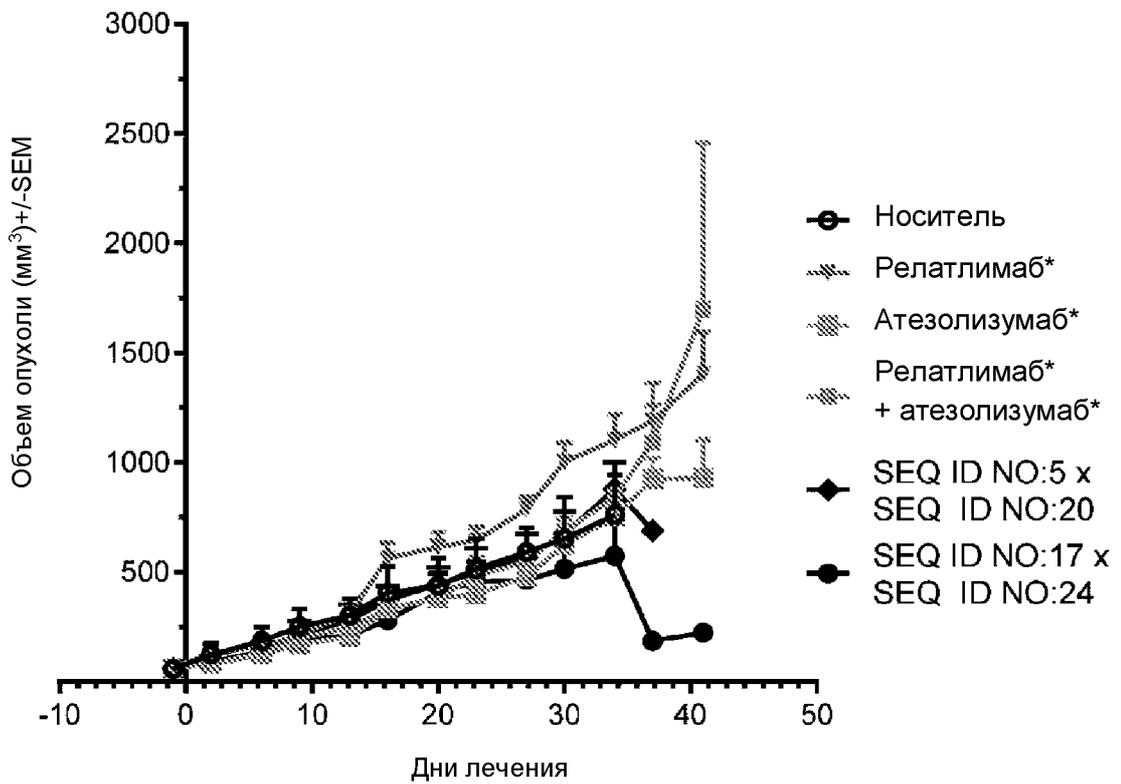




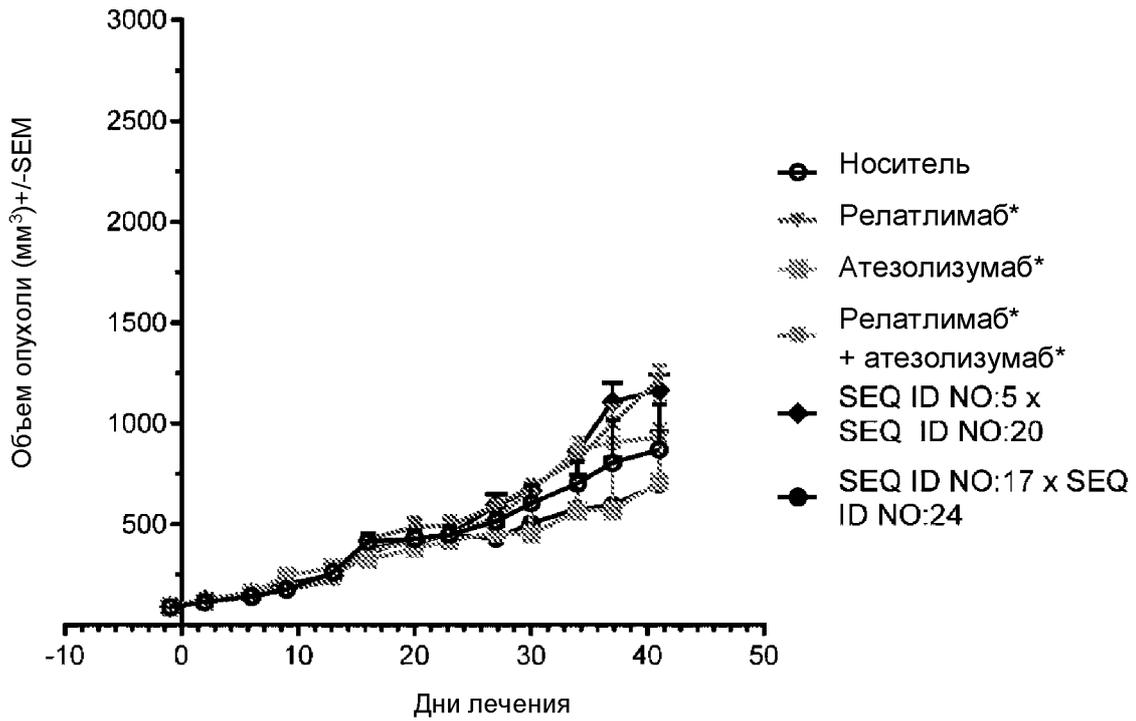
Фиг. 6A1



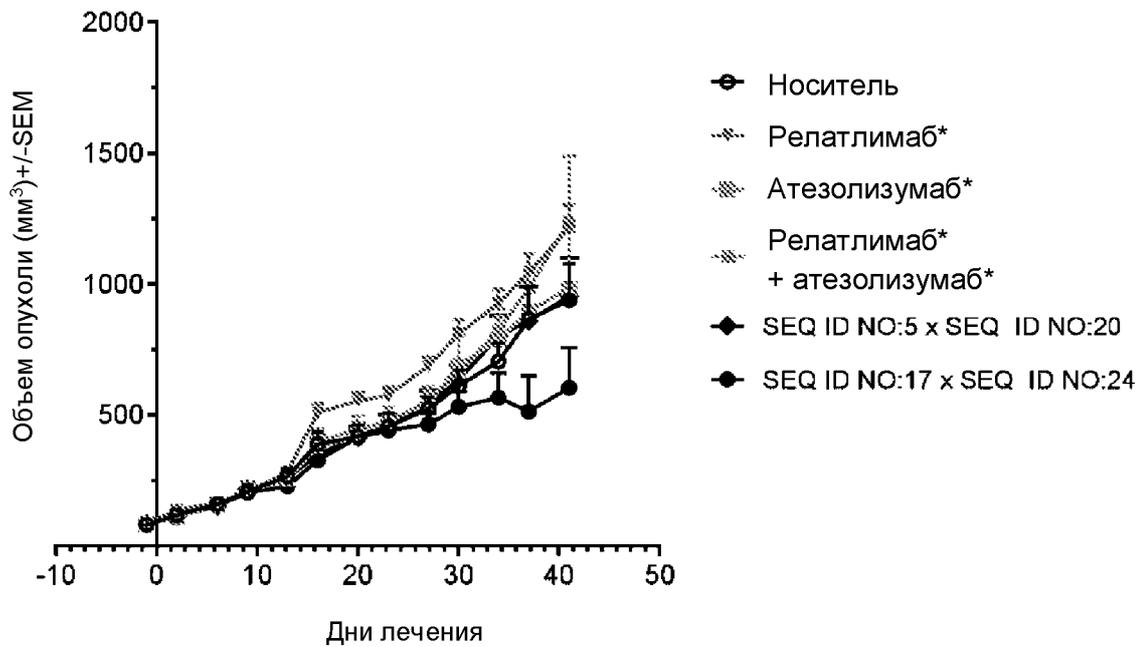
Фиг. 6A2



