

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202090005** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2020.06.18

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 16/12* (2006.01)  
*C07K 16/46* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.07.06

---

(54) **АНТИТЕЛА, МОДУЛИРУЮЩИЕ БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ,  
ПРОЯВЛЯЕМУЮ КЛЕТКОЙ**

---

(31) 17180070.9

(32) 2017.07.06

(33) EP

(86) PCT/NL2018/050451

(87) WO 2019/009728 2019.01.10

(71) Заявитель:

МЕРУС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Гёин Сесилия Анна Вильгельмина,  
Кластер Ринсе, Де Крейф Корнелис  
Адриан, Таккен Паулус Йоханнес,  
Тросби Марк, Логтенберг Тон (NL)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

---

(57) Изобретение обеспечивает средства и способы предотвращения опосредуемому белком запрограммированной гибели клеток 1 (Programmed Cell Death 1 белок (PD-1)) и активатором лимфоцитов 3 (LAG-3), ингибированию в PD-1-положительной и/или LAG-3-положительной клетке. Способ может включать приведение указанной клетки в контакт с антителом или его функциональной частью, производным и/или аналогом, содержащими переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1, и переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3, тем самым ингибируя опосредуемую PD-1 и/или LAG-3 активность в указанной клетке. Изобретение также обеспечивает антитела или их варианты, содержащие переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1, и переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3.

---

**A1**

**202090005**

**202090005**

**A1**

## АНТИТЕЛА, МОДУЛИРУЮЩИЕ БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ, ПРОЯВЛЯЕМУЮ КЛЕТКОЙ

Настоящее изобретение относится к области антител. В частности, оно относится к области терапевтических антител для лечения заболеваний, в которые вовлечены аберрантные клетки. Более конкретно, оно относится к антителам, которые связываются с внеклеточными частями двух или более мембраносвязанных белков и тем самым модулируют биологическую активность, проявляемую клеткой.

Рак по-прежнему является основной причиной смертности в мире, несмотря на многочисленные успехи, достигнутые в лечении этого заболевания, а также накопленные знания о молекулярных явлениях, приводящих к возникновению рака. Например, колоректальный рак (КРР) является третьим по распространенности видом рака в мире. В 2008 году данное заболевание было диагностировано у 1,23 миллиона человек. Это второй по распространенности вид рака в Европе, в 2012 году было диагностировано около 447000 новых случаев (13% от общего числа).

Колоректальный рак является четвертой по распространенности причиной смерти от рака, и, по оценкам, приводит к 608000 (в ЕС - 148000) летальных исходов в год. Несмотря на то, что был разработан ряд новых методов лечения КРР, многие методы не прошли клинические испытания; метастатический КРР остается в значительной степени неизлечимым с помощью традиционных методов лечения. Меланома является еще одним примером рака, который встречается очень часто. При недостаточно раннем обнаружении указанный рак склонен к метастазированию, и на этой стадии он очень трудно поддается лечению. Было показано, что методы лечения, включающие иммунологическое вмешательство, эффективны по меньшей мере для некоторых пациентов с метастазирующей меланомой. Немелкоклеточный рак легкого является типом рака, который редко обнаруживают на достаточно ранней для хирургического лечения стадии. Помимо этого, лечение этих типов рака успешно осуществлялось с помощью методов лечения, включающих иммунологическое вмешательство.

Традиционно поиск лекарственных средств против рака был сфокусирован на агентах, которые блокируют жизненно важные функции

клеток и уничтожают делящиеся клетки. Однако в случае рака на поздней стадии химиотерапия, независимо от того, насколько интенсивно она применяется, вплоть до той степени, когда пациенты страдают от опасных для жизни побочных эффектов лечения, редко приводит к полному излечению. В  
5 большинстве случаев опухоли у пациентов прекращают рост или временно уменьшаются в размерах (что называется ремиссией) лишь для того, чтобы снова начать пролиферировать в несколько раз быстрее (что называется рецидивом) и все хуже поддаваться лечению. В последнее время центр  
10 внимания в разработке лекарственных средств против рака сместился от цитотоксической химиотерапии широкого спектра действия к направленной (таргетированной) цитостатической терапии с меньшей токсичностью. Лечение рака на поздней стадии было клинически подтверждено при лейкозе и некоторых других раковых заболеваниях. Однако при большинстве карцином таргетированные подходы все еще оказываются недостаточно эффективными  
15 для полного устранения рака у большинства пациентов.

Таргетированное воздействие на раковые заболевания было достигнуто с применением множества различных способов, включая, например, малые молекулы, нацеленные на сигнальные белки, от которых зависит выживание и/или рост раковых клеток; вакцины с опухолеспецифическими белками;  
20 клеточную терапию с применением иммунных клеток, которые активно уничтожают опухолевые клетки, и антител, которые направляют цитотоксические молекулы к опухоли; препятствуют передаче сигналов и/или (пере)направляют иммунную систему хозяина на опухолевые клетки.

Настоящее изобретение обеспечивает новые средства и способы  
25 (пере)направления компонентов иммунной системы. Настоящее изобретение также относится к средствам и способам модуляции биологической активности, проявляемой клетками.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

30

Настоящее изобретение обеспечивает способ предотвращения опосредуемому белком запрограммированной гибели клеток 1 (Programmed Cell Death 1 белок (PD-1)), а также активатором лимфоцитов 3 (LAG3)), ингибированию в PD-1-положительной и/или LAG3-положительной клетке,

включающий приведение указанной клетки в контакт с антителом или его функциональной частью, производным и/или аналогом, содержащими:

-вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1, и

5           -вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3, тем самым ингибируя опосредуемую PD-1 и/или LAG-3 активность в указанной клетке.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ стимулирования формирования, стабильности или активности иммунологического синапса, включающий обеспечение системы, которая содержит по меньшей мере две  
10           клетки, способные связываться друг с другом через иммунологический синапс, и введение в указанную систему антитела или его функциональной части, производного и/или аналога, которые содержат:

15           - вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1, и

            - вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3,

            тем самым стимулируя формирование, стабильность или активность иммунологического синапса между указанными по меньшей мере двумя  
20           клетками.

Кроме того, предложено антитело или его вариант, содержащий вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1, и вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3.

25           В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения связывание указанного связывающегося PD-1 вариабельного домена с PD-1 блокирует связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2, предпочтительно PD-L1. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения связывание указанного LAG3-связывающего вариабельного домена с LAG3 блокирует  
30           связывание LAG3 с ГЧГС класса II.

Указанный вариабельный домен, связывающийся с LAG-3, предпочтительно представляет собой вариабельный домен, который связывается со внеклеточным доменом 1, 2, 3 или 4 LAG-3, предпочтительно доменом 1 или доменом 2.

Кроме того, предложено антитело или его вариант, содержащий  
вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1,  
и вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью  
LAG-3; причем вариабельный домен, который может связываться с PD-1,  
5 содержит вариабельную область тяжелой цепи с участком CDR3, содержащую  
аминокислотную последовательность CDR3 вариабельной области тяжелой  
цепи одной из VH, представленных для MF6076; MF6226; MF6236; MF6256;  
MF6930; MF6932; MF6935; MF6936; MF6972; MF6974 или MF6982 на фигуре 3;  
предпочтительно MF6256, MF6930, MF6076, MF6974 или MF6226,  
10 предпочтительно MF6930, MF6076 или MF6974. В предпочтительном варианте  
реализации указанный вариабельный домен, который может связываться с PD-  
1, содержит вариабельную область тяжелой цепи с участком CDR1, CDR2 и  
CDR3, который содержит аминокислотную последовательность CDR1, CDR2 и  
CDR3 вариабельной области тяжелой цепи одной из VH, представленных для  
15 MF6076; MF6226; MF6236; MF6256; MF6930; MF6932; MF6935; MF6936;  
MF6972; MF6974 или MF6982 на фигуре 3; предпочтительно MF6256; MF6930;  
MF6076, MF6974 или MF6226, предпочтительно MF6930, MF6076 или MF6974.

Кроме того, предложено антитело или его вариант, содержащий  
вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1,  
20 и вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью  
LAG-3; причем указанный вариабельный домен, который может связываться с  
PD-1, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую  
аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи,  
представленную для MF6076; MF6226; MF6236; MF6256; MF6930; MF6932;  
25 MF6935; MF6936; MF6972; MF6974 или MF6982 на фигуре 3; предпочтительно  
MF6256; MF6930; MF6076, MF6974 или MF6226, предпочтительно MF6930,  
MF6076 или MF6974, содержащую не более 15, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5,  
6, 7, 8, 9 или 10, и предпочтительно содержащую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок,  
делаций, замен аминокислот или комбинацию указанного относительно  
30 аминокислотной последовательности VH, представленного для MF.

Вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью  
LAG-3, предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи с  
участком CDR3, содержащим аминокислотную последовательность участка

CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, представленную для MF7100; MF7111; MF7116; MF7118; MF7134; MF7136; MF7137; MF7142; MF7146; MF7165; MF7167; MF7185; MF7443; MF7444; MF7515; MF7518; MF7096; MF7097; MF7106; MF7120; MF7133; MF7139; MF7144 или MF7524 на фигуре 3, предпочтительно MF7518; MF7165; MF7116; MF7096; MF7133; MF7139; MF7524 или MF7137, предпочтительно MF7139; MF7524, MF7133, MF7518 или MF7096. Предпочтительно вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3, содержит вариабельную область тяжелой цепи с участком CDR1, CDR2 и CDR3, который содержит аминокислотную последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи одной из VH, представленных для MF7100; MF7111; MF7116; MF7118; MF7134; MF7136; MF7137; MF7142; MF7146; MF7165; MF7167; MF7185; MF7443; MF7444; MF7515; MF7518; MF7096; MF7097; MF7106; MF7120; MF7133; MF7139; MF7144 или MF7524 на фигуре 3, предпочтительно MF7518; MF7165; MF7116; MF7096; MF7133; MF7139; MF7524 или MF7137, предпочтительно MF7139; MF7524, MF7133, MF7518 или MF7096.

Вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3, предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность вариабельного участка тяжелой цепи, представленную для MF7100; MF7111; MF7116; MF7118; MF7134; MF7136; MF7137; MF7142; MF7146; MF7165; MF7167; MF7185; MF7443; MF7444; MF7515; MF7518; MF7096; MF7097; MF7106; MF7120; MF7133; MF7139; MF7144 или MF7524 на фигуре 3, предпочтительно MF7518; MF7165; MF7116; MF7096; MF7133; MF7139; MF7524 или MF7137, предпочтительно MF7139; MF7524, MF7133, MF7518 или MF7096, содержащую не более 15, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и предпочтительно содержащую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или комбинацию указанного относительно аминокислотной последовательности указанного MF.

Антителу согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность MF, представленную на фигуре 3. В предпочтительном варианте реализации антитело дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность

вариабельной области легкой цепи, представленную на фигуре 1. В предпочтительном варианте реализации легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную на фигуре 1А. В предпочтительном варианте реализации тяжелая цепь содержит константную область антитела IgG1, предпочтительно антитела IgG1 человека. В предпочтительном варианте реализации участок CH2 указанной константной области IgG1 выполнена с возможностью уменьшения АЗКЦ (антителозависимой клеточной цитотоксичности) и/или КЗКЦ (комплементзависимой цитотоксичности) активности антитела. В предпочтительном варианте реализации область CH2 содержит последовательность, представленную на фигуре 2Е. В предпочтительном варианте реализации область CH3 антитела выполнена с возможностью облегчения гетеродимеризации тяжелых цепей. В предпочтительном варианте реализации одна тяжелая цепь содержит последовательность, представленную на фигуре 2F, и другая тяжелая цепь содержит последовательность, представленную на фигуре 2G.

Кроме того, предложена фармацевтическая композиция, содержащая одно или более антител или их вариантов согласно настоящему изобретению.

Также предложена молекула нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь (цепи) или вариабельную область (области) тяжелой цепи антитела согласно настоящему изобретению или его варианта.

Также предложена молекула нуклеиновой кислоты или набор молекул нуклеиновой кислоты, которая кодирует антитело согласно настоящему изобретению.

Также предложена клетка, содержащая одну или более молекул нуклеиновой кислоты, которые по отдельности или совместно кодируют антитело или его вариант согласно настоящему изобретению. Также предложены способы получения антитела или его варианта согласно настоящему изобретению с применением клетки согласно настоящему описанию, предпочтительно включающие сбор антитела или его варианта из культуры клеток.

Кроме того, предложена клеточная система, которая содержит антитело или его вариант согласно настоящему изобретению.

Также предложен способ лечения субъекта, имеющего заболевание, в которое вовлечены аберрантные клетки, такое как рак, или имеющего  
5 хроническое инфекционное заболевание, вызванное вирусом или паразитом, включающий введение антитела или его варианта согласно настоящему изобретению, предпочтительно биспецифического антитела или его варианта согласно настоящему изобретению, нуждающемуся в этом субъекту.

Кроме того, Настоящее изобретение обеспечивает антитело или его  
10 вариант согласно настоящему изобретению; предпочтительно биспецифическое антитело или его вариант согласно настоящему изобретению, для применения для лечения субъекта, имеющего заболевание, в которое вовлечены аберрантные клетки, такое как рак, или хроническое инфекционное заболевание, вызванное вирусом или паразитом.

Также предложено антитело согласно настоящему изобретению или его  
15 вариант, который сохраняет специфичность связывания указанного антитела, или молекулы нуклеиновой кислоты, или функционального эквивалента согласно настоящему изобретению, для применения в качестве лекарственного средства.

Настоящее изобретение также обеспечивает о антитело согласно  
20 настоящему изобретению или вариант указанного антитела, который сохраняет специфичность связывания указанного антитела согласно настоящему изобретению, для применения для лечения субъекта, который имеет заболевание, в которое вовлечены аберрантные клетки, такое как рак,  
25 или который имеет инфекцию, предпочтительно инфекцию, вызванную вирусом или паразитом.

Также предложено применение антитела или варианта согласно  
настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения или предотвращения рака и/или инфекции, предпочтительно инфекции,  
30 вызванной вирусом или паразитом.

В предпочтительном варианте реализации указанный паразит является внутриклеточным паразитом.

Кроме того, предложен способ стимулирования у субъекта иммунного  
ответа против аберрантной клетки, присутствующей в организме указанного



субъекта, причем указанный способ включает введение указанному субъекту (обеспечение) антитела или его а предпочтительно биспецифического антитела или его варианта, согласно настоящему изобретению. Аберрантная клетка предпочтительно представляет собой раковую клетку, инфицированную вирусом клетку, паразита или инфицированную паразитом клетку. В предпочтительном варианте реализации клетка представляет собой раковую клетку или неопластическую клетку.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10

Истощение Т-клеток опосредовано несколькими ингибирующими рецепторами, включая белок запрограммированной гибели клеток 1 (Programmed Cell death protein 1 (PD1)), белок 3 Т-клеток, содержащий домен иммуноглобулина и муцина (TIM-3) и LAG3. Основной лиганд LAG3 представляет собой ГКГС класса II, с которым он связывается с большей аффинностью, чем CD4. Белок отрицательно регулирует пролиферацию, активацию и гомеостаз Т-клеток аналогичным образом, что и CTLA-4 и PD-1, и, как сообщается, играет роль в Treg-супрессивной функции. Как сообщается, LAG3 также способствует сохранению CD8+ Т-клеток в толерогенном состоянии. LAG3 известен под рядом различных названий, таких как активатор лимфоцитов 3; активирующий лимфоциты ген 3; антиген к CD223; белок FDC; CD223; LAG-3 или FDC. Внешние идентификационные номера LAG3: HGNC: 6476; Entrez Gene: 3902; Ensembl: ENSG00000089692; OMIM: 153337 и UniProtKB: P18627. LAG - 3 тесно связан с CD4. LAG - 3 расположен на хромосоме 12 человека (12p13.32) рядом с геном CD4, и его последовательность приблизительно на 20% идентична CD4. Белок LAG - 3 связывается с неголоморфной областью основного комплекса гистосовместимости 2 (Г К Г С класса II) с большей аффинностью, чем CD4. LAG - 3 является одним из различных рецепторов контрольных точек иммунитета, которые координированно положительно регулируются как регуляторными Т-клетками (Tregs), так и анергическими Т-клетками. LAG - 3 может отрицательно регулировать пролиферацию, активацию и гомеостаз Т-клеток.

Белок запрограммированной гибели клеток 1 (Programmed Cell Death 1 protein (PD-1)) представляет собой рецептор клеточной поверхности, который принадлежит к семейству рецепторов CD28 и экспрессируется на Т-клетках и про-В клетках. В настоящее время известно, что PD-1 связывается с двумя лигандами, PD-L1 и PD-L2. PD-1, выполняющий функцию контрольной точки иммунного ответа, играет важную роль в подавлении иммунной системы путем ингибирования активации Т-клеток, что, в свою очередь, снижает аутоиммунитет и способствует ауто толерантности. Предполагают, что ингибирующее действие PD-1 достигается благодаря двойному механизму стимуляции апоптоза (программируемой гибели клеток) антиген-специфических Т-клеток в лимфатических узлах и одновременному снижению апоптоза регуляторных Т-клеток (супрессорных Т-клеток). PD-1 также известен под рядом различных названий, таких как PDCD1; Programmed Cell Death 1; фактор 2 восприимчивости к системной красной волчанке; белок PD-1; HPD-1; PD1; белок 1 запрограммированной гибели клеток; антиген CD279; CD279; HPD-L; HSLE1; SLEB2 и PD-1. Внешние идентификаторы для PD-1: HGNC: 8760; Entrez Gene: 5133; Ensembl: ENSG00000188389; OMIM: 600244 и UniProtKB: Q15116. Новые классы лекарственных средств, которые блокируют активность PD-1, ингибиторы PD-1, активируют иммунную систему для атаки опухолей и вследствие этого успешно применяются для лечения некоторых видов рака.

PD-L1 представляет собой трансмембранный белок типа 1, который играет роль в подавлении иммунного ответа во время определенных событий, таких как беременность, присутствие аллотрансплантата, аутоиммунное заболевание и другие патологические состояния, такие как гепатит. Связывание PD-L1 с PD-1 или B7.1 (CD80) передает ингибирующий сигнал, который уменьшает пролиферацию экспрессирующих PD-1 Т-клеток. Считают, что PD-1 способен регулировать накопление специфичных к чужеродным антигенам Т-клеток посредством апоптоза. PD-L1 экспрессируется множеством раковых клеток, и считается, что его экспрессия по меньшей мере частично является причиной ослабления иммунного ответа против раковой клетки. PD-L1 является членом семейства белков B7 и известен под множеством других названий, таких как молекула CD274; антиген CD274; гомолог B7 1; лиганд 1 PDCD1; PDCD1LG1; PDCD1L1; B7H1; PDL1; Programmed Cell Death 1 Ligand 1;

Programmed Death Ligand 1; B7-H1 и B7-H. Внешние идентификаторы для CD274: HGNC: 17635; Entrez Gene: 29126; Ensembl: ENSG00000120217; OMIM: 605402; UniProtKB: Q9NZQ7.

PD-L2 является вторым лигандом для PD-1. Вовлечение PD-1 посредством PD-L2 подавляет пролиферацию, опосредуемую рецептором Т-клеток (TCR), и выработку цитокинов Т-клетками CD4+. При низких концентрациях антигена связывание PD-L2/PD-1 ингибирует сигналы B7-CD28. При высоких концентрациях антигена связывание PD-L2/PD-1 снижает выработку цитокинов. Экспрессия PD-L на антигенпрезентирующих клетках повышается при обработке интерфероном гамма. Он экспрессируется в некоторых нормальных тканях и ряде опухолей. Считают, что PD-L1 и PD-L2 имеют перекрывающиеся функции и регулируют ответы Т-клеток. Указанный белок известен под рядом других названий, таких как Programmed Cell Death 1 Ligand 2; молекула дендритных клеток B7 (B7 Dendritic Cell Molecule); Programmed Death Ligand 2; бутирофилин B7-DC (Butyrophilin B7-DC); PDCD1 Ligand 2; PD-1 Ligand 2; PDCD1L2; B7-DC; CD273; B7DC; PDL2; PD-1-Ligand 2; антиген CD273; BA574F11.2 и Btdc. Внешние идентификаторы для PD-L2: HGNC: 18731; Entrez Gene: 80380; Ensembl: ENSG00000197646; OMIM: 605723 и UniProtKB: Q9BQ51.

Ссылка на идентификаторы последовательностей приведена для определения того, какой белок является мишенью. Антитело согласно настоящему изобретению также распознает по меньшей мере некоторые варианты белка-мишени, такие как аллельные варианты, варианты сплайсинга и мутантные варианты, при условии, что эпитоп, распознаваемый соответствующим переменным доменом антитела, не был затронут. Некоторые из альтернативных названий могут как использоваться, так и не использоваться для обозначения других белков. Указанные названия приведены только для справочных целей. Антитело согласно настоящему изобретению связывается с белком, экспрессируемым на клетках. Оно также может связываться с вариантами данного белка до тех пор, пока доступен эпитоп, с которым связывается антитело. Таким образом, оно также будет связываться с вариантами сплайсинга или мутантными белками (если таковые имеются) при условии, что указанный эпитоп доступен. Тот факт, что антитело связывается с указанным белком, означает, что оно обладает свойством

связываться с белком, и не подразумевает, что указанное антитело фактически связано с мишенью, хотя такая вероятность существует. Это также не означает, что антитело не связывается с другими белками.

В настоящем изобретении раскрыто антитело или его вариант, предпочтительно представляющее собой биспецифическое антитело или его вариант, которое связывается с внеклеточной частью представителя PD-1 (первый мембранный белок) и внеклеточной частью LAG-3 (второй мембранный белок). Такое (биспецифическое) антитело далее также упоминается как «антитело или биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению». Также предложены композиции и составные наборы, содержащие два или более (биспецифических) антитела согласно настоящему описанию.

Антитела, обычно, связываются со своей мишенью через так называемый сайт связывания антигена. Немодифицированный сайт связывания антигена, обычно, формируется переменным доменом антитела и находится в нем. Переменный домен содержит указанный сайт связывания антигена. Переменный домен, который связывается с антигеном, представляет собой переменный домен, содержащий сайт связывания антигена, связывающийся с данным антигеном.

В одном из вариантов реализации переменный домен антитела содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL). Сайт связывания антигена может присутствовать в комбинированном переменном домене VH/VL, или только в области VH, или только в области VL. Когда сайт связывания антигена присутствует в одной из двух областей переменного домена, вторая переменная область может вносить вклад в пространственную конформацию и/или стабильность связывающей переменной области, но не вносит значительного вклада в связывание самого антигена.

В контексте настоящего описания связывание антигена относится к типичной способности антитела связываться со своим антигеном. Связывание антитела с антигеном может быть оценено различными способами. Один из способов заключается в инкубировании антитела с антигеном (предпочтительно с клетками, экспрессирующими данный антиген), удалении несвязанного антитела (предпочтительно с помощью стадии промывки) и

обнаружении связанного антитела посредством меченого антитела, которое связывается со связанным антителом.

Связывание антигена антителом, обычно, опосредовано участками, определяющими комплементарность (CDR) антитела, и специфической  
5 трехмерной структурой как антигена, так и переменного домена, позволяющей этим двум структурам связываться друг с другом с точностью (взаимодействие по типу «ключа и замка»), в отличие от случайного, неспецифического слипания белков. Поскольку антитело, обычно, распознает часть антигена, называемую эпитопом антигена, и поскольку такой эпитоп  
10 может присутствовать также и в других соединениях, антитела согласно настоящему изобретению могут также распознавать другие белки, если эти другие соединения содержат такой же эпитоп. Следовательно, термин «связывание» не исключает связывание антитела с другим белком или белком (белками), который содержит тот же эпитоп. Указанный другой белок (белки)  
15 предпочтительно не является белком человека.

Белок согласно настоящему изобретению, такой как антитело, обычно, не связывается белками, отличными от указанного белка-мишени на мембране клеток, после рождения, предпочтительно у взрослого человека.

Термин «антитело» в контексте настоящего описания означает белковую  
20 молекулу, предпочтительно принадлежащую к классу белков-иммуноглобулинов, содержащих один или более переменных доменов, которые связываются с эпитопом на антигене, причем такие домены происходят от переменного домена антитела или имеют последовательность, гомологичную его последовательности. Антитела для терапевтического  
25 применения предпочтительно настолько близки к встречающимся в природе антителам субъекта, подлежащего лечению, насколько это возможно (например, антитела человека для субъектов-людей). Способность антитела к связыванию может быть выражена в терминах специфичности и аффинности. Специфичность определяет, какой антиген или его эпитоп специфически  
30 связывается связывающим доменом. Аффинность является мерой силы связывания с конкретным антигеном или эпитопом. Предпочтительно аффинность отдельных фрагментов антител согласно настоящему изобретению находится в наномолярном диапазоне. Антитела, такие как биспецифические антитела согласно настоящему изобретению, обычно, содержат константные

домены (часть Fc) встречающегося в природе антитела, которые могут быть сконструированы, как описано в других частях настоящего описания, например, для для снижения активности АЗКЦ и/или КЗКЦ. Антитело согласно настоящему изобретению, обычно, представляет собой  
5 биспецифическое полноразмерное антитело, предпочтительно подкласса IgG человека.

Вариабельный домен состоит из переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи. Переменная область тяжелой цепи, обычно, образована подвергшейся перегруппировке областью VDJ.  
10 Переменная область легкой цепи, обычно, образована подвергшейся перегруппировке областью VD. Области VDJ/VJ в настоящее время также могут быть получены искусственно с использованием, например, большого объема информации о последовательностях, которая доступна в отношении функциональных антител.

15 Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой «полноразмерное» антитело. Термин «полноразмерное» согласно настоящему изобретению включает по существу полное антитело, без одного или более искусственно добавленных фрагментов, размер которых превышает 20 аминокислотных остатков, таких как, например,  
20 дополнительные сайты связывания антигена, или дополнительные сайты активации, или дополнительные лиганды, или дополнительные лиганд-связывающие фрагменты. Полноразмерное антитело, однако, не обязательно обладает всеми функциями интактного антитела. Во избежание сомнений, полноразмерное антитело содержит две тяжелые и две легкие цепи. Каждая  
25 цепь содержит константную (C) и переменную (V) области, которые можно разделить на домены, обозначенные CH1, CH2, CH3, VH для тяжелой цепи и CL, VL для легкой цепи. Домены тяжелых цепей предпочтительно присутствуют в порядке, соответствующем встречающемуся в природе антителу (VH-CH1-CH2-CH3, что означает, что домен VH является смежным с доменом  
30 CH1, за которым следует домен CH2 и затем домен CH3). Домены легких цепей также предпочтительно присутствуют в порядке, соответствующем встречающемуся в природе антителу (VL-CL: что означает, что домен VL является смежным с доменом CL). Антитело связывается с антигеном посредством переменных доменов, содержащиеся в части Fab-фрагмента.

Антитело может взаимодействовать с молекулами и клетками иммунной системы через константные домены, в основном через часть Fc.

В некоторых вариантах реализации антитело согласно настоящему изобретению представляет собой IgG, предпочтительно полноразмерный IgG.  
5 Полноразмерные антитела класса IgG являются предпочтительными вследствие их, обычно, подходящего периода полужизни и того факта, что желательно применять антитела, как можно более близкие к полностью аутологичным (человеческого происхождения) молекулам из соображений иммуногенности. В некоторых вариантах реализации антитело согласно  
10 настоящему изобретению представляет собой полноразмерное антитело подкласса IgG1, подкласса IgG2, подкласса IgG3 или подкласса IgG4.

Полноразмерные антитела согласно настоящему изобретению охватывают антитела, в которых могут присутствовать мутации, которые обеспечивают желаемые характеристики или являются просто альтернативами таковым в  
15 исходной цепи. Такие мутации не должны представлять собой делеции существенных частей любого из участков (областей). Однако антитела, в которых один или несколько аминокислотных остатков вставлены, удалены, заменены или подвергнуты комбинации указанного без существенного изменения антигенсвязывающих характеристик полученного антитела,  
20 включены в термин «полноразмерное антитело». Например, антитело IgG может иметь вставки, замены, делеции или их комбинации размером 1-20 аминокислотных остатков в константной области

Антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой  
25 биспецифическое антитело или его функциональную часть, производное и/или аналог. В предпочтительном варианте реализации оно представляет собой биспецифическое антитело класса IgG с пониженной эффекторной функцией. В предпочтительном варианте реализации антитело согласно настоящему изобретению представляет собой биспецифическое полноразмерное антитело.  
30 Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой биспецифическое полноразмерное антитело класса IgG, предпочтительно содержащее мутацию в CH2/нижней части шарнирной области для снижения эффекторной функции. IgG1, который имеет мутацию в CH2/нижней части шарнирной области для снижения эффекторной функции, является

предпочтительным вследствие его длительного периода полужизни в кровотоке человека. Для предотвращения какой-либо иммуногенности у людей предпочтительно, чтобы биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению представляло собой антитело человека.

5 Термин «биспецифическое» (bs) означает, что одна часть антитела (как определено выше) связывается с одним эпитопом на антигене, тогда как вторая часть связывается с другим эпитопом либо на том же антигене, либо на другом антигене. Различные эпитопы, обычно, присутствуют на разных антигенах. Однако различные эпитопы также могут присутствовать на одном антигене.

10 Согласно настоящему изобретению, указанный первый и второй антигены фактически представляют собой два разных белка. Предпочтительное биспецифическое антитело представляет собой антитело, которое содержит части двух различных моноклональных антител и, следовательно, может связываться с двумя различными эпитопами, предпочтительно на двух

15 различных антигенах. В зависимости от уровня экспрессии, (суб)клеточной локализации и стехиометрии двух антигенов, распознаваемых биспецифическим антителом, связывание обоими Fab-фрагментами своего эпитопа может происходить или не происходить одновременно. Одно плечо биспецифического антитела, обычно, содержит переменный домен одного

20 антитела, и другое плечо содержит переменный домен другого антитела (то есть одно плечо биспецифического антитела образовано одной тяжелой цепью в паре с одной легкой цепью, тогда как другое плечо образовано другой тяжелой цепью в паре с легкой цепью). Переменные области тяжелой цепи биспецифического антитела согласно настоящему изобретению, обычно,

25 отличаются друг от друга, тогда как переменные области легкой цепи предпочтительно являются одинаковыми в биспецифических антителах согласно настоящему изобретению. Биспецифическое антитело, в котором различные переменные области тяжелой цепи связаны с одной и той же, или общей, переменной областью легкой цепи, также называют биспецифическим

30 антителом с общей переменной областью легкой цепи (cLcv). Предпочтительно, чтобы константная область легкой цепи также был одинаковым. Такие биспецифические антитела также называют имеющими общую легкую цепь (cLc). Кроме того, предложено биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, где оба плеча содержат общую легкую цепь.



Биспецифические антитела согласно настоящему описанию предпочтительно содержат общий переменный домен легкой цепи, предпочтительно общую легкую цепь. Термин «общая легкая цепь» согласно настоящему изобретению относится к легким цепям, которые могут быть  
5 идентичными или иметь некоторые различия в аминокислотной последовательности, при этом специфичность связывания полноразмерного антитела не изменяется. Например, в рамках определения общих легких цепей в контексте настоящего описания возможно получить или найти легкие цепи, которые не являются идентичными, но остаются функционально  
10 эквивалентными, например, путем введения и тестирования консервативных аминокислотных замен, замен аминокислот в областях, которые не участвуют в связывании или только частично вносят вклад в специфичность связывания в паре с тяжелой цепью, и тому подобное. Термины «общая легкая цепь», «общая LC» («common LC»), «cLC», «единственная легкая цепь» с добавлением или без  
15 добавления термина «подвергшаяся перегруппировке (перестройке)» используются в контексте настоящего описания взаимозаменяемо. Термины «общая переменная область легкой цепи», «общий VL», «общий LCv», «cLCv», «единственный VL» с добавлением или без добавления термина «подвергшейся перегруппировке» используются в контексте настоящего описания  
20 взаимозаменяемо. Предпочтительным аспектом настоящего изобретения является то, что биспецифическое антитело имеет общую легкую цепь (переменную область), которая может быть объединена с по меньшей мере двумя, и предпочтительно множеством тяжелых цепей (переменных областей) различной специфичности связывания с получением антитела с  
25 функциональными доменами связывания антигена WO2009/157771. Общая легкая цепь (переменная область) предпочтительно представляет собой легкую цепь человека (переменную область). Общая легкая цепь (переменная область) предпочтительно имеет последовательность зародышевой линии. Предпочтительно последовательность зародышевой  
30 линии представляет собой переменную область легкой цепи, которая часто присутствует в репертуаре человека и имеет хорошую термодинамическую стабильность, выход и растворимость. Предпочтительно легкая цепь зародышевой линии представляет собой O12. Общая легкая цепь предпочтительно представляет собой подвергшуюся перегруппировке на

уровне генов зародышевой линии легкую цепь типа капша IgVκ1-39\*01/IGJκ1\*01 человека (фигура 1A). Общая переменная область легкой цепи предпочтительно представляет собой переменную область подвергшейся перегруппировке на уровне генов зародышевой линии легкой цепи типа капша IgVκ1-39\*01/IGJκ1\*01 человека. Общая легкая цепь предпочтительно содержит переменную область легкой цепи, представленный на фигуре 1B или 1D, с 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или комбинацией указанного. Общая легкая цепь предпочтительно дополнительно содержит константную область легкой цепи, предпочтительно константную область легкой цепи типа капша. Нуклеиновая кислота, которая кодирует общую легкую цепь, может быть оптимизирована по кодонам для клеточной системы, используемой для экспрессии белка общей легкой цепи. Кодирующая нуклеиновая кислота может отличаться от последовательности нуклеиновой кислоты зародышевой линии.

В предпочтительном варианте реализации легкая цепь содержит область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность генного сегмента O12 / IgVκ1-39\*01, представленную на фигуре 1A, с 0-10, предпочтительно 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или комбинацией указанного. Фраза «легкая цепь O12» будет использоваться во всем описании в качестве сокращения для фразы «легкая цепь, содержащая переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность генного сегмента O12 / IgVκ1-39\*01, представленную на фигуре 1A, с 0-10, предпочтительно 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или комбинацией указанного». IgVκ1-39 является сокращением для гена капша 1-39 переменного домена иммуноглобулина. Указанный ген также известен как Immunoglobulin Kappa Variable 1-39; IGKV139; IGKV1-39; O12a или O12. Внешние идентификаторы для гена: HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. Предпочтительная аминокислотная последовательность IgVκ1-39 представлена на фигуре 1E. На ней представлена последовательность V-сегмента. V-сегмент может быть объединен с одним из пяти J-сегментов. На фигурах 1B и 1D приведены две предпочтительные последовательности для IgVκ1-39 в комбинации с J-сегментом. Объединенные последовательности обозначены как IGKV1-39/jk1 и IGKV1-39/jk5; альтернативными названиями

являются IgV<sub>κ</sub>1-39\*01/IGJ<sub>κ</sub>1\*01 или IgV<sub>κ</sub>1-39\*01/IGJ<sub>κ</sub>5\*01 (номенклатура в соответствии с базой данных IMGT (<http://www.imgt.org/>)).

Предпочтительно, чтобы O12 / IgV<sub>κ</sub>1-39\*01, содержащая переменную область легкой цепи, представляла собой последовательность зародышевой линии. Кроме того, предпочтительно, чтобы IGJ<sub>κ</sub>1\*01 или IGJ<sub>κ</sub>5\*01, содержащая переменную область легкой цепи, представляла собой последовательность зародышевой линии. В предпочтительном варианте реализации переменные области легкой цепи IGKV1-39/jk1 или IGKV1-39/jk5 представляют собой последовательности зародышевой линии.

В предпочтительном варианте реализации переменная область легкой цепи содержит последовательность зародышевой линии O12 / IgV<sub>κ</sub>1-39\*01. В предпочтительном варианте реализации переменная область легкой цепи содержит легкую цепь типа капса IgV<sub>κ</sub>1-39\*01/IGJ<sub>κ</sub>1\*01 или IgV<sub>κ</sub>1-39\*01/IGJ<sub>κ</sub>5\*01. В предпочтительном варианте реализации IgV<sub>κ</sub>1-39\*01/IGJ<sub>κ</sub>1\*01. Переменная область легкой цепи предпочтительно содержит легкую цепь типа капса IgV<sub>κ</sub>1-39\*01/IGJ<sub>κ</sub>1\*01 зародышевой линии или легкую цепь типа капса IgV<sub>κ</sub>1-39\*01/IGJ<sub>κ</sub>5\*01 зародышевой линии, предпочтительно IgV<sub>κ</sub>1-39\*01/IGJ<sub>κ</sub>1\*01 зародышевой линии.

Зрелые В-клетки, которые продуцируют антитело с легкой цепью O12, часто продуцируют легкую цепь, которая подверглась одной или более мутациям относительно последовательности зародышевой линии, то есть нормальной последовательности в нелимфоидных клетках организма. Процесс, ответственный за эти мутации, также часто называют соматической (гипер)мутацией. Полученную легкую цепь также называют легкой цепью с созревшей аффинностью. Такие легкие цепи, полученные из последовательности зародышевой линии O12, являются легкими цепями, полученными на основе O12. В настоящем документе фраза «легкие цепи O12» будет включать легкие цепи, полученные на основе O12. Мутации, которые появляются при соматической гипермутации, конечно, также могут быть искусственно введены в условиях лаборатории. В лаборатории также могут быть введены другие мутации, не влияющие на свойства легкой цепи в качественном отношении и необязательно влияющие в количественном отношении. Легкая цепь представляет собой по меньшей мере легкую цепь O12, если она содержит последовательность, представленную на фигуре 1А,

фигуре 1B; фигуре 1D или фигуре 1E, с 0-10, предпочтительно 0-5 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или комбинацией указанного. В предпочтительном варианте реализации легкая цепь O12 представляет собой легкую цепь, содержащую последовательность, представленную на фигуре 1A; 1B; 1D или 1E, с 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или комбинацией указанного. В предпочтительном варианте реализации легкая цепь O12 представляет собой легкую цепь, содержащую последовательность, представленную на фигуре 1A, фигуре 1B; фигуре 1D или фигуре 1E, с 0-5, предпочтительно 0-4, более предпочтительно 0-3 вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или комбинацией указанного. В предпочтительном варианте реализации легкая цепь O12 представляет собой легкую цепь, содержащую последовательность, представленную на фигуре 1A, фигуре 1B; фигуре 1D или фигуре 1E, с 0-2, более предпочтительно 0-1, наиболее предпочтительно 0 вставок, делеций, замен, добавлений аминокислот или комбинаций указанного. В предпочтительном варианте реализации легкая цепь O12 представляет собой легкую цепь, содержащую последовательность, представленную на фигуре 1A или фигуре 1B, с указанными вставками, делециями, заменами, добавлениями аминокислот или комбинацией указанного. В предпочтительном варианте реализации легкая цепь содержит последовательность, представленную на фигуре 1A. В предпочтительном варианте реализации переменная область легкой цепи содержит последовательность, представленную на фигуре 1B.