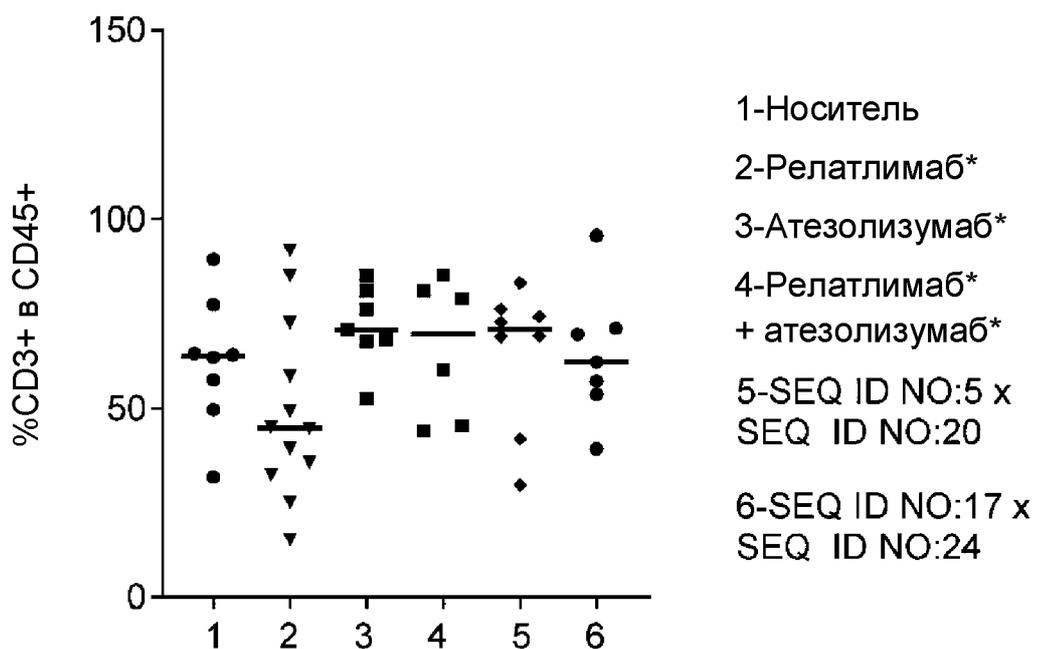
Фиг. 6А3



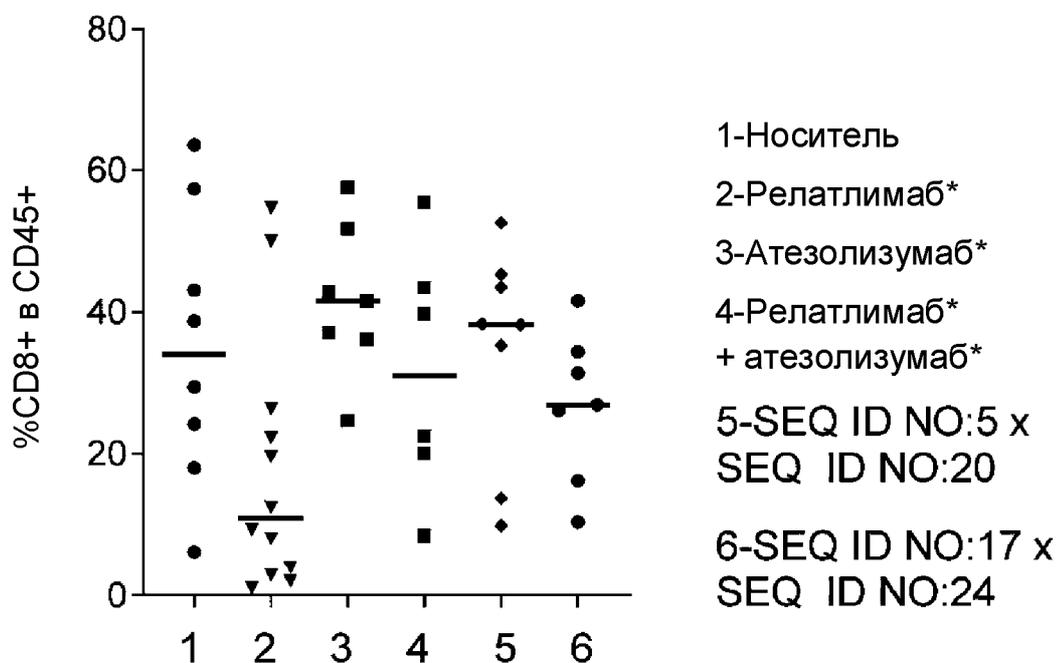
Фиг. 6А4



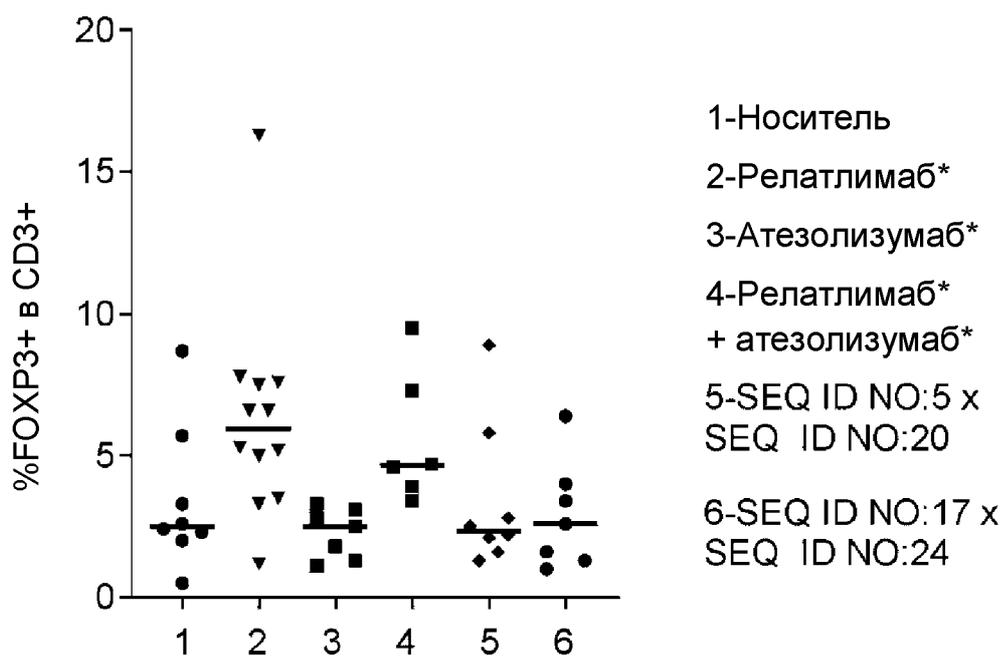
Фиг. 6B1



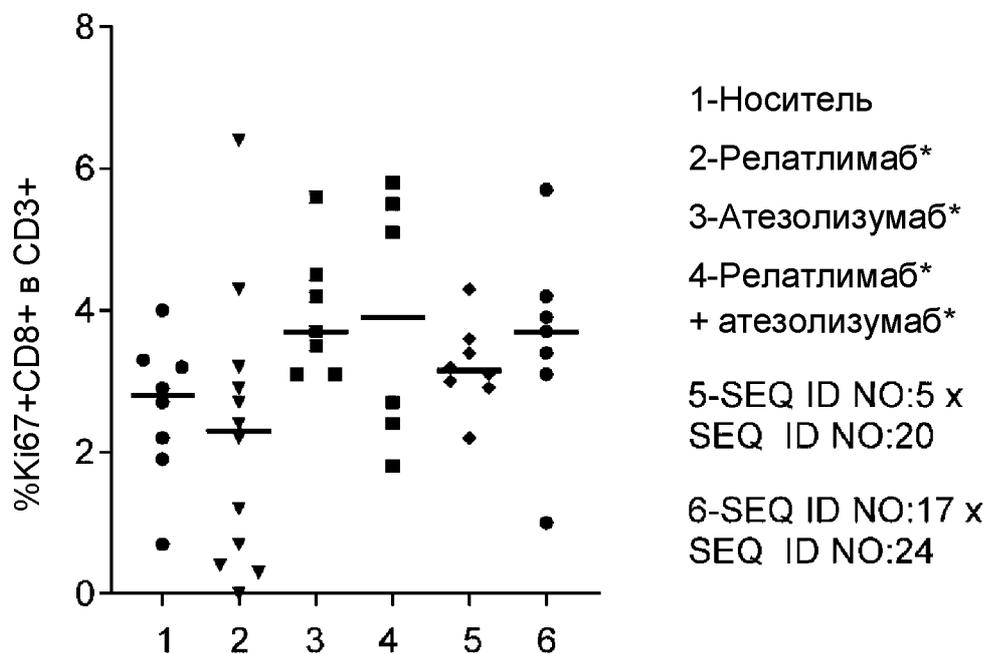