Общая легкая цепь (переменная область) может представлять собой легкую цепь типа лямбда, и поэтому это также предусмотрено в контексте настоящего изобретения, однако легкая цепь типа каппа является предпочтительной. Константная часть общей легкой цепи согласно настоящему изобретению может представлять собой переменную область легкой цепи типа каппа или лямбда. Предпочтительно она представляет собой переменную область легкой цепи типа каппа, где указанная общая легкая цепь предпочтительно представляет собой легкую цепь зародышевой линии, предпочтительно подвергшуюся перегруппировке на уровне генов зародышевой линии легкую цепь типа каппа человека, содержащую генный сегмент IgVKI-39, наиболее предпочтительно подвергшуюся перегруппировке

на уровне генов зародышевой линии легкую цепь типа капша IgVKI-39\*01/IGJK1\*01 человека (фигура 1). Термины «подвергшаяся перегруппировке на уровне генов зародышевой линии легкая цепь типа капша IgVк1-39\*01/IGJк1\*01 человека», «IGKV1-39/IGKJ1», «легкая цепь huVк1-39», или 5 кратко «huVк1-39», или просто «1-39» используются взаимозаменяемо во всем объеме настоящей заявки. Очевидно, что специалистам в данной области техники будет понятно, что «общая» также относится к функциональным эквивалентам легкой цепи, аминокислотная последовательность которых не является идентичной. Существует много вариантов указанной легкой цепи, в 10 которых присутствуют мутации (делеции, замены, добавления), которые не влияют на образование функциональных участков связывания.

IgVк1-39 является сокращением для гена варибельного домена иммуноглобулина капша 1-39. Указанный ген также известен как Immunoglobulin Карпа Variable 1-39; IGKV139; IGKV1-39; O12a или O12. 15 Внешние идентификаторы для гена: HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. Предпочтительная аминокислотная последовательность IgVк1-39 представлена на фигуре 1. На ней представлена последовательность V-сегмента. V-сегмент может быть объединен с одним из пяти J- сегментов. На фигуре 1 приведены две предпочтительные последовательности для IgVк1-39 в 20 комбинации с J-сегментом. Объединенные последовательности обозначены как IGKV1-39/jk1 и IGKV1-39/jk5; альтернативными названиями являются IgVк1-39\*01/IGJк1\*01 или IgVк1-39\*01/IGJк5\*01 (номенклатура в соответствии с базой данных IMGT (<http://www.imgt.org/>)).

Общая варибельная область легкой цепи предпочтительно связана с 25 константной областью легкой цепи типа капша. В предпочтительном варианте реализации легкая цепь включает легкую цепь типа капша IgVк1-39\*01/IGJк1\*01 или IgVк1-39\*01/IGJк5\*01. В предпочтительном варианте реализации IgVк1-39\*01/IGJк1\*01.

Клетка, которая продуцирует общую легкую цепь, может продуцировать, 30 например, подвергшуюся перегруппировке на уровне генов зародышевой линии легкую цепь типа капша IgVк1-39\*01/IGJк1\*01 человека и легкую цепь, содержащую варибельную область указанной легкой цепи, слитую с константной областью типа лямбда.

Биспецифические антитела или их варианты согласно настоящему описанию предпочтительно имеют одну комбинацию переменная область тяжелой цепи/переменная область легкой цепи (VH/VL), которая связывается с внеклеточной частью PD-1, и вторую комбинацию VH/VL, которая связывается с внеклеточной частью LAG-3. В предпочтительном варианте реализации VL в указанной первой комбинации VH/VL схожа с VL в указанной второй комбинации VH/VL. В более предпочтительном варианте реализации VL в первой и второй комбинациях VH/VL идентичны. В предпочтительном варианте реализации биспецифическое антитело представляет собой полноразмерное антитело, которое имеет одну комбинацию тяжелой/легкой (H/L) цепей, которая связывается с внеклеточной частью PD-1, и одну комбинацию H/L цепей, которая связывается с внеклеточной частью LAG-3. В предпочтительном варианте реализации легкая цепь в указанной первой комбинации H/L цепей схожа с легкой цепью в указанной второй комбинации H/L цепей. В более предпочтительном варианте реализации легкие цепи в первой и второй комбинациях H/L цепей идентичны.

Было опубликовано несколько способов, способствующих получению биспецифических антител или, наоборот, моноспецифических антител. В настоящем изобретении предпочтительно, чтобы клетка преимущественно продуцировала биспецифическое антитело по сравнению с продукцией соответствующих моноспецифических антител. Обычно, этого достигают путем модификации переменной области тяжелых цепей таким образом, что они преимущественно подвергаются гетеродимеризации (то есть димеризации с тяжелой цепью другой комбинации тяжелой/легкой цепей), а не гомодимеризации. В предпочтительном варианте реализации биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению содержит две различные тяжелые цепи иммуноглобулина с совместимыми доменами гетеродимеризации. Различные совместимые домены гетеродимеризации были описаны в данной области техники. Совместимые домены гетеродимеризации предпочтительно представляют собой совместимые домены гетеродимеризации СН3 тяжелой цепи иммуноглобулина. В случае использования доменов СН3 дикого типа коэкспрессия двух различных тяжелых цепей (А и В) и общей легкой цепи приводит к получению трех различных видов антител, АА, АВ и ВВ. АА и ВВ обозначают два моноспецифических бивалентных антитела, и АВ

обозначает биспецифическое антитело. Для увеличения процентного содержания желаемого биспецифического продукта (АВ) может быть применено конструирование СНЗ, или, иными словами, можно использовать тяжелые цепи с совместимыми доменами гетеродимеризации, как определено

5 ниже в настоящем документе. В данной области техники описаны различные способы, с помощью которых может быть достигнута гетеродимеризация тяжелых цепей. Одним из способов является получение биспецифических антител с применением стратегии «выступ-во-впадину» («knob-into-hole»). См. заявку на патент США 20030078385 (Arathoon et al.).

10 Термин «совместимые домены гетеродимеризации» в контексте настоящего описания относится к белковым доменам, которые сконструированы таким образом, что сконструированный домен А' будет предпочтительно образовывать гетеродимеры со сконструированным доменом В' и наоборот, гомодимеризация между А'-А' и В'-В' снижена.

15 В источниках US13/866747 (в настоящее время опубликован как US 9248181), US14/081848 (в настоящее время опубликован как US 9358286) и PCT/NL2013/050294 (опубликован как WO2013/157954); включенных в настоящее описание посредством ссылки, раскрыты способы и средства для получения биспецифических антител с использованием совместимых доменов гетеродимеризации. Эти средства и способы также могут быть эффективно

20 применены в настоящем изобретении. В частности, биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит мутации для получения по существу только биспецифических полноразмерных молекул IgG. Предпочтительные мутации представляют собой аминокислотные замены

25 L351K и T366K (нумерация EU) в первом домене СНЗ («КК-вариант» тяжелой цепи) и аминокислотные замены L351D и L368E во втором домене («DE-вариант» тяжелой цепи) или наоборот. Ранее в патентах авторов настоящего изобретения US 9248181 и US 9358286, а также в заявке PCT WO2013/157954 было продемонстрировано, что DE-вариант и КК-вариант преимущественно

30 образуют пары с получением гетеродимеров (так называемых биспецифических молекул «DEКК»). Гомодимеризация DE-вариантов тяжелых цепей (DEDE гомодимеров) практически не происходит вследствие отгалкивания заряженных остатков в области контакта СНЗ-СНЗ между идентичными тяжелыми цепями.

Биспецифические антитела могут быть получены путем (временной) трансфекция плазмиды, кодирующей легкую цепь и две различные тяжелые цепи, СНЗ которых сконструированы для обеспечения эффективной гетеродимеризации и получения биспецифических антител. Продукция этих цепей в единственной клетке способствуют преимущественному получению биспецифических антител по сравнению с получением моноспецифических антител. Предпочтительными мутациями для получения по существу только биспецифических полноразмерных молекул IgG1 являются аминокислотные замены в положениях 351 и 366, например, L351K и T366K (нумерация соответствует нумерации EU), в первом домене СНЗ («КК-вариант» тяжелой цепи) и аминокислотные замены в положениях 351 и 368, например, L351D и L368E, во втором домене СНЗ («DE-вариант» тяжелой цепи), или наоборот.

Область Fc опосредует эффекторные функции антитела, такие как комплементзависимая цитотоксичность (КЗКЦ), антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). В зависимости от применения терапевтического антитела или Fc-белка слияния может быть желательно уменьшить или увеличить эффекторную функцию. Сниженные эффекторные функции являются предпочтительными в настоящем изобретении. Сниженная эффекторная функция может быть желательна, когда иммунный ответ следует активировать, усилить или стимулировать, как в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения. Антитела со сниженными эффекторными функциями могут быть, помимо прочего, применены для нацеливания на молекулы клеточной поверхности иммунных клеток.

Было обнаружено, что для связывания IgG с FcγRs или C1q требуются остатки, расположенные в шарнирной области и домене СН2. Для связывания FcγRs и C1q важны две области домена СН2 (фигура 2D). Было показано, что замены в IgG1 человека остатков IgG2 в положениях 233-236 и остатков IgG4 в положениях 327, 330 и 331 значительно снижают АЗКЦ и КЗКЦ (Armour et al., 1999. Eur J Immunol. 29(8):2613-24; Shields et al., 2001. J Biol Chem. 276(9):6591-604). Кроме того, Idusogie et al. продемонстрировали, что замена аланина в различных положениях, включая K322, значительно снижала активацию компонента (Idusogie et al., 2000. J Immunol. 164(8):4178-84).



Вследствие снижения их эффекторных функций антитела IgG4 представляют собой подкласс IgG для блокирования рецепторов без истощения клеток. Молекулы IgG4 могут обмениваться полумолекулами в динамическом процессе, называемом обменом Fab-фрагментами. Это явление может происходить между терапевтическими антителами и эндогенными IgG4. Мутация S228P является примером мутации, которая обеспечивает снижение способности к обмену Fab-фрагментами. (Labrijn. et al., 2009. Nat Biotechnol. 27(8):767-71).

Антитела со сниженными эффекторными функциями предпочтительно представляют собой антитела IgG, содержащие модифицированный CH2/нижнюю шарнирную область, например, для уменьшения взаимодействия Fc с рецептором или уменьшения связывания C1q. В некоторых вариантах реализации антитело согласно настоящему изобретению представляет собой антитело IgG с такими мутациями в CH2 и/или нижней шарнирной области, что взаимодействие биспецифического антитела IgG с Fc-гамма-рецептором уменьшается. Антитело, содержащее мутантную область CH2, предпочтительно представляет собой антитело IgG1. Такие IgG1 с мутантными CH2 и/или нижней шарнирной областью предпочтительно содержат аминокислотные замены в положении 235 и/или 236 (нумерация соответствует нумерации EU), предпочтительно замену L235G и/или G236R (фигура 2E).

Вариант антитела или биспецифического антитела согласно настоящему описанию включает функциональную часть, производное и/или аналог антитела или биспецифического антитела. Указанный вариант сохраняет специфичность связывания (биспецифического) антитела. Функциональная часть, производное и/или аналог сохраняет специфичность связывания (биспецифического) антитела. Специфичность связывания определяется способностью связываться с внеклеточной частью PD-1 и LAG-3 согласно настоящему описанию.

Функциональная часть антитела или предпочтительно функциональная часть биспецифического антитела согласно настоящему описанию представляет собой часть, содержащую вариабельный домен, который связывается с внеклеточной частью PD-1, и вариабельный домен, который связывается с внеклеточной частью LAG-3. Подходящей частью является, например, F(ab')<sub>2</sub> фрагмент, полученный путем расщепления

биспецифического антитела пепсином. Другие части, содержащие указанные  
вариабельные домены, включены в настоящее изобретение.

Функциональное производное антитела или предпочтительно  
функциональное производное биспецифического антитела согласно  
5 настоящему описанию представляет собой белок, содержащий вариабельный  
домен, который связывается с внеклеточной частью PD-1, и вариабельный  
домен, который связывается с внеклеточной частью LAG-3, которые связаны с  
помощью линкера. Указанные вариабельные домены могут представлять собой  
вариабельные домены как таковые, или Fab-фрагменты, или подобные  
10 вариабельным доменам молекулы, такие как одноцепочечные Fv фрагменты,  
содержащие VH и VL, связанные посредством линкера. Другими примерами  
молекул, подобных вариабельным доменам, являются так называемые  
фрагменты однодоменного антитела. Фрагмент однодоменного антитела (sdAb)  
представляет собой фрагмент антитела с одним мономерной вариабельной  
15 областью антитела. Как и целое антитело, он способен избирательно  
связываться со специфическим антигеном. Имеющие молекулярную массу  
всего 12–15 кДа фрагменты однодоменных антител намного меньше в  
размерах, чем обычные антитела (150–160 кДа), которые состоят из двух  
тяжелых белковых цепей и двух легких цепей, и даже меньше, чем Fab-  
20 фрагменты (~50 кДа, одна легкая цепь и половина тяжелой цепи) и  
одноцепочечные вариабельные фрагменты (~25 кДа, две вариабельных  
области один из легкой и один из тяжелой цепи). Однодоменные антитела сами  
по себе не намного меньше, чем нормальные антитела (обычно, 90-100 кДа).  
Фрагменты однодоменного антитела в основном сконструированы из антител,  
25 состоящих только из тяжёлых цепей, обнаруженных у верблюдов; они  
называются фрагментами VHH (Nanobodies®). Некоторые рыбы также имеют  
антитела только с тяжелой цепью (IgNAR, «новый рецептор антигена  
иммуноглобулина»), из которых могут быть получены фрагменты  
однодоменного антитела, называемые фрагментами VNAR. Альтернативный  
30 подход заключается в разделении димерных вариабельных доменов обычного  
иммуноглобулина G (IgG) человека или мыши с получением мономеров. Хотя  
большинство исследований однодоменных антител в настоящее время основано  
на вариабельных доменах тяжелых цепей, было также показано, что нанотела,  
полученные из легких цепей, специфически связываются с эпитопами-

мишенями. Другими неограничивающими примерами молекул, подобных  
вариабельному домену, являются VHH, доменные антитела человека (dAbs) и  
унитела (Unibodies). Предпочтительными функциональными частями  
являются части, которые содержат вариабельные домены, содержащие  
5 вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи.  
Неограничивающими примерами таких вариабельных доменов являются F(ab)-  
фрагменты и одноцепочечные Fv-фрагменты. Биспецифическими форматами  
для присоединения вариабельных доменов (подобных им молекул) являются,  
например, сывороточный альбумин человека (ЧСА), связанный с двумя  
10 различными scFv; биспецифические мини-антитела, содержащие два  
различных scFv, объединенные посредством мотивов димеризации или  
самоассоциирующихся вторичных структур, таких как спиральные пучки или  
суперспирали, для обеспечения димеризации фрагментов scFv (Morrison (2007)  
Nat. Biotechnol 25:1233-34). Примеры подходящих линкеров HSA и способ  
15 объединения scFv с линкером описаны в WO2009/126920.

Антителу или его функциональная часть, производное и/или аналог, или  
предпочтительно биспецифическое антитело или его функциональная часть,  
производное и/или аналог согласно настоящему изобретению предпочтительно  
применяют у людей. С этой целью антителу или его функциональная часть,  
20 производное и/или аналог согласно настоящему изобретению предпочтительно  
представляет собой антитело человека или гуманизированное антитело.  
Толерантность человека к полипептиду определяется рядом различных  
аспектов. Иммуниет, будь то опосредуемый Т-клетками, опосредуемый В-  
клетками или другой иммуниет, является одной из переменных, которые  
25 включены в толерантность человека к полипептиду. Константная область  
биспецифического антитела согласно настоящему изобретению  
предпочтительно содержит константный участок тяжелой цепи человека,  
предпочтительно содержащий последовательность, представленную на фигуре  
2; и константный участок легкой цепи человека, предпочтительно содержащий  
30 последовательность, представленную на фигуре 1С. Константный участок  
может иметь одно или более, предпочтительно не более 10, предпочтительно не  
более 5 различий в аминокислотах с константным участком встречающегося в  
природе антитела человека. Предпочтительно, чтобы константная часть была  
полностью получена из встречающегося в природе антитела человека.

Различные антитела, получаемые в настоящем изобретении, получены от мышей с общей легкой цепью, иммунизированных соответствующей мишенью, как описано в WO2009/157771. Различные антитела, получаемые в настоящем изобретении, получены из библиотеки переменных доменов антитела человека. По существу эти переменные домены являются человеческими. Уникальные участки CDR могут быть получены от человека (из человеческих антител), являться синтетическими или полученными от другого организма. Переменный участок представляет собой по меньшей мере переменный участок человека, если он имеет, за исключением участков CDR, аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности переменного участка встречающегося в природе антитела человека. В таких вариантах реализации VH переменного домена антитела, который связывается с внеклеточной частью PD-1 или LAG-3, или легкая цепь в антителе согласно настоящему изобретению может иметь одно или более, предпочтительно не более 10, предпочтительно не более 5 различий в аминокислотах с переменным участком встречающегося в природе антитела человека, не считая возможных различий в аминокислотной последовательности участков CDR. Такие мутации также происходят в природе в контексте соматической гипермутации.

Антитела могут быть получены от различных видов животных, по меньшей мере в отношении переменного участка тяжелой цепи. Обычной практикой является гуманизация, например, переменных областей тяжелой цепи мыши. Это может быть достигнуто различными способами, среди которых трансплантация (пересадка) CDR (CDR-grafting) в переменную область тяжелой цепи человека 3D-структуры, которая соответствует 3D-структуре переменной области тяжелой цепи мыши; деиммунизация переменной области тяжелой цепи мыши, предпочтительно осуществляемая путем удаления известных или предполагаемых эпитопов Т- или В-клеток из переменной области тяжелой цепи мыши. Удаление, обычно, осуществляют путем замены (обычно, консервативной) аминокислоты в эпитопе одной или более аминокислотами так, что последовательность эпитопа модифицируется таким образом, что он больше не является эпитопом Т- или В-клеток.

Деиммунизированные переменные области тяжелой цепи мыши являются менее иммуногенными для человека, чем исходная переменная

область тяжелой цепи мыши. Предпочтительно переменная область или домен согласно настоящему изобретению дополнительно гуманизован, например, винирован. При использовании методик винирования внешние остатки, с которыми легко сталкивается иммунная система, избирательно  
5 заменяют остатками антитела человека с получением гибридной молекулы, которая имеет либо слабоиммуногенную, либо по существу неиммуногенную винированную поверхность. Животное, используемое в настоящем изобретении, предпочтительно представляет собой млекопитающее, более предпочтительно примата, наиболее предпочтительно человека.

10 Антитело или биспецифическое антитело, или его функциональная часть, производное и/или аналог согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит константную область антитела человека. В соответствии с различиями в константных доменах тяжелой цепи антитела объединяют в пять классов, или изотипов: IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. Эти классы, или изотипы,  
15 содержат по меньшей мере одну из указанных тяжелых цепей, которая названа соответствующей греческой буквой. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело согласно настоящему изобретению, в котором указанная константная область выбрана из группы, состоящей из константных областей IgG, то есть выбрана из группы, состоящей  
20 из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Предпочтительно указанная константная область представляет собой константную область IgG4 или IgG1 (фигура 2), более предпочтительно мутированную константную область IgG1. Некоторые изменения в константной области IgG1 происходят в природе и/или допускаются без изменения иммунологических свойств полученного антитела.  
25 Обычно, в константной области допускается примерно от 1 до 10 вставок, делеций, замен аминокислот или комбинация указанного. Константная область может быть мутирована, как указано в настоящем документе, для обеспечения эффективной гетеродимеризации, для снижения эффекторной функции или по другим причинам, включая период полужизни, стабильность  
30 и тому подобное.

Разработаны рациональные способы, направленные на минимизацию содержания не относящихся к человеку остатков при применении у человека. Доступны различные способы для эффективной прививки (graft) антигенсвязывающих свойств антитела другому антителу. Связывающие

свойства антител могут быть преимущественно обусловлены конкретной последовательностью участка CDR3, часто поддерживаемой последовательностью участками CDR1 и CDR2 в варибельном домене в сочетании с соответствующей структурой варибельного домена в целом. В  
5 настоящее время доступны различные способы для прививки CDR на подходящий варибельный домен другого антитела. Некоторые из этих способов рассмотрены в источнике J.C. Almagro1 and J. Fransson (2008) *Frontiers in Bioscience* 13, 1619-1633, который включен в настоящее описание посредством ссылки.

10 Варибельная область легкой цепи варибельного домена, содержащая варибельную последовательность тяжелой цепи, представленную на фигуре 3, предпочтительно представляет собой легкую цепь зародышевой линии или легкую цепь на основе O12, предпочтительно подвергшуюся перегруппировке на уровне генов зародышевой линии легкую цепь типа каппа IgVκ1-  
15 39\*01/IGJκ1\*01 человека, или ее фрагмент или функциональное производное (номенклатура в соответствии с базой данных IMGT (<http://www.imgt.org/>)). Используются термины «подвергшаяся перегруппировке на уровне генов зародышевой линии легкая цепь типа каппа IgVκ1-39\*01/IGJκ1\*01 человека, IGKV1-39/IGKJ1, легкая цепь huVκ1-39 или кратко huVκ1-39. Легкая цепь  
20 может иметь 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или комбинацию указанного. Указанные 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных замен предпочтительно представляют собой консервативные аминокислотные замены, вставки, делеции, замены или комбинацию указанного и предпочтительно не находятся в участке CDR3 цепи VL, предпочтительно не  
25 находятся в участке CDR1, CDR2 или CDR3 или участке FR4 цепи VL. Предпочтительная последовательность общей легкой цепи представлена на фигуре 1.

Доступны различные способы получения биспецифических антител. Один из способов включает экспрессию двух различных тяжелых цепей и двух  
30 различных легких цепей в клетке и сбор антитела, которое продуцируется указанной клеткой. Антитело, полученное таким способом, обычно, будет содержать ассортимент антител с различными комбинациями тяжелых и легких цепей, некоторые из которых являются желаемым биспецифическим антителом. Биспецифическое антитело может быть впоследствии очищено из

полученного ассортимента. Отношение количества биспецифического антитела к количеству других антител, которые продуцируются клеткой, может быть повышено различными способами. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения указанное отношение повышают путем экспрессии не  
5 двух различных легких цепей, а двух по существу идентичных легких цепей в клетке. Указанные две по существу идентичные легкие цепи могут представлять собой легкие цепи с по существу одинаковыми переменными областями легкой цепи и различными константными областями легкой цепи или, предпочтительно, двумя по существу идентичными константными  
10 областями легкой цепи. Эта концепция в данной области техники также называется способом «общей легкой цепи». Когда по существу идентичные легкие цепи объединяют с двумя различными тяжелыми цепями, что обеспечивает получение переменных доменов с различными сайтами связывания антигена и сопутствующими различными свойствами связывания,  
15 отношение количества биспецифического антитела к количеству другого антитела, которое продуцируется клеткой, значительно улучшается по сравнению с экспрессией двух по существу различных легких цепей. Уровень биспецифического антитела, которое продуцируется клеткой, может быть дополнительно повышен путем стимулирования преимущественного  
20 образования пар двух различных тяжелых цепей друг с другом относительно образования пар двух идентичных тяжелых цепей. В данной области техники описаны различные способы, с помощью которых может быть достигнута такая гетеродимеризация тяжелых цепей. Предпочтительный способ описан в предварительной заявке США 61/635935, за которой последовали обычная  
25 заявка США № 13/866747 и заявка PCT № PCT/NL2013/050294 (WO 2013/157954 A1), которые включены в настоящее описание посредством ссылки. Раскрыты способы и средства для получения биспецифических антител (из единственной клетки), тем самым предложены средства, которые способствуют преимущественному получению биспецифических антител относительно  
30 получения моноспецифических антител. Эти способы также могут быть эффективно применены в настоящем изобретении. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способ получения биспецифического антитела согласно настоящему изобретению (из единственной клетки), где указанное биспецифическое антитело содержит два домена СН3, которые способны

образовывать область контакта, включающий обеспечение в указанной клетке а) первой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей первый домен СНЗ, содержащий тяжелую цепь, б) второй молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей второй домен СНЗ, содержащий тяжелую цепь, где указанные молекулы нуклеиновой кислоты обеспечены средствами для предпочтительной конъюгации указанных первого и второго доменов СНЗ, содержащих тяжелые цепи, кроме того, указанный способ включает стадию культивирования указанной клетки-хозяина и обеспечения возможности экспрессии указанных двух молекул нуклеиновой кислоты и сбора указанного биспецифического антитела из культуры. Указанные первая и вторая молекулы нуклеиновой кислоты могут быть частью одной молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или средства доставки генов и могут быть интегрированы в один и тот же сайт генома клетки-хозяина. В качестве альтернативы, указанные первая и вторая молекулы нуклеиновой кислоты обеспечивают указанной клетке отдельно. Клетка-хозяин содержит по меньшей мере одну легкую цепь, и предпочтительно общую легкую цепь.

В предпочтительном варианте реализации предложен способ получения биспецифического антитела согласно настоящему изобретению из единственной клетки, где указанное биспецифическое антитело содержит два домена СНЗ, которые способны образовывать область контакта, включающий получение:

- клетки, содержащей а) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, содержащую сайт связывания антигена, который может связываться с внеклеточной частью PD-1 и который содержит первый домен СНЗ, и б) вторую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь, содержащую сайт связывания антигена, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3 и который содержит второй домен СНЗ, где указанные молекулы нуклеиновой кислоты обеспечены средствами для предпочтительной конъюгации указанных первого и второго доменов СНЗ,

указанный способ дополнительно включает стадию культивирования указанной клетки с возможностью экспрессии белков, кодируемых указанными двумя молекулами нуклеиновой кислоты, и сбор указанного биспецифического антитела IgG из культуры. В особенно предпочтительном варианте реализации указанная клетка также имеет третью молекулу нуклеиновой кислоты,



кодирующую общую легкую цепь. Указанные первая, вторая и третья молекулы нуклеиновой кислоты могут являться частью одной и той же молекулы нуклеиновой кислоты, вектора или средства доставки гена и могут быть интегрированы в один и тот же сайт генома клетки-хозяина. В качестве альтернативы, указанные первая, вторая и третья молекулы нуклеиновой кислоты обеспечивают указанной клетке отдельно. Предпочтительная общая легкая цепь представляет собой легкую цепь на основе O12, предпочтительно она представляет собой подвергшуюся перегруппировке на уровне генов зародышевой линии легкую цепь типа капша IgV<sub>κ</sub>1 39\*01/IgJ<sub>κ</sub>1\*01 человека, описанную выше. Средства для предпочтительной конъюгации указанного первого и указанного второго доменов СН3 предпочтительно представляют собой соответствующие мутации в домене СН3 кодирующих областей тяжелой цепи. Предпочтительными мутациями для получения по существу только биспецифических антител являются аминокислотные замены L351K и T366K (нумерация соответствует нумерации EU) в первом домене СН3 и аминокислотные замены L351D и L368E во втором домене СН3, или наоборот (фигура 2). Кроме того, предложен способ согласно настоящему изобретению для получения биспецифического антитела, в котором указанный первый домен СН3 содержит аминокислотные замены L351K и T366K (нумерация соответствует нумерации EU), и указанный второй домен СН3 содержит аминокислотные замены L351D и L368E, дополнительно включающий стадию культивирования указанной клетки с возможностью экспрессии белков, кодируемых указанными молекулами нуклеиновой кислоты, и сбора указанного биспецифического антитела из культуры. Также предложен способ согласно настоящему изобретению для получения биспецифического антитела, в котором указанный первый домен СН3 содержит аминокислотные замены L351D и L368E (нумерация соответствует нумерации EU), и указанный второй домен СН3 содержит аминокислотные замены L351K и T366K, дополнительно включающий стадию культивирования указанной клетки с возможностью экспрессии указанных молекул нуклеиновой кислоты и сбора указанного биспецифического антитела из культуры. Антитела, которые могут быть получены с помощью этих способов, также являются частью настоящего изобретения. Домены гетеродимеризации СН3 предпочтительно представляют собой домены гетеродимеризации IgG1. Константные области тяжелой цепи,

содержащие домены гетеродимеризации CH3, предпочтительно представляют собой константные области IgG1.

Вариабельный домен, который «блокирует» связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2, препятствует связыванию PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2. Такой  
5  
вариабельный домен может связываться с PD-1. Такой блокирующий  
вариабельный домен может связываться с эпитопом на PD-1 и конкурировать с  
PD-L1 и/или PD-L2 за связывание с эпитопом. Такой блокирующий  
вариабельный домен и PD-L1 и/или PD-L2 также могут связываться с  
различными эпитопами на PD-1. В таких случаях блокирующая активность  
10  
может быть обусловлена уменьшением связывания PD-L1 и/или PD-L2,  
вытеснением PD-L1 и/или PD-L2, когда он уже связан с PD-1, или может  
предотвратить связывание с PD-1 вследствие пространственных затруднений.  
Все эти и другие механизмы могут по меньшей мере частично предотвращать  
связывание указанного партнера с указанным первым мембранным белком.

Вариабельный домен, который «блокирует» связывание LAG-3 с ГКГС  
15  
класса II, препятствует связыванию LAG-3 с ГКГС класса II. Такой  
вариабельный домен связывается с LAG-3. Такой блокирующий вариабельный  
домен связывается с эпитопом на LAG-3 и конкурирует с ГКГС класса II за  
связывание с эпитопом. Такой блокирующий вариабельный домен и ГКГС  
20  
класса II также могут связываться с различными эпитопами на LAG-3. В таких  
случаях блокирующая активность может быть обусловлена уменьшением  
связывания PD-L1 и/или PD-L2, вытеснением ГКГС класса II, когда он уже  
связан с LAG-3, или предотвращением связывания с LAG-3 вследствие  
пространственных затруднений. Все эти и другие механизмы могут по меньшей  
25  
мере частично предотвращать связывание указанного партнера с указанным  
первым мембранным белком.

Эктодомен LAG3 состоит из четырех Ig-подобных доменов (D1–D4).  
Первые два N-концевых домена LAG-3 (D1 и D2) способны связываться с ГКГС  
30  
класса II. В настоящем изобретении было обнаружено, что антитело,  
содержащее вариабельный домен, который связывается с внеклеточной частью  
PD-1, как указано в настоящем документе, и вариабельный домен, который  
связывается с внеклеточной частью LAG-3, эффективны при стимуляции  
иммунного ответа и/или стимуляции формирования, стабильности и/или  
активности иммунологического синапса. Это справедливо, когда вариабельный

домен, который связывается с LAG-3, связывается с внеклеточным доменом 1, внеклеточным доменом 2, внеклеточным доменом 3 или внеклеточным доменом 4 LAG-3. Предпочтительно переменный домен, который связывается с LAG-3, связывается с внеклеточным доменом 1 или внеклеточным доменом 2.

5 Такие переменные домены являются более эффективными в контексте антитела, описанного в настоящем документе. В одном варианте реализации переменный домен, который связывается с LAG-3, связывается с внеклеточным доменом 2 LAG-3.

10       Переменный домен, который блокирует связывание специфически связывающейся пары (то есть PD-1/PD-L1; PD-1/PD-L2 или LAG-3/ГКГС класса II) согласно настоящему описанию, обычно, уменьшает связывание пары по сравнению со связыванием в отсутствие указанного переменного домена. Это предпочтительно определяют в анализе *in vitro*. Обычно, его выполняют путем инкубирования переменного домена с мембранным белком, с которым он  
15 может связываться, и последующего инкубирования полученной смеси с другим членом пары. Связывание пары затем сравнивают со связыванием пары в отсутствие указанного переменного домена. Переменный домен может полностью предотвращать связывание первого мембранного белка с его партнером по связыванию. Он также может частично предотвращать  
20 связывание связывающейся пары. Переменный домен, который блокирует связывание специфически связывающейся пары мембранных белков, предпочтительно снижает связывание пары по меньшей мере на 50%, предпочтительно по меньшей мере на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, предпочтительно по меньшей мере на 80%, и более предпочтительно по  
25 меньшей мере на 90% по сравнению со связыванием в отсутствие переменного домена. Блокирование связывания переменным доменом определено в настоящем документе как блокирование, полученное при применении двухвалентного моноклонального антитела, содержащего два из указанных одинаковых переменных доменов. Переменный домен,  
30 разумеется, также блокирует связывание, когда присутствует в антителе, содержащем указанный переменный домен и переменный домен, который связывается со вторым мембранным белком.

Специфические переменные домены, которые могут связываться с внеклеточной частью PD-1 и которые по меньшей мере частично блокируют

связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2, представляют собой переменные домены, которые содержат аминокислотную последовательность VH: MF6076; MF6226; MF6236; MF6256; MF6930; MF6932; MF6935; MF6936; MF6972; MF6974 или MF6982 на фигуре 3, предпочтительно MF6256; MF6930; MF6076, 5 MF6974 или MF6226, предпочтительно MF6930, MF6076 или MF6974. Конкретные переменные домены, которые могут связываться с внеклеточным доменом LAG-3 и которые блокируют связывание LAG-3 с ГКГС класса II, представляют собой переменные домены, которые содержат аминокислотную последовательность VH MF7100; MF7111; MF7116; MF7118; MF7134; MF7136; 10 MF7137; MF7142; MF7146; MF7165; MF7167; MF7185; MF7443; MF7444; MF7515; MF7518; MF7096; MF7097; MF7106; MF7120; MF7133; MF7139; MF7144 или MF7524 на фигуре 3, предпочтительно MF7518; MF7165; MF7116; MF7096; MF7133; MF7139; MF7524 или MF7137, предпочтительно MF7139; MF7524, MF7133, MF7518 или MF7096.

15

Настоящее изобретение также обеспечивает способ вовлечения и/или активации Т-клеток, включающий обеспечение системы, содержащей Т-клетку и клетку (вторую клетку), в отношении которой указанная Т-клетка должна быть задействована или активирована, и обеспечение указанной системы по 20 меньшей мере одним антителом, предпочтительно по меньшей мере одним биспецифическим антителом, которое содержит переменный домен, который может связываться с PD-1, и переменный домен, который может связываться с LAG-3, и инкубирование указанной системы в условиях, которые допускают вовлечение и/или активацию Т-клетки. В некоторых вариантах реализации 25 указанный способ представляет собой способ *in vitro*. Клетка, в отношении которой указанная Т-клетка должна быть задействована или активирована, предпочтительно представляет собой иммунную клетку, например, антигенпрезентирующую клетку, макрофаг, неопластическую клетку, инфицированную вирусом клетку или инфицированную внутриклеточным 30 паразитом клетку. Вовлечение и/или активация Т-клеток направляет Т-клетки на конкретную мишень. Активация Т-клетки представляет собой активацию Т-клеточного рецептора указанной Т-клетки. Вовлечение Т-клетки, обычно, представляет собой активацию Т-клетки. Вовлечение также может направить уже активированную Т-клетку к мишени, определенной антителом. Условия,

которые допускают вовлечение и/или активацию Т-клетки, обычно, представляют собой условия культивирования, однако также могут представлять собой инкубирование в организме животного, не являющегося человеком. Указанные условия таковы, что Т-клетка не подвергается  
5 вовлечению в отсутствие антитела. При анализе выборки Т-клеток некоторые из них могут быть уже задействованы или активированы при условии, что выборка содержит достаточное количество Т-клеток, которые не задействованы или не активированы.

Антитело согласно настоящему изобретению может объединять две  
10 клетки в непосредственной близости, что обеспечивает взаимодействие между клетками, опосредуемое белками, отличными от PD-1 и LAG-3, с которыми связывается антитело согласно настоящему изобретению. Одним из таких взаимодействий является взаимодействие Т-клеточного рецептора одной клетки и ГКГС другой клетки.

15 В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ предотвращения опосредуемому PD-1 и/или LAG-3 ингибированию в PD-1-положительной и/или LAG-3-положительной клетке, включающий приведение указанной клетки в контакт с антителом или его функциональной частью, производным и/или аналогом, которые содержат:

20       вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1, и

      вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3, тем самым ингибируя опосредуемую PD-1 и/или LAG-3 активность в указанной клетке.

25       LAG-3 или PD-1 положительная клетка экспрессирует мембранный белок на клеточной мембране в количествах, которые могут быть обнаружены, обычно, с помощью иммунофлуоресценции с моноклональным антителом, специфическим в отношении указанного мембранного белка. PD-1 положительная клетка представляет собой Т-клетку. LAG-3 клетка  
30 предпочтительно представляет собой Т-клетку, более предпочтительно так называемую истощенную Т-клетку. Истощение Т-клеток представляет собой состояние дисфункции Т-клеток, которое возникает при многих хронических инфекциях и раке. Оно характеризуется слабой эффекторной функцией, устойчивой экспрессией ингибирующих рецепторов и состоянием

транскрипции, отличным от такового у функциональных эффекторных Т-клеток или Т-клеток памяти. Истощение препятствует оптимальной борьбе с инфекциями и опухолями. Антитело согласно настоящему изобретению препятствует опосредуемому PD-1 и LAG-3 ингибированию путем связывания с соответствующими мембранными белками и предотвращения стимуляции белков соответствующими партнерами по связыванию указанного белка. Известными партнерами по связыванию для PD-1 являются PD-L1 и PD-L2. Известным партнером по связыванию LAG-3 является ГКГС класса II. Антитело блокирует взаимодействие PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2; и/или LAG-3 и ГКГС класса II, и вследствие этого по меньшей мере частично предотвращает ингибирующую активность PD-1 в PD-1 положительной клетке; и/или ингибирующую активность LAG-3 в LAG-3 положительной клетке. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения связывание указанного связывающего PD-1 переменного домена с PD-1 блокирует связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2, предпочтительно с PD-L1. В предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения связывание указанного переменного домена, связывающегося с LAG-3, с LAG-3 блокирует связывание LAG-3 с ГКГС класса II. Ингибирование опосредуемой PD-1 и/или LAG-3 активности в указанной клетке может быть определено различными способами. Обычно, хотя и не обязательно, активность определяют путем определения активации CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Это может быть выполнено с использованием здоровых CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клеток, однако влияние на истощение, обычно, лучше всего определяется на истощенных Т-клетках. Такими Т-клетками являются, например, LAG-3 положительные клетки. Активность предпочтительно определяют на ВИЧ-специфических Т-клетках, предпочтительно собранных от субъектов с прогрессирующим заболеванием. Подходящим параметром является пролиферация. Скорость пролиферации может быть определена в присутствии и в отсутствие антитела. Различия в скорости пролиферации являются мерой уровня ингибирования активности LAG-3 и/или PD-1 в этих клетках. Другими примерами подходящих Т-клеток являются инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), собранные от субъектов с немелкоклеточной карциномой легкого (НМКЛ). Подходящим параметром является продукция интерферона гамма. Продукция интерферона гамма может быть определена в присутствии и в отсутствие антитела.