Фиг. 6B2



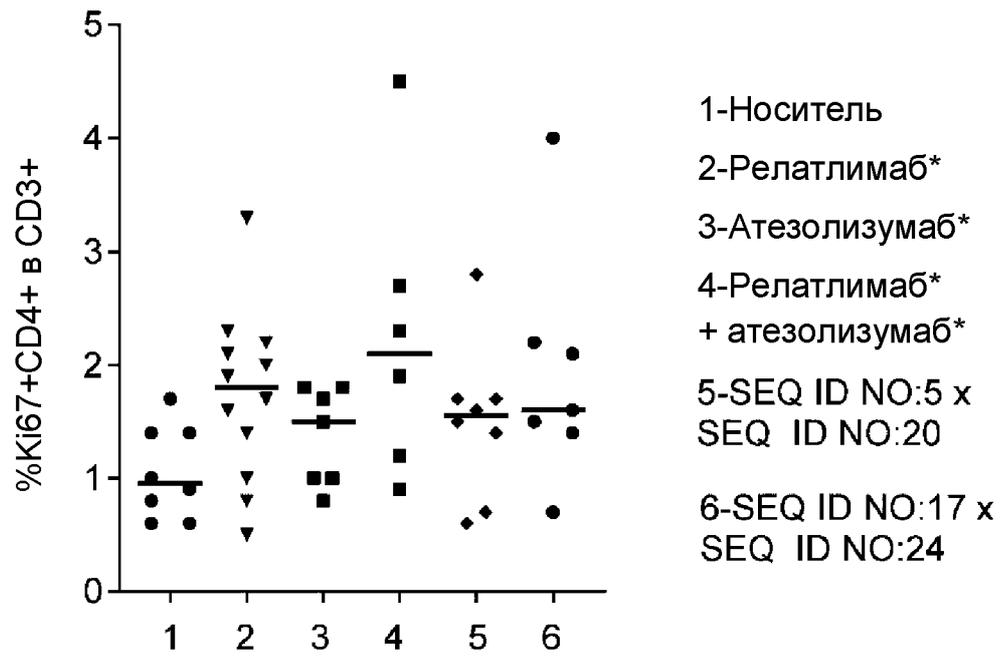
Фиг. 6B3



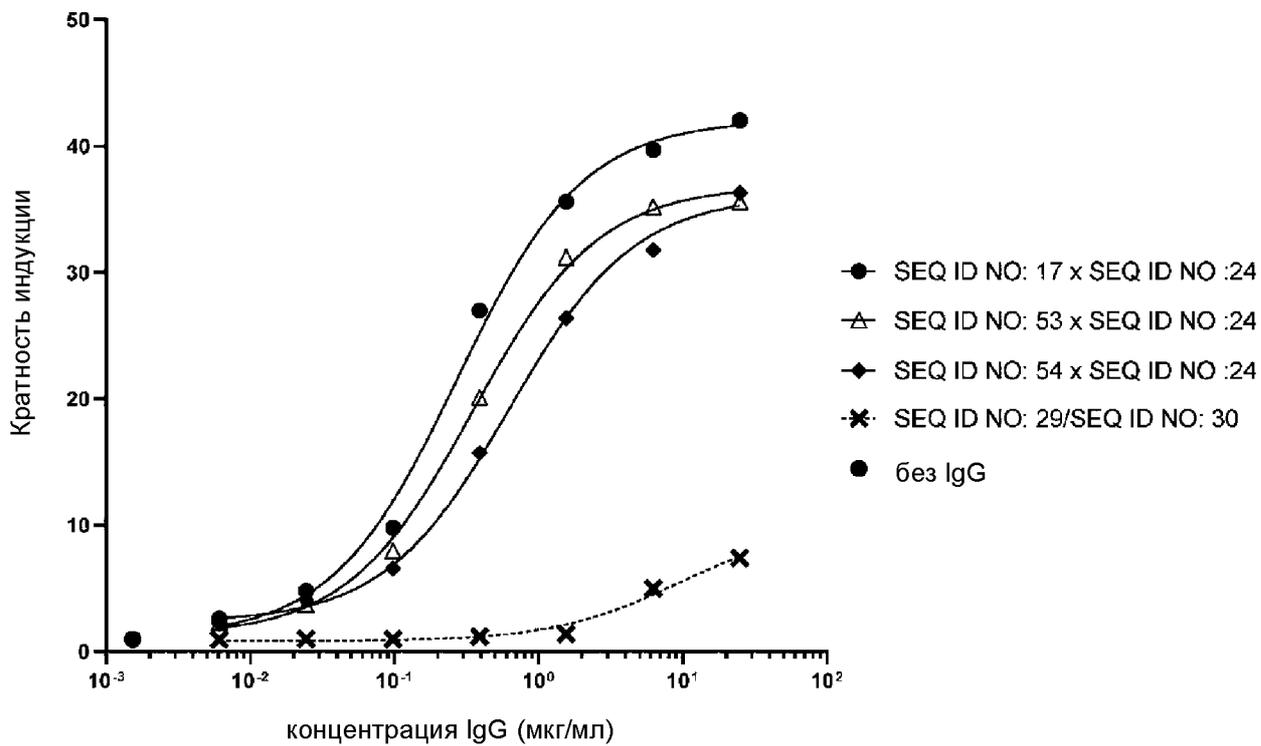
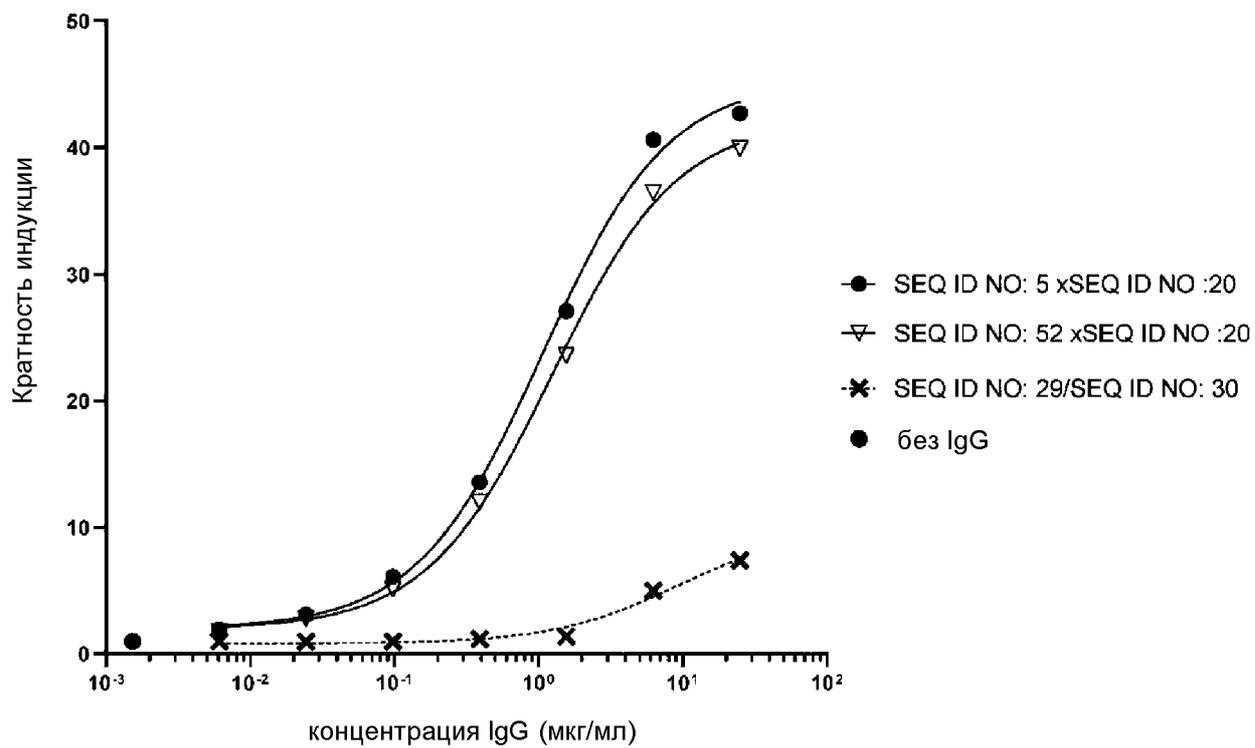
Фиг. 6B4