Различия в продукции интерферона гамма являются мерой уровня ингибирования активности LAG-3 и/или PD-1 в этих клетках. Увеличение пролиферации и/или продукции интерферона гамма указывает на ингибирование активности LAG-3 и/или PD-1 в этих клетках. В  
5 предпочтительном варианте реализации увеличение представляет собой увеличение по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 40%, более предпочтительно по меньшей мере на 80% по сравнению с уровнем или скоростью, обнаруженными в отсутствие антитела.

10 Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ стимулирования формирования, стабильности или активности иммунологического синапса, включающий обеспечение системы, которая содержит по меньшей мере две клетки, способные связываться друг с другом через иммунологический синапс, и введение в указанную систему антитела или его функциональной части,  
15 производного и/или аналога, которые содержат

- переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1, и
- переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3,

20 тем самым стимулируя формирование, стабильность или активность иммунологического синапса между указанными по меньшей мере двумя клетками. Антитело способствует формированию, стабильности или активности иммунологического синапса путем связывания с PD-1 и/или LAG-3 клетке, которая содержит PD-1 или LAG-3 на клеточной мембране. Связывание  
25 ингибирует активность PD-1 и/или LAG-3. Это приводит к стимулированию формирования, стабильности или активности иммунологического синапса. Переменный домен, который может связываться с PD-1, предпочтительно блокирует связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2, предпочтительно с PD-L1. Переменный домен, который может связываться с LAG-3, предпочтительно  
30 блокирует связывание LAG-3 с ГКГС класса II. Указанные две клетки представляют собой клетки, которые способны образовывать иммунологический синапс. По меньшей мере одна из клеток является положительной в отношении T-клеточного рецептора. Другая клетка, обычно, хотя и не обязательно, является антигенпрезентирующей клеткой. Иммунологический

синапс образуется в результате плотного контакта Т-клетки с антигенпрезентирующей клеткой (АПК) и представляет собой сайт, где Т-клеточный рецептор (TCR) стимулируется своим антигенным лигандом, пептид–ГКГС комплексом, присутствующим в мембране АПК.

5 Иммунологический синапс в мембране Т-клетки, обычно, имеет три концентрических кольца мембранных рецепторов и расположенные под ними белки цитоскелета и сигнальные белки. Внутренний круг, или центральный супрамолекулярный кластер активации (cSMAC), содержит большую часть TCR и CD28 и окружен периферическим SMAC, который образован

10 интегринами. Наконец, самое внешнее кольцо, или дистальный SMAC (dSMAC), представляет собой сайт, где расположены белки с крупными эктодоменами, такие как CD43 и CD45, в отдалении от cSMAC.

Кроме того, Настоящее изобретение обеспечивает антитело или его вариант, содержащие переменный домен, который может связываться с

15 внеклеточной частью PD-1, и переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3.

В предпочтительном варианте реализации способа антитела (или его варианта) или применения согласно настоящему изобретению переменный домен, который связывается с PD-1, предпочтительно блокирует связывание

20 PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2. Переменный домен, который связывается с LAG-3, предпочтительно блокирует связывание LAG-3 с ГКГС класса II. Предпочтительно оба переменных домена блокируют связывание соответствующих партнеров по связыванию.

Переменный домен, который связывается с внеклеточной частью PD-1,

25 предпочтительно определяют как переменный домен, который, будучи в формате бивалентного моноспецифического антитела, которое содержит два из указанных переменных доменов, которые связываются с PD-1, подавляет опосредуемое PD-1/PD-L1 ингибирование опосредуемой Т-клеточным рецептором активации клетки Jurkat в диапазоне 20-150% по сравнению с

30 ингибированием, достигнутым при применении на клетке Jurkat антитела ниволумаба.

Ингибирование обусловленного PD-1 ингибирования опосредуемой TCR активации клетки Jurkat предпочтительно находится в диапазоне 50-150%, предпочтительно 80-150%, более предпочтительно 100-150% по сравнению с



ингибированием, достигнутым при применении на указанной клетке Jurkat антитела ниволумаба. В предпочтительном варианте реализации ингибирование составляет по меньшей мере 100% по сравнению с ингибированием, достигнутым при применении на указанной клетке Jurkat антитела ниволумаба. Ингибирование опосредуемой TCR активации клеток Jurkat при применении PD-1 предпочтительно оценивают путем определения эффекта иммунного ослабления, вызываемого связыванием PD-1/PD-L1 в клетках Jurkat, которые инкубировали в условиях, при которых в случае отсутствия антитела или его функциональной части, производного и/или аналога, они были бы активированы через T-клеточный рецептор.

Кроме того, в настоящем изобретении предложена композиция или набор компонентов, содержащие два или более антитела или их функциональные части, производные и/или аналоги, которые содержат переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1, и переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3;

где указанные первое и второе антитела или их функциональные части, производные и/или аналоги связываются с

- различными эпитопами на PD-1;
  - различными эпитопами на LAG-3; или
  - различными эпитопами на PD-1 и LAG-3.
- Варианты реализации, включающие способ, применение, композицию или набор компонентов, содержащий два или более антитела или их функциональные части, производные и/или аналоги, содержащие переменные домены, которые связываются с PD-1 и LAG-3, как описано в этом разделе, также называют вариантами реализации «Oligoclronics». Примерами таких вариантов реализации Oligoclronics являются варианты реализации с указанными первым и вторым антителом. «Oligoclronics» является зарегистрированным товарным знаком. Общие способы получения таких продуктов Oligoclronics® раскрыты в WO 2013/157953 и WO2004/009618 и включены в настоящее описание посредством ссылки.

В вариантах реализации Oligoclronics первое и второе антитело содержат переменные домены, которые связываются с PD-1 и LAG-3. Антитела, которые имеют переменные домены, которые связываются с одними и теми же белками PD-1 или LAG-3, могут связываться с одним и тем же отдельным

белком, однако это не обязательно так. Антитело согласно настоящему изобретению, которое связывается с PD-1 или LAG-3, связывается с эпитопом на указанном белке. Эпитоп является частью антигена, в данном случае мембранного белка, который распознается антителом. Первое и второе  
5 антитела, которые связываются с различными эпитопами на мембранном белке, могут связываться с одним и тем же отдельным белком на мембране. С этой целью различные эпитопы предпочтительно представляют собой неперекрывающиеся эпитопы. Другими словами, различные эпитопы достаточно разделены на мембранном белке, чтобы два антитела могли  
10 связываться одновременно с одним и тем же отдельным белком. Неожиданно было обнаружено, что Oligoclonics (комбинация первого и второго или более антител) могут быть более эффективными, чем равное количество каждого антитела отдельно.

Предпочтительно по меньшей мере одно из двух или более антител или  
15 функциональных частей, производных и/или аналогов содержит переменный домен, связывающийся с PD-1, который блокирует связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2, предпочтительно с PD-L1. В предпочтительном варианте реализации по меньшей мере два из двух или более антител или функциональных частей, производных и/или аналогов содержат переменный  
20 домен, связывающийся с PD-1, который блокирует связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2, предпочтительно с PD-L1.

Предпочтительно по меньшей мере одно из двух или более антител или функциональных частей, производных и/или аналогов содержит переменный домен, связывающийся с LAG-3, который блокирует связывание LAG-3 с ГКГС  
25 класса II. В предпочтительном варианте реализации по меньшей мере два из двух или более антител или функциональных частей, производных и/или аналогов содержат переменный домен, связывающийся с LAG-3, который блокирует связывание LAG-3 с ГКГС класса II.

Предпочтительно по меньшей мере одно из двух или более антител или  
30 функциональных частей, производных и/или аналогов содержит переменный домен, связывающийся с PD-1, который блокирует связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2, предпочтительно с PD-L1, и переменный домен, связывающийся с LAG-3, который блокирует связывание LAG-3 с ГКГС класса II. Предпочтительно по меньшей мере два из двух или более антител или

функциональных частей, производных и/или аналогов содержат переменный домен, связывающийся с PD-1, который блокирует связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2, предпочтительно с PD-L1, и переменный домен, связывающийся с LAG-3, который блокирует связывание LAG-3 с ГЖС класса II.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложены способы и применение согласно настоящему описанию, где применяют два или более антитела или их функциональные части, производные и/или аналоги, причем 10 указанные два или более антитела или их функциональные части, производные и/или аналоги содержат переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1, и переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3;

первое и второе из указанных антител или их функциональных частей, 15 производных и/или аналогов связываются с

- различными эпитопами на PD-1;
- различными эпитопами на LAG-3; или
- различными эпитопами на PD-1 и LAG-3. Приоритет в блокировании связывания PD-L1 и/или PD-L1 переменными доменами, которые 20 связываются с PD-1; и блокирования связывания LAG-3 с ГЖС класса II переменными доменами, которые связываются с LAG-3, является одинаковым, как описано в вариантах реализации Oligoclonics.

Антителу или его часть, производное или аналог предпочтительно содержит два описанных переменных домена. Такое антитело 25 предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело или его функциональную часть, производное или аналог. Два или более антитела или их функциональные части, производные и/или аналоги могут быть объединены. Различные способы известны в данной области техники. Подходящим способом является конъюгирование. Помимо этого, технология 30 получения мультиспецифических антител получила развитие и теперь включает биспецифические антитела, которые имеют такую же общую структуру, как и обычное моноспецифическое антитело, однако в которых каждый из двух фрагментов антитела связывает мишень, отличную от мишени второго фрагмента. Биспецифическое антитело или его функциональная часть,

производное и/или аналог предпочтительно имеет две тяжелых цепи с совместимыми доменами гетеродимеризации. Легкая цепь предпочтительно представляет собой общую легкую цепь. Антитело предпочтительно представляет собой полноразмерное биспецифическое антитело, которое  
5 состоит из двух тяжелых цепей с совместимыми доменами гетеродимеризации. Легкая цепь предпочтительно представляет собой общую легкую цепь.

В контексте настоящего описания термин «конъюгат» относится к двум или более молекулам, которые были ковалентно связаны необязательно посредством связывающего участка (области). Например, в некоторых  
10 вариантах реализации конъюгат представляет собой первый белковый или небелковый фрагмент, соединенный со вторым белковым или небелковым фрагментом посредством связывающего участка. Например, в некоторых вариантах реализации связывающей молекулы согласно настоящему изобретению она содержит два или более антитела или состоит из двух или  
15 более антител, которые были ковалентно соединены. Конъюгат не ограничен первым и вторым фрагментами, в некоторых вариантах реализации он также может содержать третий, четвертый или более фрагментов, соединенных дополнительными связывающими участками. Как описано в других частях настоящей заявки, примеры белковых фрагментов включают, но не  
20 ограничиваются перечисленными: полипептид, пептидомиметик или антитело (или часть антитела, производное или аналог, описанные в других разделах настоящей заявки). Примеры небелковых фрагментов включают аптамеры, но не ограничиваются ими. Множество типов линкеров могут быть применены, и линкер будет выбран в соответствии с типами молекул в конъюгате и  
25 желаемыми свойствами линкера (длина, гибкость, устойчивость к протеазной активности и другие схожие характеристики). Такие линкеры могут содержать нуклеотиды, полипептиды или подходящие синтетические материалы. Например, линкер может представлять собой гибкий пептидный линкер. В некоторых вариантах реализации линкер может представлять собой  
30 расщепляемый линкер, обеспечивающий возможность отделения частей конъюгата друг от друга. В других вариантах реализации пептидный линкер представляет собой спиральный линкер. Различные примеры и наборы для конъюгации белков и других молекул хорошо известны в данной области техники. В контексте настоящего описания термин «белок слияния» относится

к белку, который содержит два или более полипептида или белка, которые были объединены на уровне ДНК путем рекомбинации и которые экспрессируются совместно в виде одного полипептида. Белок слияния может содержать пептидный линкерный участок, также кодируемый ДНК и экспрессирующийся совместно с белком слияния. Пептидный линкер, который является частью белка слияния, может быть выполнен с возможностью обеспечения конкретных характеристик, таких как гибкость, гидрофильность, устойчивость к протеазам, расщепляемость и так далее. Все эти свойства могут быть выполнены внутри последовательности ДНК, и способы конструирования линкеров хорошо известны в данной области техники. Например, антители могут быть объединены с применением способов, хорошо известных в данной области техники, и способов согласно настоящему описанию с получением биспецифического или мультиспецифического антителя. Кроме того, биспецифические антители могут быть сконструированы различными способами, известными в данной области техники, например, посредством такой технологии, как Biclomics® (см., например, WO2013/157954). Биспецифическое моноклональное антители (BsMAb, BsAb), обычно, содержит домены связывания двух различных моноклональные антител и, следовательно, связывается с двумя различными эпитопами. Молекулы Biclomics®, а также другие полноразмерные биспецифические антители IgG, имеют две различных специфичности связывания антигена, кодируемых двумя различными переменными областями полноразмерной молекулы IgG Fab scFv. Biclomics® могут быть получены путем совместной трансфекции отдельных клеток генетическими конструкциями, кодирующими два различных антители с общей легкой цепью (сLC), что подробно описано в другом разделе настоящего описания. Конструирование СНЗ обеспечивает эффективную гетеродимеризацию и образование по существу чистых биспецифических антител.

Антители согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой биспецифическое антители. Антитела, обычно, связываются со своей мишенью через так называемый сайт связывания антигена. Немодифицированный сайт связывания антигена, обычно, образуется переменным доменом антителя и находится в нем. Переменный домен

содержит сайт связывания антигена. Варибельный домен, который может связываться с антигеном, представляет собой варибельный домен, содержащий сайт связывания антигена, который может связываться с антигеном.

5           Варибельный домен антитела, обычно, содержит варибельную область тяжелой цепи (VH) и варибельную область легкой цепи (VL). Сайт связывания антигена может присутствовать в комбинированном варибельном домене VH/VL, или только в области VH, или только в области VL. Если сайт связывания антигена присутствует в одном из двух областей варибельного  
10 домена, другая варибельная область может вносить вклад в пространственную конформацию и/или стабильность связывающей варибельной области, но не вносит значительного вклада в связывание самого антигена.

В контексте настоящего описания связывание антигена относится к  
15 типичной способности антитела связываться со своим антигеном. Связывание антитела с антигеном может быть оценено различными способами. Один из способов заключается в инкубировании антитела с антигеном (предпочтительно клетками, экспрессирующими данный антиген), удалении несвязанного антитела (предпочтительно с помощью стадии промывки) и  
20 обнаружении связанного антитела посредством меченого антитела, которое связывается со связанным антителом.

Связывание антигена антителом, обычно, опосредовано участками, определяющими комплементарность (CDR) антитела, и специфической  
25 трехмерной структурой как антигена, так и варибельного домена, позволяющей этим двум структурам связываться друг с другом с точностью (взаимодействие по типу «ключа и замка»), в отличие от случайного, неспецифического слипания белков. Поскольку антителу, обычно, распознает часть антигена, называемую эпитопом антигена, и поскольку такой эпитоп может присутствовать также и в других соединениях, антитела согласно  
30 настоящему изобретению могут также распознавать другие белки, если эти другие соединения содержат такой же эпитоп. Следовательно, термин «связывание» не исключает связывания антитела с другим белком или белком (белками), который содержит тот же эпитоп. Указанный другой белок (белки) предпочтительно не является белком человека.

Антитело, обычно, не связывается с белками, отличными от указанного белка-мишени на мембране клеток, после рождения, предпочтительно у взрослого человека.

5           Вариабельный домен в антителе или его функциональной части, производном и/или аналоге согласно настоящему изобретению, который может связываться с внеклеточной частью PD-1, связывается с PD-1 и, при прочих равных условиях, по меньшей мере в 100 раз слабее с внеклеточной частью другого члена семейства CD28 того же вида. Вариабельный домен антитела  
10 или его функциональной части, производного и/или аналога, который связывается PD-1, связывается с PD-1 и, при прочих равных условиях, по меньшей мере в 100 раз слабее с CD28, CTLA4, ICOS, BTLA, НКp30 и TMIGD2 того же вида. Учитывая, что PD-1 представляет собой белок клеточной поверхности, связывание, обычно, оценивают на клетках, которые  
15 экспрессируют член семейства на клеточной поверхности.

          Вариабельный домен в антителе или его функциональной части, производном и/или аналоге согласно настоящему изобретению, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3, связывается с LAG-3 и, при прочих равных условиях, по меньшей мере в 100 раз слабее с внеклеточной частью  
20 CD4 того же вида. Учитывая, что LAG-3 представляет собой белок клеточной поверхности, связывание, обычно, оценивают на клетках, которые экспрессируют член семейства на клеточной поверхности.

          Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения субъекта, имеющего рак, включающий введение антитела или функциональной части, производного и/или аналога согласно настоящему изобретению или  
25 биспецифического антитела согласно настоящему изобретению нуждающемуся в этом субъекту. Указанный субъект предпочтительно представляет собой субъекта, имеющего рак. В некоторых вариантах реализации указанный рак представляет собой рак, который содержит раковые клетки, которые  
30 экспрессируют мембранный белок. В предпочтительном варианте реализации указанный рак представляет собой рак, который содержит раковые клетки, которые экспрессируют PD-L1 и/или PD-L2. Рак предпочтительно представляет собой аденокарциному. Предпочтительными раковыми заболеваниями являются колоректальный рак; рак поджелудочной железы; рак легкого; рак

молочной железы; рак печени; рак предстательной железы; рак яичников; рак шейки матки; рак эндометрия; рак головы и шеи; меланома; рак яичка; рак уротелия; рак почки; рак желудка или карциноидная опухоль. В предпочтительном варианте реализации указанный рак представляет собой колоректальный рак; рак поджелудочной железы; рак легкого; рак молочной железы; рак печени; рак предстательной железы; рак яичников; рак шейки матки; рак эндометрия; рак головы и шеи или меланому. В особенно предпочтительном варианте реализации указанный рак представляет собой колоректальный рак; рак поджелудочной железы; рак легкого; рак молочной железы или рак печени. В особенно предпочтительном варианте реализации указанный рак представляет собой желудочно-кишечный рак. В предпочтительном варианте реализации указанный рак представляет собой колоректальный рак. В данном варианте реализации антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог предпочтительно представляет собой антитело с переменным доменом, который может связываться с PD-1, и переменным доменом, который может связываться с LAG-3. Переменный домен, связывающийся с PD-1, предпочтительно блокирует связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2, предпочтительно с PD-L1. Переменный домен, связывающийся с LAG-3, предпочтительно блокирует связывание LAG-3 с ГКГС класса II. Предпочтительно способ включает два или более указанных антитела или их функциональных частей, как описано для варианта реализации Oligoclomics.

Кроме того, предложен способ стимулирования иммунного ответа у субъекта против аберрантной клетки в организме указанного субъекта, причем указанный способ включает обеспечение указанного субъекта антителом или его функциональной частью, производным и/или аналогом согласно настоящему изобретению. Аберрантная клетка предпочтительно представляет собой раковую клетку, инфицированную вирусом клетку, паразита или инфицированную паразитом клетку. В предпочтительном варианте реализации клетка представляет собой раковую клетку или неопластическую клетку. В данном варианте реализации антитело или его функциональная часть, производное и/или аналог предпочтительно представляет собой антитело с переменным доменом, который может связываться с PD-1, и переменным доменом, который может связываться с LAG-3. В данном варианте реализации



вариабельный домен, связывающийся с PD-1, предпочтительно блокирует связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2, предпочтительно с PD-L1. Вариабельный домен, связывающийся с LAG-3, предпочтительно блокирует связывание LAG-3 с ГКГС класса II. Предпочтительно способ включает два или  
5 более указанных антитела или их функциональных частей, как описано для варианта реализации Oligoclonics.

Новообразование представляет собой аномальный рост ткани, и когда помимо этого оно образует массу, его также называют опухолью. Новообразование в настоящем изобретении, обычно, образует массу.  
10 Неопластическая клетка представляет собой клетку новообразования, которое сформировало массу. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) классифицирует новообразования на четыре основные группы: доброкачественные новообразования, новообразования *in situ*, злокачественные новообразования и новообразования с неопределенным или неизвестным  
15 поведением. Злокачественные новообразования также известны как раковые заболевания.

Стимулирование иммунного ответа охватывает индукцию иммунного ответа и усиление уже существующего иммунного ответа. Иммунный ответ у  
20 субъекта может быть оценен путем определения, когда это применимо, опухолевой нагрузки субъекта; вирусной нагрузки субъекта; паразитарной нагрузки субъекта.

Инфицированная вирусом клетка предпочтительно представляет собой клетку, инфицированную вирусом иммунодефицита, вирусом герпеса, предпочтительно вирусом простого герпеса, вирусом ветряной оспы,  
25 цитомегаловирусом или вирусом Эпштейна-Барр, вирусом папилломы, вирусом гепатита, предпочтительно вирусом гепатита А, В или С, вирусом кори или аденовирусом. Вирус предпочтительно представляет собой вирус, о котором известно, что он может сохраняться у субъекта. Персистентные инфекции  
30 характеризуются тем, что вирус не устраняется, а остается в определенных клетках инфицированных субъектов. Персистентные инфекции могут включать стадии как скрытой, так и продуктивной инфекции без быстрого уничтожения или даже чрезмерного повреждения клеток-хозяев. Постоянное

взаимодействие вирус-хозяин может представлять собой скрытую, хроническую и/или медленную инфекцию.

Инфицированная паразитом клетка представляет собой клетку, инфицированную внутриклеточным паразитом. Такие паразиты являются паразитическими микроорганизмами, которые способны к росту и размножению внутри клеток хозяина. Некоторые внутриклеточные паразиты также могут жить вне клетки. Такими паразитами являются так называемые факультативные внутриклеточные паразиты. Неограничивающими примерами являются *Listeria monocytogenes*, *Legionella*, некоторые виды микобактерий и *Cryptococcus neoformans*. Предпочтительными внутриклеточными паразитами являются паразиты, которые не могут расти вне клеток-хозяев, предпочтительными примерами являются *Chlamydia* и близкородственные виды, некоторые виды микобактерий, такие как *Mycobacterium leprae*, некоторые простейшие, включая: *Apicomplexans* (*Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii* и *Cryptosporidium parvum* и трипаносоматиды.

Настоящее изобретение также обеспечивает а молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует вариабельную область тяжелой цепи антитела согласно настоящему изобретению. Молекула нуклеиновой кислоты (обычно, *in vitro*, выделенная или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты) предпочтительно кодирует любую из вариабельных областей тяжелой цепи, представленных на фигуре 3, или вариабельную область тяжелой цепи, представленный на фигуре 3, содержащий 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или комбинацию указанного. В предпочтительном варианте реализации молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, представленную на фигуре 3. В молекуле нуклеиновой кислоты предпочтительно используются кодоны, которые оптимизированы для экспрессии в клетке, продуцирующей антитело, подлежащей применению. Предпочтительно нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи, представленную на фигуре 3, или вариабельную область тяжелой цепи, представленную на фигуре 3, содержащую 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или комбинацию указанного, оптимизирована по кодонам для экспрессии в клетке человека, предпочтительно Per.C6TM; или китайского хомяка, предпочтительно СНО.

Кроме того, в настоящем изобретении предложена молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует указанную переменную область тяжелой цепи совместно с константной областью тяжелой цепи, представленной на фигуре 2.

Молекула нуклеиновой кислоты, применяемая в настоящем изобретении, обычно, но не исключительно, представляет собой рибонуклеиновую кислоту (РНК) или дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК). Альтернативные нуклеиновые кислоты доступны специалисту в данной области техники. Молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению содержится, например, в клетке. Когда указанная молекула нуклеиновой кислоты экспрессируется в указанной клетке, указанная клетка может продуцировать антитело согласно настоящему изобретению. Таким образом, в одном из вариантов реализации настоящего изобретения предложена клетка, содержащая антитело согласно настоящему изобретению и/или молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. Антитело образуется, когда указанная клетка продуцирует тяжелую цепь и легкую цепь. Предложена клетка, которая может продуцировать антитело согласно настоящему изобретению. Указанная клетка предпочтительно содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи антитела, которая, в сочетании с общей легкой цепью может связываться с указанным первым мембранным белком. Указанная клетка предпочтительно дополнительно содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует тяжелую цепь антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи антитела, которая, в сочетании с общей легкой цепью может связываться с указанным вторым мембранным белком. Указанная клетка предпочтительно дополнительно содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует общую легкую цепь. Указанная клетка предпочтительно представляет собой клетку животного, более предпочтительно клетку млекопитающего, более предпочтительно клетку примата, наиболее предпочтительно клетку человека. Для целей настоящего изобретения подходящей клеткой является любая клетка, способная содержать и предпочтительно продуцировать антитело согласно настоящему изобретению и/или нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению.

Кроме того, в настоящем изобретении предложена клетка, содержащая антитело согласно настоящему изобретению. Также предложена клетка, которая содержит одну или более молекул нуклеиновой кислоты, которые по отдельности или совместно кодируют антитело согласно настоящему изобретению. Одна или более молекул нуклеиновой кислоты являются экспрессируемыми молекулами нуклеиновой кислоты, что означает, что они содержат необходимые сигналы для транскрипции РНК и трансляции кодирующих белок доменов. Предпочтительно указанная клетка (обычно, *in vitro*, выделенная или рекомбинантная клетка) продуцирует указанное антитело. В предпочтительном варианте реализации указанная клетка представляет собой клетку гибридомы, клетку яичника китайского хомяка (CHO), клетку NS0 или клетку PER-C6TM. В особенно предпочтительном варианте реализации указанная клетка представляет собой клетку CHO. Кроме того, предложена культура клеток, которая содержит клетку согласно настоящему изобретению. Различные учреждения и компании разработали линии клеток для крупномасштабного получения антител, например, для клинического применения. Неограничивающими примерами таких линий являются клетки CHO, клетки NS0 или клетки PER.C6TM. Эти клетки также применяют для других целей, таких как получение белков. Линии клеток, разработанные для получения белков и антител в промышленном масштабе, в настоящем документе дополнительно также называют промышленными линиями клеток. Таким образом, в предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения предложено применение линий клеток, разработанных для получения антител в промышленном масштабе, для получения антител согласно настоящему изобретению. Кроме того, в настоящем изобретении предложена клетка для получения антитела, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует VH, VL и/или тяжелую цепь, представленную на фигурах 3, 1 и 2. Предпочтительно указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, представленную на фигурах 1 и 2.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способ получения антитела, включающий культивирование клетки согласно настоящему изобретению и сбор указанного антитела из указанной культуры. Предпочтительно указанную клетку культивируют в бессывороточной среде.

Предпочтительно указанная клетка адаптирована для суспензионного роста. Кроме того, предложено антитело, получаемое при применении способа получения антитела согласно настоящему изобретению. Антитело предпочтительно очищают из среды культивирования. Предпочтительно  
5 указанное антитело подвергают аффинной очистке.

Клетка согласно настоящему изобретению представляет собой, например, линию клеток гибридомы, клетку CHO, клетку 293F, клетку NS0 или любой другой тип клеток, известный в данной области техники, который подходит для получения антител в клинических целях, в частности, для  
10 получения антител для введения людям. В особенно предпочтительном варианте реализации указанная клетка представляет собой клетку человека, предпочтительно клетку, которая трансформирована областью E1 аденовируса или ее функциональным эквивалентом. Предпочтительным примером такой линии клеток является линия клеток PER.C6TM или ее эквивалент. В особенно  
15 предпочтительном варианте реализации указанная клетка представляет собой клетку CHO или ее вариант, предпочтительно вариант, который использует векторную систему глутаминсинтетазы (GS) для экспрессии антитела.

Кроме того, в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая одно или более антител или их вариантов согласно  
20 настоящему изобретению. Фармацевтическая композиция предпочтительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель. Антитело или его вариант согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать метку, предпочтительно метку для визуализации *in vivo*. Такая метка, обычно, не является необходимой для терапевтического  
25 применения. Например, для установления диагноза метка может быть полезна. Например, при визуализации клеток-мишеней в организме. Подходящими являются различные метки, и многие из них хорошо известны в данной области техники. В предпочтительном варианте реализации метка представляет собой радиоактивную метку для обнаружения. В другом  
30 предпочтительном варианте реализации метка представляет собой инфракрасную метку. Предпочтительно инфракрасная метка подходит для визуализации *in vivo*. Различные инфракрасные метки доступны специалисту в данной области техники. Предпочтительными инфракрасными метками являются, например, IRDye 800; IRDye 680RD; IRDye 680LT; IRDye 750; IRDye

700DX; IRDye 800RS IRDye 650; IRDye 700 фосфорамидит (амидофосфит); IRDye 800 фосфорамидит (LI-COR USA; 4647 Superior Street; Lincoln, Небраска).

5 Количество антитела согласно настоящему изобретению, подлежащее введению пациенту, обычно, находится в пределах терапевтического окна, что означает, что применяют достаточное количество для получения терапевтического эффекта, в то время как это количество не превышает пороговое значение, приводящее к неприемлемой степени побочных эффектов. Чем меньше количество антитела, необходимое для получения желаемого  
10 терапевтического эффекта, тем больше, обычно, будет терапевтическое окно. Следовательно, предпочтительным является антитело согласно настоящему изобретению, оказывающее достаточные терапевтические эффекты в низкой дозе. Доза может находиться в диапазоне схемы введения ниволумаба. Доза также может быть ниже.

15 Антитело или его вариант и, в частности, биспецифическое антитело или его вариант согласно настоящему изобретению могут иметь меньше побочных эффектов, чем комбинация бивалентных моноспецифических антител с переменными доменами. Комбинации антител, которые блокируют ингибирующие и/или костимулирующие молекулы, полезны для пациентов,  
20 которые не отвечают на лечение существующими методами иммунотерапии. Однако, было показано, что двойная блокада иммуномодулирующих рецепторов (iMOD) увеличивает иммунозависимую токсичность. Антитело или его вариант, и, в частности, биспецифическое антитело или его вариант согласно настоящему изобретению являются подходящими для устранения  
25 двойной блокады iMOD, поскольку они могут проявлять функциональную активность, которая не может быть воспроизведена комбинациями моноклональных антител, и могут быть более избирательно нацелены на конкретную популяцию клеток, что снижает обязательства по обеспечению безопасности пациентов у пациентов.

30 С учетом вышеизложенного биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению или его функциональная часть и/или аналог предпочтительны для терапевтического применения.

Антитела получали в виде биспецифических антител путем клонирования их в комплементарные векторы экспрессии, которые содержат

мутации в области СНЗ, которая запускает гетеродимеризацию тяжелых цепей. Многие биспецифические антитела получали в малом масштабе и исследовали в отношении связывания и функциональности на линиях раковых клеток. Антитело согласно настоящему изобретению, в частности, биспецифическое  
5 антитело согласно настоящему изобретению, может сочетать низкие профили токсичности с высокой эффективностью. Антитело согласно настоящему изобретению может быть пригодно для применения в различных типах и линиях таргетированной иммунной терапии. Антитело согласно настоящему изобретению может иметь увеличенное терапевтическое окно по сравнению с  
10 антителом, которое связывается с тем же антигеном (антигенами) посредством обоих фрагментов.

Кроме того, предложено применение биспецифического антитела согласно настоящему изобретению или его функциональной части, производного и/или аналога для получения лекарственного средства для  
15 лечения или предотвращения аберрантных клеток, опухоли и/или образования метастазов. Опухоль, из которой происходят метастазы, предпочтительно представляет собой опухоль, положительную по PD-L1 и/или PD-L2.

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть получены с содержанием  $> 50$  мг/л после временной трансфекции в суспензионной  
20 культуре клеток 293F. Биспецифические антитела могут быть очищены до более чем 98% чистоты с выходом  $> 70\%$ . Аналитическое определение характеристик показало, что профили биспецифического антитела IgG1 сравнимы с таковыми для бивалентного моноспецифического IgG1.

В целях ясности и краткости описания признаки в настоящем документе  
25 описаны как часть тех же или отдельных вариантов реализации, однако следует понимать, что объем настоящего изобретения может включать варианты реализации, включающие комбинации всех или некоторых из описанных признаков.

Также предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, причем  
30 указанный способ включает введение белка согласно настоящему изобретению или биспецифического антитела согласно настоящему изобретению нуждающемуся в этом субъекту.

Кроме того, Настоящее изобретение обеспечивает белок согласно настоящему изобретению или биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению для применения для лечения субъекта, имеющего рак.

Антитело или его вариант согласно настоящему изобретению  
5 предпочтительно содержит переменный домен, который может связываться с  
внеклеточной частью PD-1 и содержит переменную область тяжелой цепи с  
участком CDR3, содержащим аминокислотную последовательность CDR3  
переменной области тяжелой цепи одной из VH, представленных для  
MF6076; MF6226; MF6236; MF6256; MF6930; MF6932; MF6935; MF6936;  
10 MF6972; MF6974 или MF6982 на фигуре 3; предпочтительно MF6256 или  
MF6930; MF6076, MF6974 или MF6226, предпочтительно MF6930, MF6076 или  
MF6974. Указанный переменный домен, который связывается с PD-1,  
предпочтительно содержит переменную область тяжелой цепи с участком  
CDR1, CDR2 и CDR3, который содержит аминокислотную последовательность  
15 CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области тяжелой цепи одной из VH,  
представленных для MF6076; MF6226; MF6236; MF6256; MF6930; MF6932;  
MF6935; MF6936; MF6972; MF6974 или MF6982 на фигуре 3; предпочтительно  
MF6256; MF6930; MF6076, MF6974 или MF6226, предпочтительно MF6930,  
MF6076 или MF6974.

20 Антитело или его вариант предпочтительно содержит переменный  
домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1 и содержит  
переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную  
последовательность переменной области тяжелой цепи, представленную для  
MF6076; MF6226; MF6236; MF6256; MF6930; MF6932; MF6935; MF6936;  
25 MF6972; MF6974 или MF6982 на фигуре 3, предпочтительно MF6256 или  
MF6930; MF6076, MF6974 или MF6226, предпочтительно MF6930, MF6076 или  
MF6974, содержащую не более 15, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или  
10, и предпочтительно содержащую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен  
аминокислот или комбинацию указанного относительно аминокислотной  
30 последовательности VH, представленной для MF.

Антитело или его вариант предпочтительно содержит переменный  
домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3 и который  
содержит переменную область тяжелой цепи с участком CDR3, содержащей  
аминокислотную последовательность участка CDR3 переменной области



тяжелой цепи, представленную для MF7100; MF7111; MF7116; MF7118; MF7134; MF7136; MF7137; MF7142; MF7146; MF7165; MF7167; MF7185; MF7443; MF7444; MF7515; MF7518; MF7096; MF7097; MF7106; MF7120; MF7133; MF7139; MF7144 или MF7524 на фигуре 3, предпочтительно MF7518; MF7165; MF7116; MF7096; MF7133; MF7139; MF7524 или MF7137, предпочтительно MF7139; MF7524, MF7133, MF7518 или MF7096. Указанный вариабельный домен, который связывается с LAG-3, предпочтительно содержит вариабельную область тяжелой цепи с участком CDR1, CDR2 и CDR3, который содержит аминокислотную последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи одной из VH, представленных для MF7100; MF7111; MF7116; MF7118; MF7134; MF7136; MF7137; MF7142; MF7146; MF7165; MF7167; MF7185; MF7443; MF7444; MF7515; MF7518; MF7096; MF7097; MF7106; MF7120; MF7133; MF7139; MF7144 или MF7524 на фигуре 3, предпочтительно MF7518; MF7165; MF7116; MF7096; MF7133; MF7139; MF7524 или MF7137, предпочтительно MF7139; MF7524, MF7133, MF7518 или MF7096.

Антитело или его вариант предпочтительно содержит вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3 и содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, представленную для MF7100; MF7111; MF7116; MF7118; MF7134; MF7136; MF7137; MF7142; MF7146; MF7165; MF7167; MF7185; MF7443; MF7444; MF7515; MF7518; MF7096; MF7097; MF7106; MF7120; MF7133; MF7139; MF7144 или MF7524 на фигуре 3, предпочтительно MF7518; MF7165; MF7116; MF7096; MF7133; MF7139; MF7524 или MF7137, предпочтительно MF7139; MF7524, MF7133, MF7518 или MF7096, содержащую не более 15, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и предпочтительно содержащую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или комбинацию указанного относительно аминокислотной последовательности MF.

Настоящее изобретение дополнительно объяснено в следующих примерах. Эти примеры не ограничивают объем настоящего изобретения, а служат лишь для разъяснения настоящего изобретения.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

**Фигура 1.** Общая легкая цепь, используемая в моно- и биспецифическом IgG.  
Фигура 1A: Аминокислотная последовательность общей легкой цепи. Фигура  
1B: Последовательность ДНК и трансляция варибельного домена общей  
5 легкой цепи (IGKV1-39/jk1). Фигура 1C: Последовательность ДНК и  
трансляция константной области общей легкой цепи. Фигура 1D: Трансляция  
варибельного домена общей легкой цепи IGKV1-39/jk5. Фигура 1E: V-область  
IGKV1-39A

10 **Фигура 2.** Тяжелые цепи IgG для получения биспецифических молекул.  
Фигура 2A: ген VH. Фигура 2B: область CH1. Фигура 2C: шарнирная область.  
Фигура 2D: область CH2. Фигура 2E: область CH2, содержащая молчащие  
замены L235G и G236R. Фигура 2F: домен CH3, содержащий замены L351K и  
T366K (KK). Фигура 2G: домен CH3, содержащий замены L351D и L368E (DE)  
15 Фигура 2A VH: в зависимости от MF (мишень): фигура 3.  
Фигура 2B CH1:  
Фигура 2C Шарнирная область:  
Фигура 2D CH2:  
Фигура 2E CH2, содержащая молчащие замены L235G и G236R:  
20 Фигура 2F CH3: KK из DEKK  
Фигура 2G CH3: DE из DEKK

**Фигура 3.** Аминокислотные последовательности варибельных областей  
тяжелой цепи:  
25 Фигура 3A. Варибельные области тяжелой цепи клонов, специфических в  
отношении PD-1  
Фигура 3B. Варибельные области тяжелой цепи клонов, специфических в  
отношении LAG-3  
Обозначение MF относится к Fab, содержащему представленную варибельную  
30 область тяжелой цепи и общую легкую цепь. Аминокислотная  
последовательность легкой цепи представлена на фигуре 1A. Подчеркнутые  
последовательности указывают на аминокислотную последовательность  
участков CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно.

**Фигура 4.** Карта вектора и признаки pIRES-neo3 (MV1363).

**Фигура 5.** Карта вектора и признаки pVAX1.

5 **Фигура 6.** Карта вектора и признаки фагмидного вектора MV1473, используемого для получения «иммунных» библиотек фаговых дисплеев.

**Фигура 7.** Карта вектора и признаки вектора экспрессии IgG MV1452, который использовали для экспрессии специфических в отношении PD-1 и PD-L1 Fab-фрагментов в КК-варианте тяжелой цепи для получения биспецифического IgG.  
10

**Фигура 8.** Аминокислотная последовательность гена VH, которая является специфической в отношении столбнячного токсина в комбинации с общей легкой цепью, такой как MF1337, и которая присутствует в DE-варианте тяжелой цепи, которую использовали для получения биспецифических молекул IgG PD-L1xTT и PD-1xTT. Подчеркнутые последовательности указывают на аминокислотную последовательность участков CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно.  
15

20

**Фигура 9.** Карта вектора и признаки вектора экспрессии IgG MV1377, который использовали для экспрессии специфического в отношении TT Fab-фрагмента MF1337 в DE-варианте тяжелой цепи для получения биспецифического IgG.