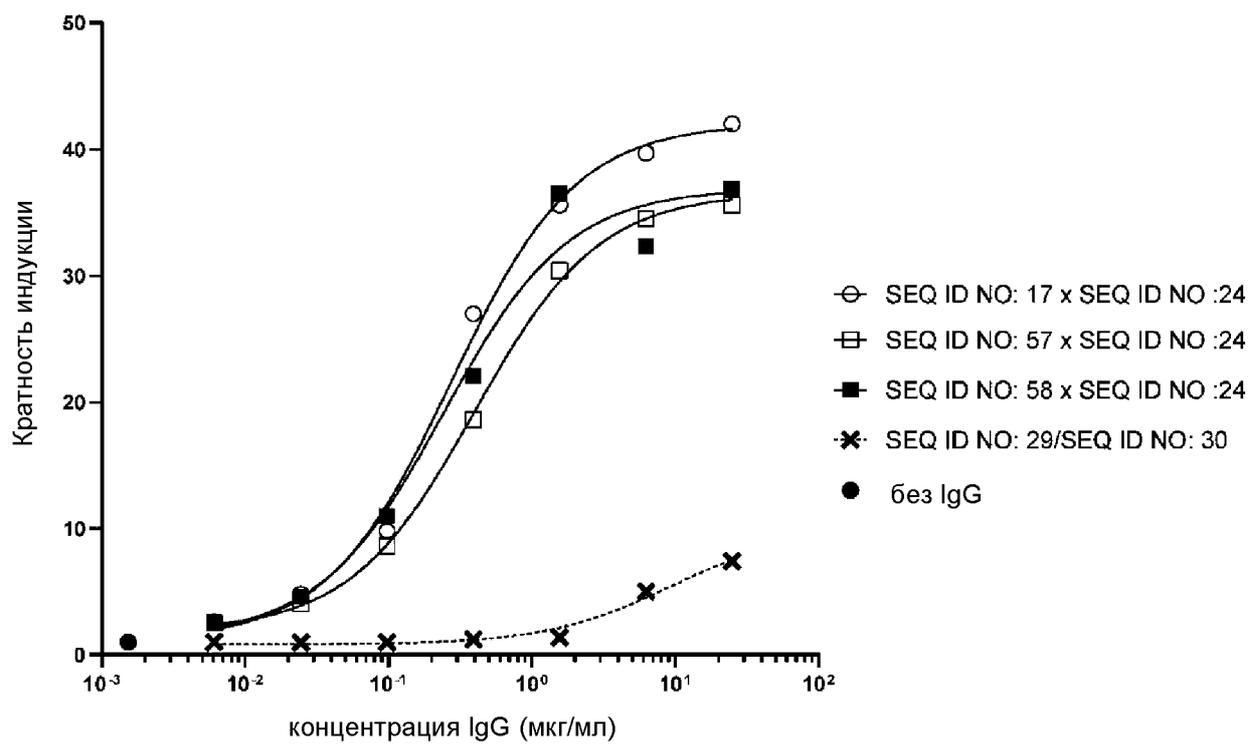
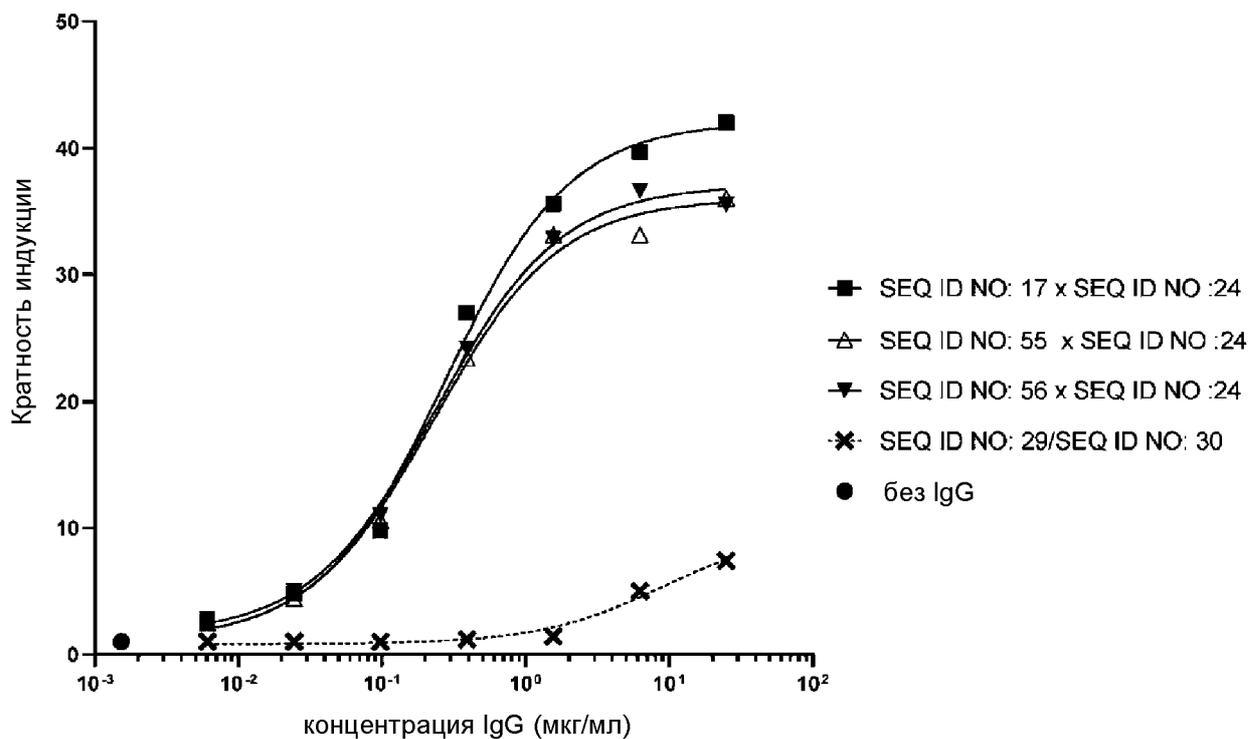