25 **Фигура 10.** Анализ блокирования PD-1/PD-L1

Оценка способности панели антител против PD-1 блокировать взаимодействие PD-L1 с нанесенным на планшеты PD-1 при концентрации биспецифического IgG 10 мкг/мл. Данные нормированы к данным, полученным при применении бивалентного эталонного антитела к PD-L1 MPDL3280A в концентрации 10 мкг/мл (100% блокирования). Типичный пример представлен на панели PD-1. Максимальное связывание (нормированное к 0% блокирования) было установлено путем инкубирования с неспецифическим в отношении PD-1/PD-L1 человека изотипическим антителом. Все переменные домены PD-1, содержащие последовательности MF, представленные на фигуре 3 и не  
30

представленные на данной фигуре, блокируют взаимодействие PD-1/PD-L1 >70%.

**Фигура 11.** Функциональная активность в отношении LAG-3 панели антител в дозе титра при репортерном анализе блокирования LAG-3. Взаимосвязь между местонахождением домена и блокирующей активностью в отношении LAG-3 схематически изображена на правой панели.

### **Фигура 12**

10 Показатель стимуляции выработки IL-2 под действием антител к LAG-3хPD-1 по сравнению с их исходным бивалентным антителом LAG-3. Каждое значение IL-2 сравнивали со значением для отрицательного контрольного антитела (не показано) для определения SI.

### **Фигура 13**

15 Стимуляция энтеротоксином В стафилококка (SEB) выработки IL-2 у здоровых доноров кровяных клеток усиливается с помощью биспецифических антител к LAG-3хPD-1 по сравнению с исходным бивалентным антителом PD-1 и эталонным антителом 25F7 LAG-3.

20

### **Фигура 14**

Сравнение антител к LAG-3. PG1337P300 представляет собой контрольное антитело, для которого не ожидается связывание клеток, и которое связывается со столбнячным токсином.

25 На левой панели представлено связывание указанных антител с клетками 293FF-LAG-3, которые экспрессируют LAG-3 на мембране клеток. На правой панели представлены активированные Т-клетки человека. Связывание антитела с клетками определяли с помощью F(ab')<sub>2</sub> меченного PE антитела к IgG. 25F7\*, установленная аффинность ~0,2 нМ.

30

### **Фигура 15**

Панельная характеристика LAG-3 на основе FACS. Девятнадцать антител, специфических в отношении LAG-3, экспрессировали в моновалентном (PB LAG-3 × TT) и бивалентном (PG) формате. Связывание антите определяли на

активированных Т-клетках и стабильных клеточных линиях 293FF-LAG-3. Приведенные две панели демонстрируют пример моно и бивалентного связывания MF7116 и MF7431 (25F7\*) в клетках 293FF-LAG-3. Моновалентное связывание определяли с помощью биспецифического антитела (PB), в котором одно плечо содержало VH (указано буквами MF) указанного антитела к LAG-3. Другое плечо антитела содержит VH, специфический в отношении столбнячного токсина (MF1337). Различия в связывании наблюдались между некоторыми бивалентными/моновалентными форматами панели LAG-3, но не 25F7\*.

10

### **Фигура 16**

Валидация репортерного анализа LAG-3 x PD-1: биспецифические антитела демонстрируют активность в репортерном анализе LAG-3 x PD-1.

15

### **Фигура 17**

Скрининговый репортерный анализ PD-1 + LAG-3. Панель А: LAG-3 x PD-1 с функциональными плечами LAG-3 и PD-1. Панель В: LAG-3 x PD-1 с нефункциональным плечом PD-1 с MF5374. Панель С, LAG-3 x PD-1 с нефункциональными плечами LAG-3 с MF7118 и MF7167. \* означает суррогатные плечи.

20

### **Фигура 18**

Общие результаты скринингового репортерного анализа, представленного на фигуре 18. Четыре цифры, следующие после букв, означают номер MF тяжелой цепи вариабельной области вариабельного домена биспецифического антитела. Например, биспецифическое антитело с результатом 52,22 в левом верхнем углу таблицы имеет одно плечо с MF6930 и одно плечо с MF7518. Значения представляют собой площадь под кривой (AUC) в виде % от контроля.

30

### **Фигура 19**

Скрининг методом SEB-анализа: пример влияния на выработку ИЛ-2. Панель А, LAG-3 x PD-1 с функциональными фрагментами к PD-1 и LAG-3. Панель В, LAG-3 x PD-1 с нефункциональным фрагментом к PD-1 с VH MF5374. Панель

C, LAG-3 x PD-1 с нефункциональными фрагментами к LAG-3 сVH MF7118 и MF7167. Звездочкой (\*) обозначено суррогатное антитело.

### **Фигура 20**

5 Результаты скрининга методами репортерного и SEB-анализа. Фрагменты ранжированы по функциональной активности (от высокой к низкой) в составе бивалентных антител в репортерном анализе. Сверху в каждом из столбцов фрагмент к LAG-3, слева в каждом из рядов фрагмент к PD-1. Как указано для  
10 фигуры 19, четырехзначное число, следующее непосредственно за буквами MG, указывает номер MF вариабельной области тяжелой цепи вариабельного домена биспецифического антитела. Значения представляют собой AUC, выраженную в % от контроля: белые поля = наибольшая активность, 15%: серые поля = средняя, 43%: черный = самая низкая, 43%.

### **15 Фигура 21**

Ранжирование LAG-3 x PD-1; фрагментов к PD-1. Матричные файлы использовали для определения 15% лучших из биспецифических антител на основе значений AUC по сравнению с положительным контролем в: 1) репортерном анализе; 2) скрининге методом SEB для донора 1 (данные об ИЛ-  
20 2); 3) скрининге методом SEB для донора 2 (данные об ИЛ-2). Затем было подсчитано, сколько биспецифических антител, несущих конкретный Fab-фрагмент к PD-1, присутствовало в этих 15% лучших. Клоны с фрагментами к PD-1, имеющие вариабельный домен с VH MF6974 или VH MF6076, показали наилучшие результаты в репортерном анализе и SEB анализе в комбинации с  
25 большинством фрагментов к LAG-3. Цветовые/серые обозначения, более темное соответствует более высокой категории.

### **Фигура 22**

30 Ранжирование LAG-3 x PD-1; фрагментов к LAG-3. Матричные файлы использовали для определения 15% лучших (слева) и 25% лучших (справа) из биспецифических антител на основе значений AUC по сравнению с положительным контролем в: 1) репортерном анализе; 2) скрининге методом SEB для донора 1 на основании данных об ИЛ-2; 3) скрининге методом SEB для донора на основании данных об ИЛ-2. Затем было подсчитано, сколько

биспецифических антител, несущих конкретный Fab-фрагмент к LAG-3, присутствовало в 15% лучших. Fab-фрагменты, входящие в 15% лучших, имеющие одинаковые показатели, были далее ранжированы с использованием показателей 25% лучших. Цветовые/серые обозначения, более темное  
5 соответствует более высокой категории.

### **Фигура 23**

Ранжирование фрагментов к PD1. Фрагменты к PD-1 (левый столбец), упорядоченные по результатам ранжирования, разнообразию  
10 последовательностей и аффинности связывания.

### **Фигура 24**

Ранжирование фрагментов к LAG-3. Фрагменты к LAG-3 (левый столбец), упорядоченные по результатам ранжирования, разнообразию  
15 последовательностей и аффинности связывания.

### **Фигура 25**

Действие исследуемых антител на выработку IFN- $\gamma$  в аллогенной СКЛ со зрелыми клетками. Мо-ДК получали из моноцитов CD14+, культивируемых в  
20 течение 7 дней. Незрелые ДК использовали на 7 день, а зрелые ДК получали путем культивирования в течение еще 3 дней в среде для созревания, затем культивировали совместно с Т-клетками, выделенными путем негативной селекции, и исследуемым антителом в течение 4 дней (мСКЛ). Определяли содержание IFN- $\gamma$  в культуральных супернатантах с помощью ELISA. Данные  
25 нормированы к контролю с применением носителя. Было выполнено четыре отдельных реакции СКЛ.

## **ПРИМЕРЫ**

30 В контексте настоящего описания «MFXXXX», где X независимо представляет собой число от 0 до 9, относится к Fab, содержащему переменный домен, в котором VH имеет аминокислотную последовательность, обозначенную 4 цифрами. Если не указано иное, переменная область легкой цепи переменного домена, обычно, имеет

последовательность, приведенную на фигуре 1А, обычно, 1В. «MFXXXX VH»  
относится к аминокислотной последовательности VH, обозначенной 4 цифрами.  
MF дополнительно содержит константную область легкой цепи и константную  
область тяжелой цепи, который обычно взаимодействует с константной  
5 областью легкой цепи. PG относится к моноспецифическому антителу,  
содержащему идентичные тяжелые и легкие цепи. PB относится к  
биспецифическому антителу с двумя различными тяжелыми цепями.  
Вариабельные области тяжелых цепей различаются и, обычно, различаются  
также области СН3, где одна из тяжелых цепей имеет в своем домене СН3  
10 мутацию КК, а другая имеет в своем домене СН3 комплементарную мутацию  
DE (см. PCT/NL2013/050294 (опубликовано в WO2013/157954)).



## **Пример: 1**

### **Получение материала для селекции и скрининга**

#### **Культивирование линий клеток**

5 Клетки Freestyle 293F (номер по каталогу p/n51-0029) получали от Invitrogen и перманентно содержали в среде FreeStyle 293. Клетки HEK293T (номер по каталогу ATCC-CRL-11268) приобретали у ATCC и перманентно содержали в DMEM/F12 (Gibco) с добавлением L-Глутамин (Gibco) и ЭБС (Lonza), и линии клеток CHO-S (номер по каталогу 11619-012) приобретали у  
10 Gibco и перманентно содержали в среде Freestyle CHO expression medium (Invitrogen) с добавлением L-глутамина.

**Получение векторов экспрессии PD-1 и LAG-3 для иммунизации, а также для получения стабильной линии клеток и временных трансфекций**  
15

Полноразмерную кДНК каждой мишени, содержащую уникальные сайты рестрикции для клонирования и консенсусную последовательность Козака для эффективной трансляции, либо синтезировали, либо получали путем ПЦР-амплификации с использованием коммерчески доступной экспрессионной  
20 конструкции, содержащей кДНК мишени, со специфическими праймерами, которые обеспечивали введение уникальных сайтов рестрикции для клонирования и консенсусную последовательность Козака для эффективной трансляции. кДНК каждой мишени клонировали в эукариотическую экспрессионную конструкцию, такую как pIRES-neo3 (Clontech; фигура 4) или  
25 pVAX1 (Thermo Fisher Scientific; фигура 5) с помощью NheI/EcoRI, в результате чего были получены pIRES-neo3\_[TARGET\_NAME] и pVAX1\_[TARGET\_NAME], соответственно. Корректность последовательностей вставки were verified путем сравнения с эталонными аминокислотными последовательностями NCBI. Конструкции pIRES-neo3 применяли для  
30 получения стабильной линии клеток и временных трансфекций. Конструкции pVAX1 применяли для целей иммунизации. Сведения о названиях полученных конструкций приведены в таблице 1.

Аминокислотная последовательность полноразмерной вставки huPD-1 (как в pIRES-neo3, так и в pVAX1) для экспрессии на поверхности клетки (идентична GenBank: NP\_005009.2):

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGD  
5 NATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLP  
NGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAH  
PSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPL  
KEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPA  
RRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL,  
10

где:

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWR: сигнальный пептид.

PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYR  
MSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYL  
15 CGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSRPAGQFQTLV: ECD  
(внеклеточный домен) huPD-1.

VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI: предварительно определенная ТМ-  
область.

CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPC  
20 VPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL:

Внутриклеточный хвост.

Аминокислотная последовательность полноразмерной вставки PD-1  
макака (яванского макака (*Macaca fascicularis*)) (как в pIRES-neo3, так и в  
25 pVAX1) для экспрессии на поверхности клетки (идентична GenBank:  
ABR15751.1):

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLESPDRPWNAPTFSPALLLVTEGDN  
ATFTCSFSNASESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTRLPN  
GRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHP  
30 SPSRPAGQFQALVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAAQGTIEARRTGQPLK  
EDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPAPCVPEQTEYATIVFPSGLGTSSPAR  
RGSADGPRSPRPLRPEDGHCSWPL,

где:

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWR: сигнальный пептид.

PGWFLESPDRPWNAPTFSPALLLVTEGDNATFTCSFSNASESFVLNWYR  
MSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTRLNNGRDFHMSVVRARRNDSGTYL  
CGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQALV: ECD

5 (внеклеточный домен) maPD-1.

VGVVGGLLGSLLVLLVWVLAVI: предварительно определенная ТМ-  
область.

CSRAAQGTIEARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPAPC  
VPEQTEYATIVFPSGLGTSSPARRGSADGPRSPRPLRPEDGHCSWPL:

10 внутриклеточный хвост.

Аминокислотная последовательность полноразмерной вставки LAG-3  
человека (как в pIRES-нео3, так и в pVAX1) для экспрессии на поверхности  
клетки (идентична GenBank: NP\_002277.4):

15 MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAIEVPVWVAQEGAPAQLPCSPTIP  
LQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVL  
SVGPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRD  
RALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQ  
GRVPVRESPIHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGL  
20 EPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGD  
FTLRLEDVVSQAQAGTYTCHIIHLQEQQLNATVTLAHTVTPKSFSGPSLGKLLCE  
VTPVSGQERFVWSSLDTPSQRFSFGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGA  
AVYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLLFLILGVLSLLLLVTGAFGFHLWRRQ  
WRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL

25

где:

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKP: сигнальный пептид.

LQPGAIEVPVWVAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAA  
PGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQ  
30 RGDVSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRA  
SDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPIHHHLAESFLFLPQVSPM  
DSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGV  
GTRSFLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDVVSQAQAGTYTCHIIHLQEQQ  
LNATVTLAHTVTPKSFSGPSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRFSFGP

WLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAGH  
L: ECD.

LLFLILGVLSLLLLVTGAFGF: предварительно определенная ТМ-область.

HLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPE

5 PEQL: внутриклеточный хвост.

Аминокислотная последовательность полноразмерной вставки LAG-3 крысы (амбарной крысы (*Rattus norvegicus*)) (как в pIRES-neo3, так и в pVAX1) для экспрессии на поверхности клетки (идентична GenBank: NP\_997678.2):

MRQDLFLDLLLQLLWEAPVVSSGPGKELSVVWAQEGAPVHLPCSLEFP  
10 HLDPNFLRRGWVTWQHRRPDSQPASIPALDLLQGMPSTRRHPPHRYTVLSVAP  
GGLRSGRQPLLSHVQLEKRGPRGDFSLWLRPATRKDAGEYHAFVRLPDRDFS  
CSLRLRVGQASMIASPPGTLKPSDWVILNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQSRVPVHN  
SPRHYLAESFLLLPQVSPLDSGTWGCVLTYRDGFNVSITYNLKVQGLEPVAPLT  
VYAAEGSRVELPCHLPPVVGTPSLLIKWTPPGGGPELPVTGKSGNFTLQLENV  
15 GRAQAGTYTCSIHLQGRQLSAAVTLAVITVTPKSFGLPGSPQKLLCEVVPASGEG  
RFVWRPLSDLSRSSLGVPVLELQEAKLLAEQWQCQLYEGQKLLGATVYTAESSS  
GAWSAKRISGDLKGGHLFSLILGALALFLLVTGAFGFHLWRRQLLRRRFSALE  
HGIRPPPQSKIEELEREPETEMEPETEPDPEPQPEPELEPEPESRQL,

20 где:

MRQDLFLDLLLQLLWEAPVVSS: сигнальный пептид.

GPGKELSVVWAQEGAPVHLPCSLEFPHLDPNFLRRGWVTWQHRRPDSQ  
PASIPALDLLQGMPSTRRHPPHRYTVLSVAPGGLRSGRQPLLSHVQLEKRGPR  
GDFSLWLRPATRKDAGEYHAFVRLPDRDFSCSLRLRVGQASMIASPPGTLKPSD  
25 WVILNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQSRVPVHNSPRHYLAESFLLLPQVSPLDSGT  
WGCVLTYRDGFNVSITYNLKVQGLEPVAPLTVYAAEGSRVELPCHLPPVVGTPS  
LLIAKWTPPGGGPELPVTGKSGNFTLQLENVGRAQAGTYTCSIHLQGRQLSAAV  
TLAVITVTPKSFGLPGSPQKLLCEVVPASGEGRFVWRPLSDLSRSSLGVPVLELQE  
AKLLAEQWQCQLYEGQKLLGATVYTAESSSGAWSAKRISGDLKGGHL: ECD.

30 FLSLILGALALFLLVTGAFGF: предварительно определенная ТМ-область.

HLWRRQLLRRRFSALEHGIRPPPQSKIEELEREPETEMEPETEPDPEPQ  
PEPELEPEPESRQL: внутриклеточный хвост.

Аминокислотная последовательность полноразмерной вставки LAG-3 макака (*Macaca mulatta*) (как в pIRES-Neo3, так и в pVAX1) для экспрессии на поверхности клетки (идентична GenBank: *Macaca mulatta*):

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPPQPGAEISVVWAQEGAPAQLPCSPTIPL  
5 QDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAPAPGHPAPGHRPAAPYSWGPRPRRYTVLS  
VGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRATVHLRDR  
ALSCRLRLRVGQASMTASPPGSLRTSDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRSRGQGR  
VPVQGSPIHHHLAESFLFLPHVGPMD SGLWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLE  
PATPLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVGTQSFLTAKWAPPGGGPDLLVAGDNGDF  
10 TLRLEDVVSQAQAGTYICHIRLQGGQQLNATVTLAHTVTPKSFSGPSLGKLLCEV  
TPASGQEHFVWSPLNTPSQRFSFGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLHQGETLLGAA  
VYFTELSSPGAQRSGRAPGALRAGHLPLFLILGVLFLLLLVTGAFGFHLWRRQW  
RPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPELEPEPELERELGPEPEPGPEPEPEQL  
,  
15

где:

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKP: сигнальный пептид.  
PQPGAEISVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAPAP  
GHPAPGHRPAAPYSWGPRPRRYTVLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQR  
20 GDFSLWLRPARRADAGEYRATVHLRDRALSCRLRLRVGQASMTASPPGSLRTS  
DWVILNCSFSRPDRPASVHWFRSRGQGRVPVQGSPIHHHLAESFLFLPHVGPMD  
SGLWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPATPLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVG  
TQSFLTAKWAPPGGGPDLLVAGDNGDFTLRLEDVVSQAQAGTYICHIRLQGGQQL  
NATVTLAHTVTPKSFSGPSLGKLLCEVTPASGQEHFVWSPLNTPSQRFSFGPW  
25 LEAQEAQLLSQPWQCQLHQGETLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALRAGHL:  
ECD.  
PLFLILGVLFLLLLVTGAFGF: предварительно определенная ТМ-область.  
HLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPELEPEPELERELGPEPEPG  
PEPEPEQL: внутриклеточный хвост.