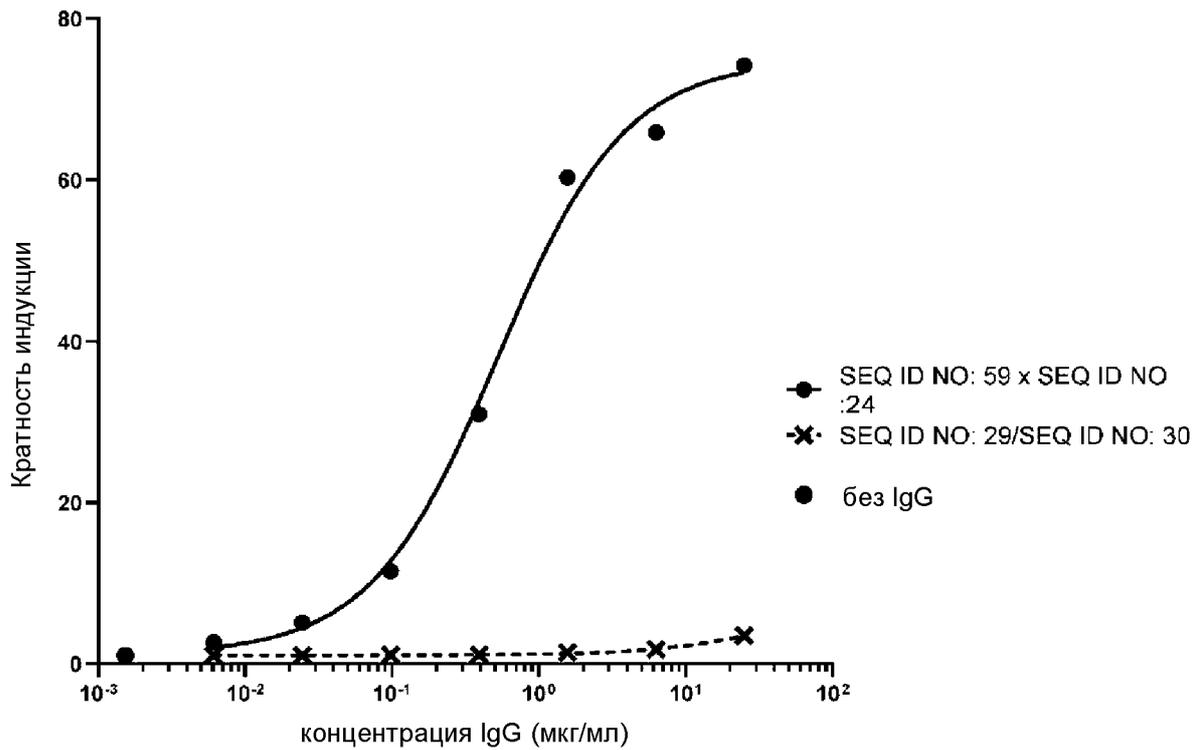
Фиг. 6B5



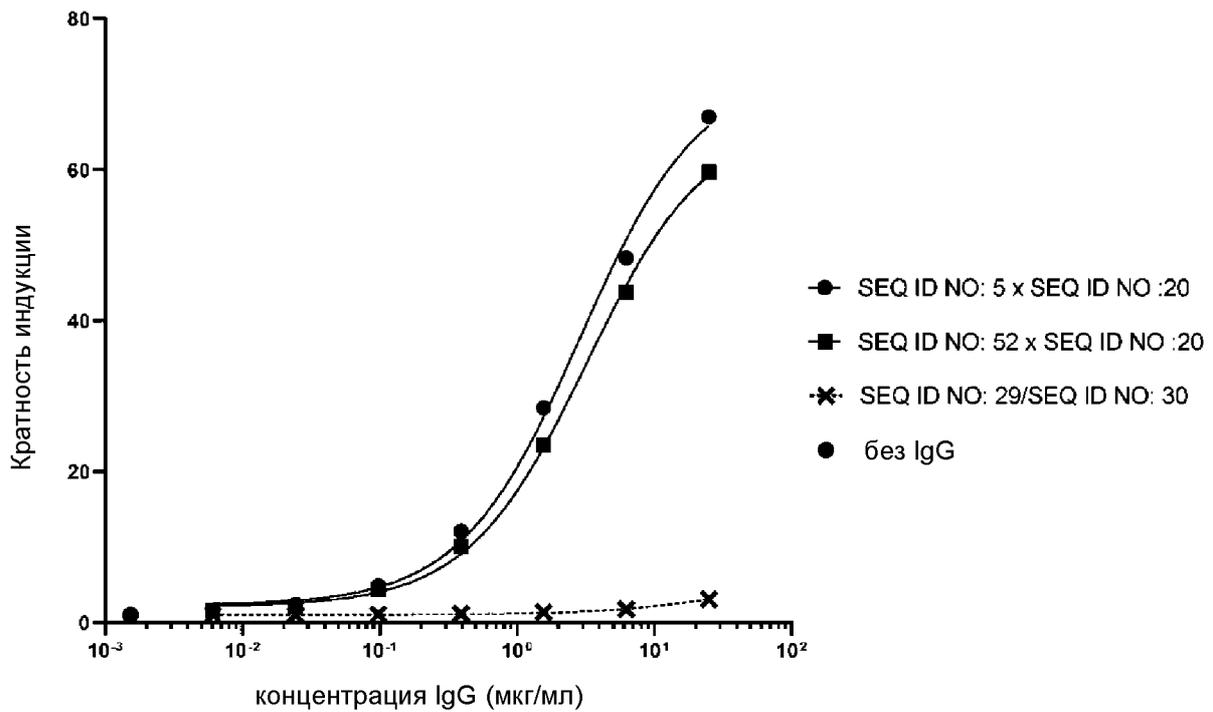
Фиг. 7А

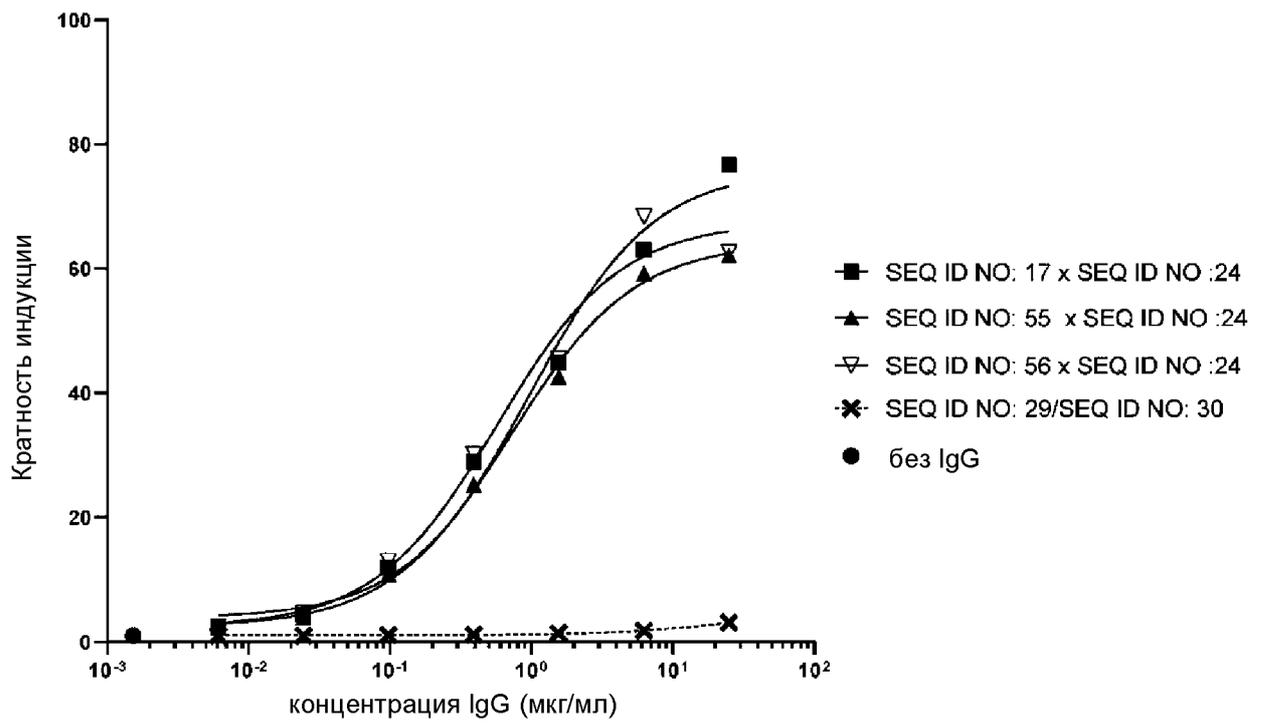
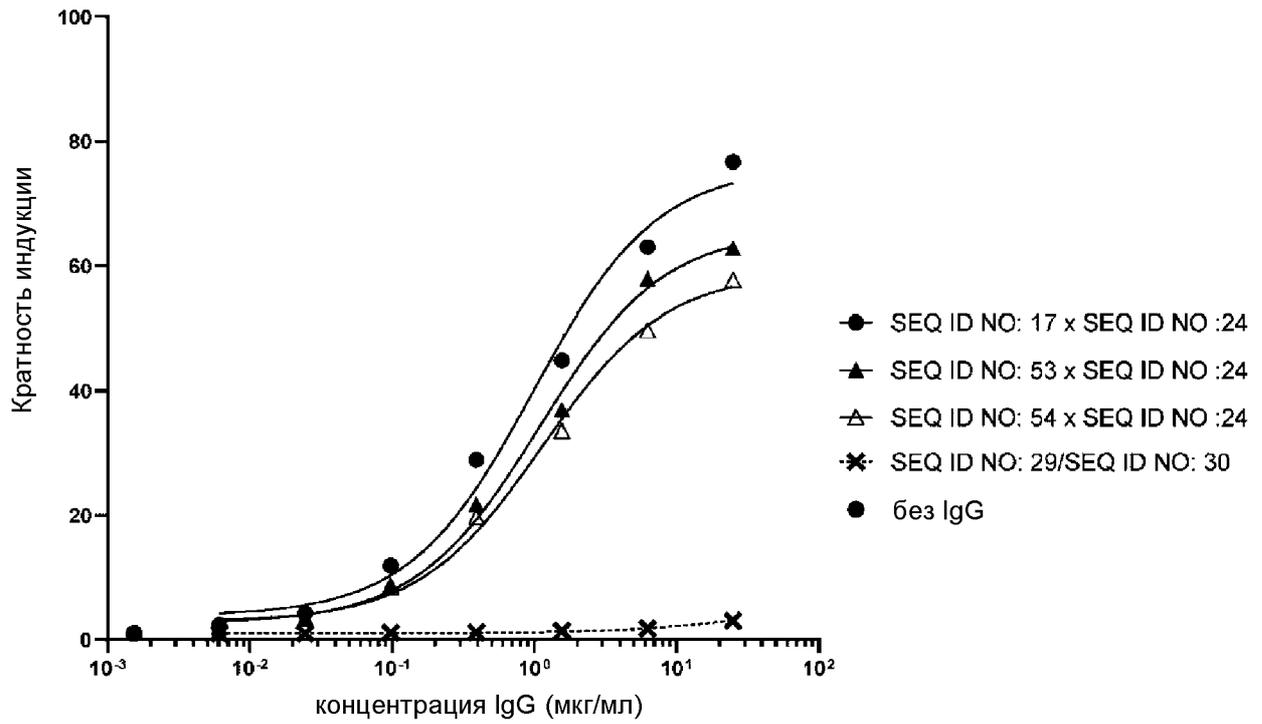


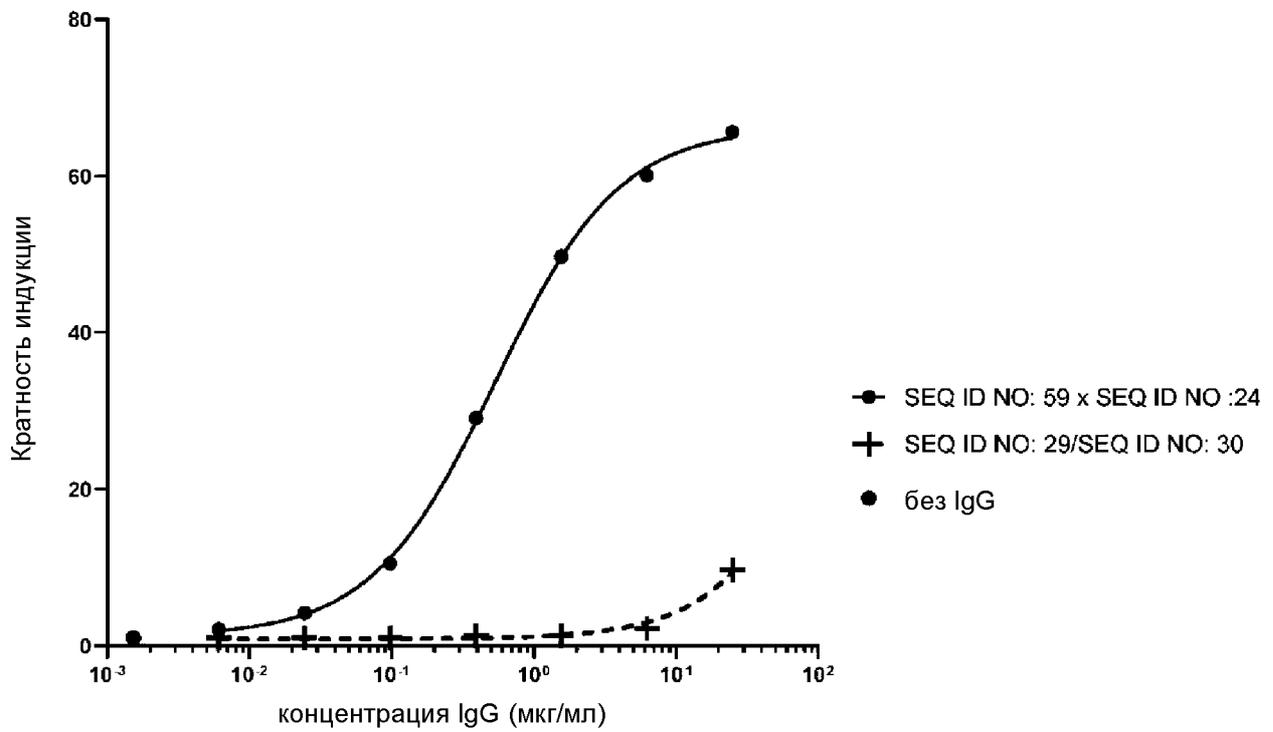
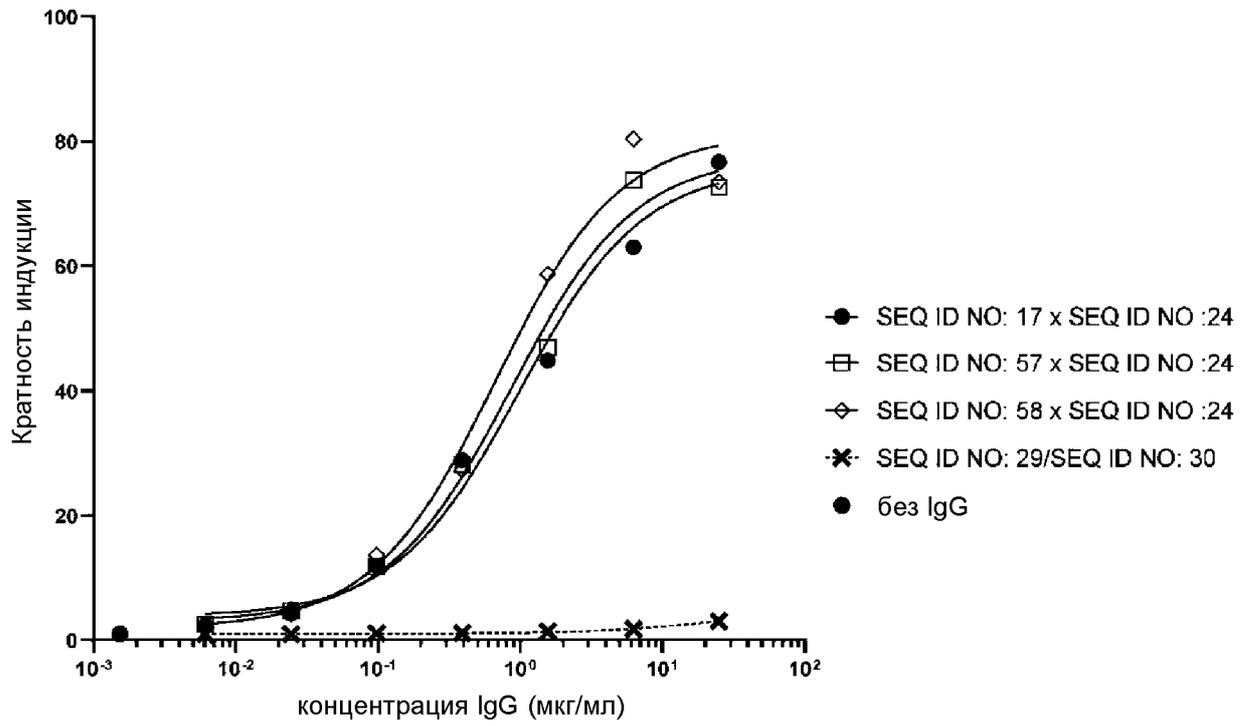




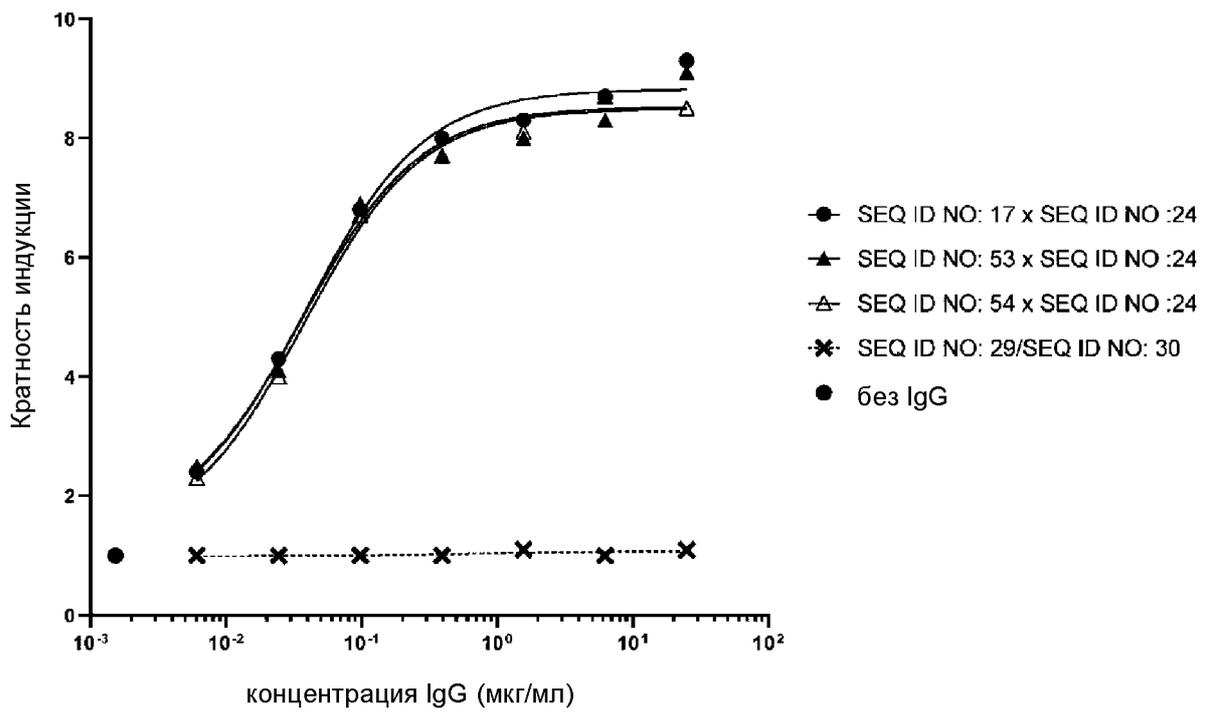
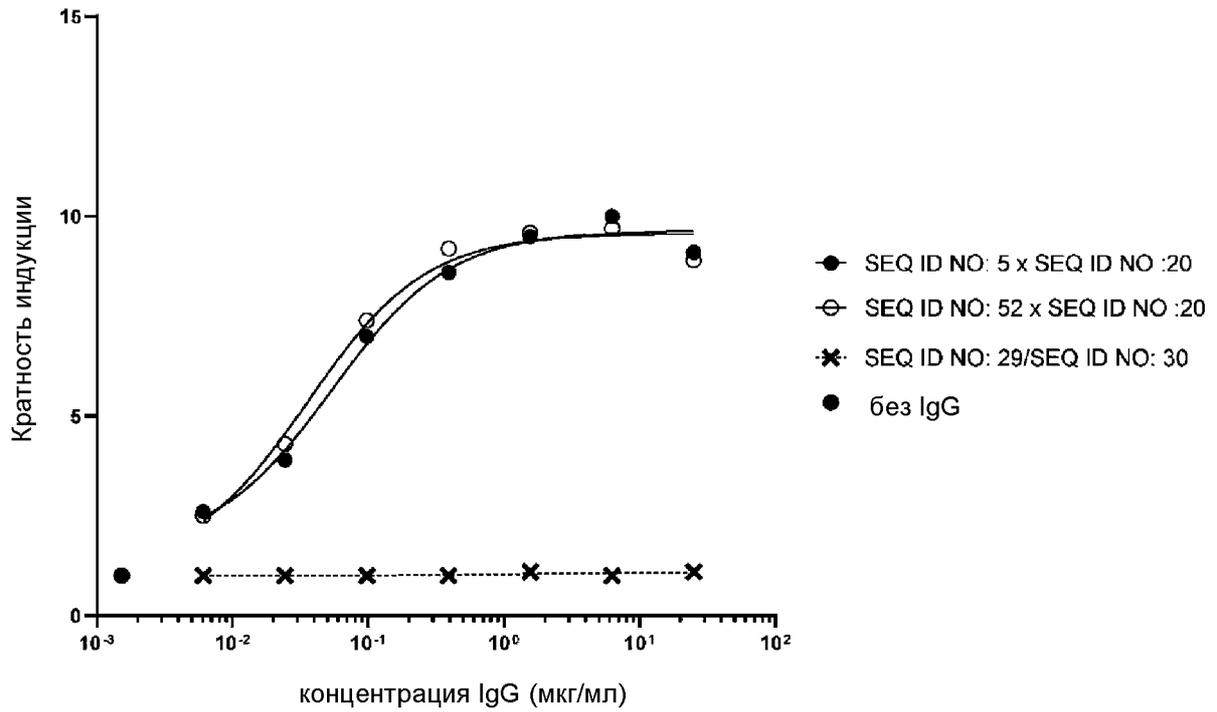
Фиг. 7В

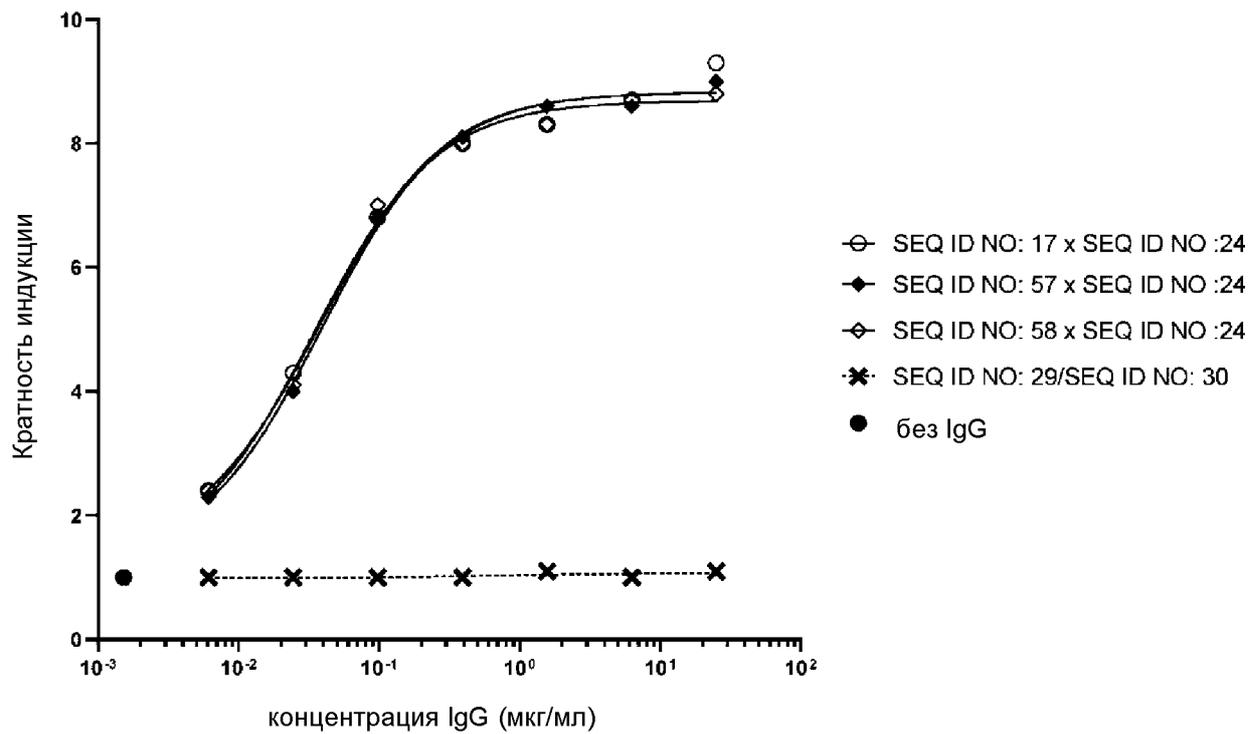
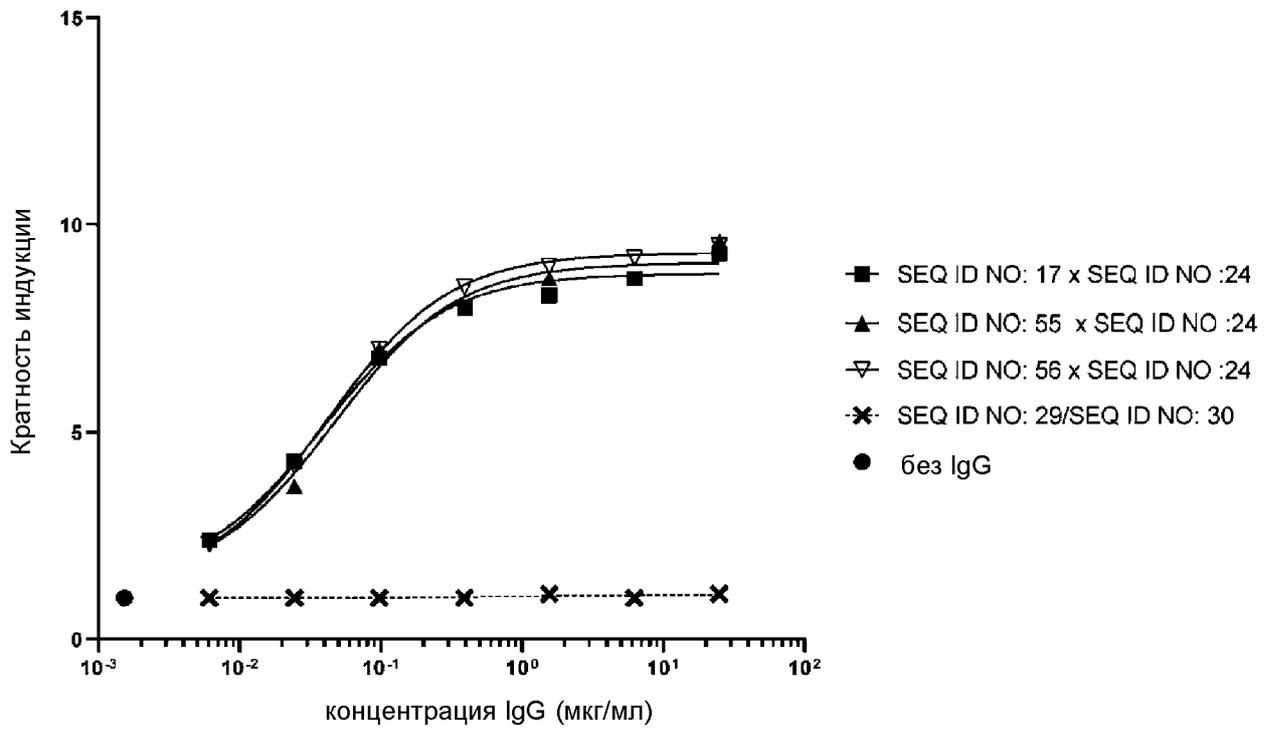


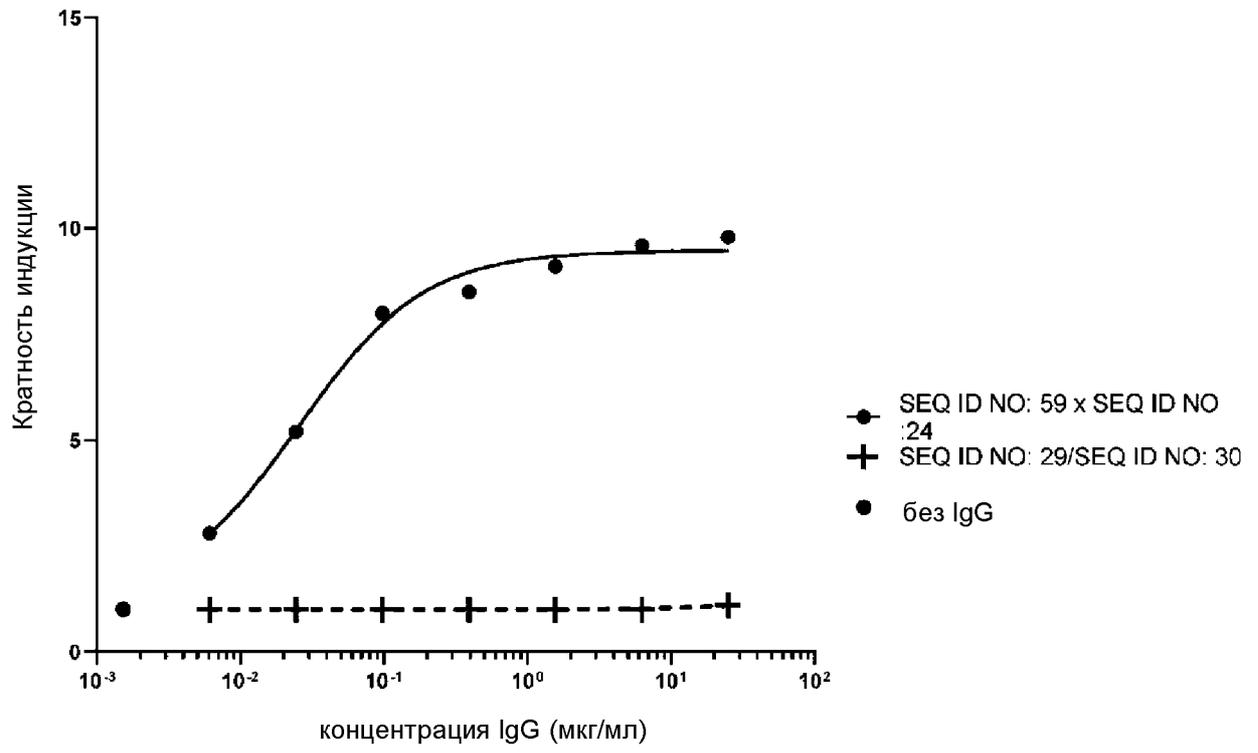




Фиг. 7С







Фиг. 8