30

### **Получение стабильной линии клеток, экспрессирующей PD-1 и LAG-3**

Экспрессионные конструкции pIRES-neo3\_[TARGET\_NAME] (таблица 1) применяли для получения клонов CHO-S или Freestyle 293F, стабильно экспрессирующих соответствующие белки. Конструкции подвергали временной

трансфекции в клетках CHO-S и Freestyle 293F путем трансфекции с использованием липофектамина, и проводили скрининг методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) с применением антител, реагирующих с соответствующими белками. После подтверждения экспрессии временно трансфицированные клетки высевали в предельном разведении и культивировали при давлении отбора, соответствующем используемой экспрессионной конструкции, для получения стабильных клонов клеток. После 2-3 недель селекции проводили скрининг клонов методом FACS. Увеличивали популяции отобранных клонов путем серийного пассажа, повторно тестировали методом FACS и замораживали при -150°C. Клоны, которые стабильно экспрессируют гетерологичные белки, имеют названия «клетки CHO-S\_[TARGET\_NAME]» или «клетки Freestyle 293F\_[TARGET\_NAME]». Сведения о конструкциях, применяемых для получения стабильных линий клеток, и их полные наименования приведены в таблице 1.

15

## **Пример 2**

### **Иммунизация, селекция и скрининг**

#### **Мыши, используемые для иммунизации**

20 Для получения антител человека, связывающихся с huPD-1 и huLAG-3, иммунизировали мышей, трансгенных по гену VK1-39 легкой цепи человека (общая легкая цепь мышам, см. W02009/157771) и по минилокусу гена тяжелой цепи человека (НС) (включающему часть V-сегментов гена человека, все D-сегменты гена человека и все J-сегменты гена человека). Эти мыши упоминаются как мыши «MeMo®». Мышей иммунизировали либо рекомбинантным белковым антигеном, либо ДНК, кодирующей белковый антиген, что кратко описано ниже.

25

#### **Иммунизация белками**

30 Мышей «MeMo®» иммунизировали путем подкожных инъекций рекомбинантного белка и адьюванта Gerbu MM (Gerbu Biotechnik; номер по каталогу 3001). Для иммунизации применяли рекомбинантные huPD-1-Fc (R&D; номер по каталогу 1086-PD) и huLAG-3-His (Abcam; номер по каталогу Ab184729). Мышей иммунизировали 40 мкг рекомбинантного белка в ФСБ,

смешанном с 40 мкл адьюванта, в общем объеме 100 мкл. Впоследствии мышей подвергали бустерной иммунизации на 14 и 28 дни с использованием 20 мкг рекомбинантного белка в ФСБ совместно с 20 мкл адьюванта в общем объеме 50 мкл. На 35 день собирали сыворотку мышей для определения сывороточных титров. Мышей с низкой реактивностью сыворотки против мишени человека и/или макака подвергали дополнительным циклам бустерной иммунизации с применением рекомбинантного белкового антигена человека или макака и анализа сыворотки. Каждый цикл состоял из двух еженедельных иммунизаций с применением до 20 мкг рекомбинантного белка в 50 мкл ФСБ, после чего через одну неделю собирали сыворотку для анализа титра. Мышей, демонстрирующих высокие сывороточные титры против мишени человека и макака, подвергали заключительной бустерной иммунизации, состоящей из ежедневных инъекций 20 мкг рекомбинантного белка в 50 мкл ФСБ последовательно в течение трех дней. Через один день после последней инъекции собирали лимфоидную ткань мышей.

### **Иммунизация ДНК**

Мышей «MeMo®» иммунизировали ДНК методом нанесения татуировки с использованием устройства для микропигментации. Тату-иммунизации ДНК проводили с применением 20 мкг плазмидной ДНК, кодирующей целевой антиген (pVAX1\_[TARGET\_NAME], таблица 1). Мышей иммунизировали ДНК, кодирующей только мишень человека (PD-1 и LAG-3), или путем чередующихся иммунизаций ДНК, кодирующей мишень человека и крысы (LAG-3) с получением различных видов кросс-реактивных антител. Мышей иммунизировали в 0, 3, 6, 14, 17, 28 и 31 дни. На 35 день собирали сыворотку мышей для определения сывороточных титров. Мышей с низкой реактивностью сыворотки против мишени человека и/или макака подвергали дополнительным циклам бустерной иммунизации с применением ДНК-антигена человека и анализа сыворотки. Каждый цикл состоял из двух еженедельных иммунизаций с применением ДНК, после чего через одну неделю собирали сыворотку для анализа титра. Мышей, демонстрирующих выраженную реактивность сыворотки против клеток, экспрессирующих мишень человека и макака, подвергали заключительной бустерной иммунизации, и затем через 3 дня собирали лимфоидную ткань.

### **Определение сывороточных титров**

Сывороточные титры определяли методом анализа FACS с использованием линий клеток, экспрессирующих антигены-мишени человека и  
5 макака.

### **Получение синтетических фаговых библиотек Fab**

Синтетические библиотеки конструировали на основе репертуара зародышевых генов VH человека, которые были отобраны по принципу частого  
10 использования из встречающихся в природе репертуаров и разнообразия канонических последовательностей. К этим генам VH добавляли синтетические участка HCDR3 с помощью ПЦР. Это осуществляли с использованием прямых праймеров, которые отжигаются на каркасном участке 1 генов VH и содержат сайт рестрикции SfiI для клонирования. Обратные праймеры содержали  
15 последовательности для отжига на каркасном участке 3 генов VH, за которыми следовали рандомизированные последовательности для кодирования разнообразия HCDR3 и последовательность, кодирующая каркасный участок 4, также содержащая сайт рестрикции BstEII и XhoI для клонирования. Синтетические участки CDR3 были либо полностью случайными, либо  
20 кодировали более ограниченное разнообразие, основанное на частоте использования аминокислотных остатков в определенных положениях в HCDR3. Продукты ПЦР, кодирующие гены VH, клонировали в векторы фагового дисплея в слиянии с геном белка 3 фага M13 с использованием упомянутых выше ферментов рестрикции, а также содержащие ген, кодирующий общую легкую цепь. Крупномасштабное лигирование и  
25 трансформация E.coli TG1 обеспечивали получение больших библиотек синтетических Fab-фрагментов, экспонированных на поверхности фага, которые применяли для пэннинга на антигенах или клетках для идентификации антигенспецифических Fab-фрагментов.

30

**Получение «иммунных» фаговых библиотек Fab методом ОТ-ПЦР из тканей иммунизированных мышей**



У мышей удаляли селезенку и дренирующие лимфатические узлы, для которых наблюдали значительный гуморальный ответ против соответствующих белков-мишеней.

5 Суспензии отдельных клеток получали как из селезенки, так и из паховых лимфатических узлов, затем эти ткани лизировали в реагенте Trizol LS Reagent (Thermo Scientific с#10296028) и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до использования.

Паховые лимфатические узлы от успешно иммунизированных мышей применяли для the конструирования «иммунных» фаговых репертуаров антител. Осуществляли экстракцию РНК из суспензии отдельных клеток 10 лимфоидной ткани. 1мкг общей РНК использовали в реакции ОТ с применением специфического праймера IgG-CH1. Полученную кДНК затем использовали для амплификации поликлонального пула кодирующей VH кДНК с применением собственных адаптированных VH-специфических 15 праймеров, как по существу описано в источнике Marks et al. (J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97). Затем полученный продукт ПЦР клонировали в фагмидном векторе (фигура 6) для достижения экспонирования Fab-фрагментов на поверхности фага, как описано в источнике de Haard et al. (J Biol Chem. 1999 Jun 25;274(26):18218-30), за исключением того, что легкая цепь (фигура 1A и 1B) была одинаковой для каждого антитела и кодировалась 20 вектором. После лигирования фагмиды использовали для трансформации бактерий E.coli TG1, и трансформированные бактерии высевали на чашки с агаром LB, содержащим ампициллин и глюкозу. Все фаговые библиотеки содержали  $>4 \times 10^5$  трансформантов и имели частоту вставки  $> 90\%$ . После 25 культивирования в течение ночи бактерии собирали и использовали для получения фага в соответствии с установленными протоколами (de Haard et al., J Biol Chem. 1999 Jun 25;274(26):18218-30).

### 30 **Селекция фага, несущего Fab-фрагменты, связывающиеся с белком-мишенью человека, из синтетических и «иммунных» фаговых библиотек Fab с помощью рекомбинантных белков**

Полученные фаговые библиотеки Fab использовали для селекции специфических в отношении мишени Fab с использованием фагового дисплея на непосредственно нанесенных рекомбинантный белках. Для PD-1

использовали huPD-1-Fc (R&D; номер по каталогу 1086-PD) и huPD-1-биотин (BPS bioscience; номер по каталогу 71109). Для LAG-3 использовали huLAG-3-Fc (R&D; номер по каталогу 2319-L3), huLAG-3-Fc (Enzo; номер по каталогу ALX-522-078), huLAG-3-His (Abcam; номер по каталогу Ab184729) и ratLAG-3 His (SinoBiological; номер по каталогу 80367-R08H).

Для селекции с использованием небiotинилированного рекомбинантного белка (селекция методом «пэннинга») белки наносили на лунки планшета MAXISORP™ ELISA. Планшеты MAXISORP™ ELISA блокировали 4% сухого обезжиренного молока (Marvel) в ФСБ. Фаговые библиотеки Fab также блокировали с применением 4% Marvel и, в случае использования Fc-меченого рекомбинантного белка, также с применением избытка IgG человека для истощения связывающих фрагмент Fc веществ, после чего добавляли фаговую библиотеку к нанесенному антигену.

Инкубирование фаговой библиотеки с нанесенным белком проводили в течение 1,5 ч при комнатной температуре в условиях встряхивания. Затем планшеты или пробирки пятнадцать раз промывали 0,05% Tween-20 в ФСБ, затем 5 раз промывали ФСБ. Связанный фаг элюировали в течение 20 минут с помощью трипсина, после чего трипсин нейтрализовали с помощью ингибитора трипсина AEBSF (Sigma).

Для селекции с использованием биотинилированного белка («селекция в растворе») на лунки планшета MAXISORP™ ELISA наносили нейтравидин. Планшеты MAXISORP™ ELISA блокировали 1% казеина в ФСБ. Параллельно биотинилированный белок и фаговые библиотеки Fab блокировали в течение 30 минут в 0,5% казеина в ФСБ, содержащем избыток IgG человека, в отдельных пробирках Eppendorf. После этого блокированные фаг и биотинилированный белок смешивали и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем смесь добавляли в покрытые нейтравидином лунки на 20 минут для захвата несущих Fab фаговых частиц, которые были связаны с биотинилированным белком. Затем планшеты пятнадцать раз промывали 0,05% Tween-20 в ФСБ, затем 5 раз промывали ФСБ. Связанный фаг элюировали в течение 20 минут с помощью трипсина, после чего трипсин нейтрализовали с помощью ингибитора трипсина AEBSF (Sigma).

Элюаты, полученные при применении обеих стратегий селекции («пэннинга» и «в растворе») добавляли к E. coli TG-1 и инкубировали при 37°C

для заражения фагом. Затем инфицированные бактерии высевали на чашки с агаром, содержащим ампициллин и глюкозу, и инкубировали при 37°C в течение ночи. Отдельные клоны, полученные в результате селекции, подвергали скринингу в отношении связывания с мишенью методом ELISA  
5 или FACS, в зависимости от мишени.

Для селекции с использованием синтетических фаговых библиотек Fab выполняли второй цикл селекции после восстановления полученных в результате первого цикла селекции клонов с использованием того же протокола который описан выше для первого цикла селекции. Тот же  
10 селекционный антиген, который использовали в первом цикле, также использовали во втором цикле за исключением первого цикла селекции raLAG-3-His, за которым следовал второй цикл селекции с huLAG-3-His.

### **Селекция фага, несущего Fab-фрагменты, специфически 15 связывающиеся с мишенью человека, из «иммунных» фаговых библиотек Fab с помощью клеток, стабильно экспрессирующих белок-мишень**

Фаговые библиотеки Fab, которые получали от иммунизированных мишенью мышей, подвергали селекции с помощью фагового дисплея на  
20 клетках, экспрессирующих соответствующую мишень. Стабильные линии клеток, экспрессирующих PD-1 или LAG-3 (таблица 1), применяли для первого цикла селекции. Клетки блокировали 10% ЭБС в ФСБ. После блокирования восстановленный фаг инкубировали с блокированными клетками. Клетки совместно с фагом инкубировали в течение 1 ч при 4°C. Промывку клеток (5  
25 раз) проводили с использованием 1 мл 10% ЭБС в ФСБ. Связанный фаг элюировали с помощью трипсина в течение 20 минут, после чего трипсин нейтрализовали с помощью ингибитора трипсина AEBSF (Sigma). Полученный элюат добавляли к *E. coli* TG-1 и инкубировали при 37°C для заражения фагом. Затем инфицированные фагом бактерии высевали на чашки с агаром,  
30 содержащим ампициллин и глюкозу, и инкубировали при 37°C в течение ночи.

### **Скрининг для поиска несущих специфические в отношении мишени Fab клонов методом ELISA**

Из отдельных клонов получали растворимый Fab или фаг (J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97; J Biol Chem. 1999 Jun 25;274(26):18218-30). Полученные образцы растворимого Fab или фаг разводили (1:5 или 1:10, соответственно) в 4% сухого обезжиренного молока (Marvel) в ФСБ (блокирующий буфер) и тестировали методом ELISA на связывание с лунками, покрытыми тем же антигеном, который использовали для селекции, или с huLAG-3-His (Abcam; номер по каталогу Ab184729) для всех циклов селекции, проводимых с ratLAG-3 His (SinoBiological; номер по каталогу 80367-R08H).

Связанные Fab обнаруживали с помощью окрашивания антителом anti-myc (Roche; номер по каталогу 11667203001), разведенным 1:1000 в блокирующем буфере, затем конъюгированным с ПХ антителом против IgG мыши (Jackson ImmunoResearch; номер по каталогу 715-035-150), разведенным 1:5000 в блокирующем буфере. Связанный фаг обнаруживали с помощью окрашивания конъюгированным с ПХ моноклональным антителом против M13 (GE healthcare; номер по каталогу 27-9421-01), разведенным 1:5000 в блокирующем буфере.

После окрашивания каждым антителом лунки промывали ФСБ-Т (ФСБ-0,05% об./об. Tween 20). Связанное вторичное антитело визуализировали с помощью окрашивания TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и окрашивания количественно оценивали путем определения OD<sub>450нм</sub>. Считали, что клоны связывались с мишенью, если OD<sub>450нм</sub> по меньшей мере в три раза превышала фоновый сигнал, полученный при использовании отрицательного контроля Fab.

Кодирующие VH κДНК всех специфических в отношении мишени клонов секвенировали. Выборку уникальных клонов, определенных на основании идентичности последовательностей и результатах анализа кластеров, затем тестировали в FACS в отношении связывания с PD-L1, экспрессированным на клетках, как описано ниже для клонов, полученных при селекции клеток.

### **Скрининг для поиска несущих специфические в отношении мишени Fab клонов методом FACS**

Из отдельных клонов, отобранных на клетках, экспрессирующих соответствующую мишень, получали растворимый Fab или фаг, как описано (J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97; J Biol Chem. 1999 Jun 25;274(26):18218-30). Образцы Fab тестировали методом FACS для определения связывания с

клетками, экспрессирующими мишень человека и макака (таблица 1), путем инкубирования со смесью разведенного 1:5 образца Fab с разведенным 1: 1000 антителом anti-мыс (Gentaur; номер по каталогу 04-СМУС-9Е10) в буфере для FACS (0,5% инактивированной нагреванием ЭБС в ФСБ). Связанные  
5 комплексы Fab/anti-мыс обнаруживали путем инкубирования с конъюгированным с АПК антителом козы против IgG мыши (BD Bioscience; номер по каталогу 550826), разведенным 1:500 в буфере для FACS.

Образцы фага тестировали методом FACS для определения связывания путем разведения образцов фага 1:3 в блокирующем буфере и инкубирования с  
10 экспрессирующими мишень клетками в течение 1 часа. Связанный фаг обнаруживали с помощью окрашивания биотинилированным антителом против M13 (Fitzgerald, номер по каталогу 61R-M101ABTB62-FEZ, 1:125 в буфере для FACS, 30 минут на льду) и меченным PE стрептавидином (Invitrogen, номер по каталогу SA1004-4; 1:400 в буфере для FACS в течение 15  
15 минут на льду). После инкубирования с каждым антителом лунки три раза промывали буфером для FACS. Окрашенные клетки анализировали с использованием прибора FACS Accuri C6 (Becton and Dickinson). Клоны считали положительными, когда средняя интенсивность флуоресценции была по меньшей мере в три раза выше фонового сигнала, полученного при  
20 использовании отрицательного контроля Fab.

### **Пример 3**

#### **Определение характеристик несущих специфические в отношении huLAG-3 и huPD-1 Fab клонов в формате IgG**

25

#### **Реклонирование специфического в отношении LAG-3 и PD-1 человека Fab в формат IgG**

Выборку уникальных клонов, определенных на основании последовательностей CDR3 и различий в генах VH зародышевой линии,  
30 которые связывались с белком-мишенью человека и макака, экспрессированном на клетках, впоследствии реклонировали в плазмиду экспрессии IgG, такую как MV1452 (фигура 7), которая содержала общую легкую цепь (фигура 1), путем расщепления под действием Sfi1-BstEII и

лигирования пула расщепленных кДНК в соответствии со стандартными методиками молекулярной биологии.

**Экспрессия биспецифического IgG, содержащего Fab, специфический в отношении LAG-3 человека или PD-1 человека, и Fab, специфический в отношении столбнячного токсина**

Биспецифические антитела получали путем временной котрансфекции двух плазмид, кодирующих IgG с различными доменами VH, с использованием запатентованной технологии конструирования СНЗ для обеспечения эффективной гетеродимеризации и получения биспецифических антител. Общая легкая цепь, присутствующая в обеих плазмидах, содержащих тяжелую цепь, также была котрансфицирована в ту же клетку. В одновременно рассматриваемых заявках авторов настоящего изобретения (например, WO2013/157954 и WO2013/157953; включенных в настоящее описание посредством ссылки) раскрыты способы и средства для получения биспецифических антител из единственной клетки, таким образом, предложены средства, которые способствуют преимущественному получению биспецифических антител по сравнению с получением моноспецифических антител. Эти способы также могут быть эффективно применены в настоящем изобретении. В частности, предпочтительными мутациями для получения по существу только биспецифических полноразмерных молекул IgG, являются аминокислотные замены в положениях 351 и 366, например, L351K и T366K (нумерация соответствует нумерации EU) в первом домене СНЗ («КК-вариант» тяжелой цепи) и аминокислотные замены в положениях 351 и 368, например, L351D и L368E во втором домене СНЗ («DE-вариант» тяжелой цепи), или наоборот (фигура 2). Ранее в одновременно рассматриваемых заявках авторов настоящего изобретения было продемонстрировано, что отрицательно заряженный DE-вариант тяжелой цепи и положительно заряженный КК-вариант тяжелой цепи преимущественно образуют пары с образованием гетеродимеров (так называемых биспецифических молекул «ДЕКК»). Гомодимеризация DE-вариантов тяжелых цепей (DE-DE гомодимеров) или КК-вариантов тяжелых цепей (КК-КК гомодимеров) практически не происходит вследствие сильного отталкивания заряженных остатков в области контакта СНЗ-СНЗ между идентичными тяжелыми цепями.

Гены VH, кодирующие антитела, связывающиеся с LAG-3 и PD-1 человека, описанные выше, клонировали в вектор экспрессии IgG MV1452, кодирующий положительно заряженный домен CH3. Антитело, нацеленное на столбчатый токсин (СТ) (фигура 8) клонировали в вектор экспрессии IgG 5 MV1377 (фигура 9), кодирующий отрицательно заряженный домен CH3. Для экспрессии панели антител к LAG-3 и PD-1 в формате IgG всю панель также клонировали в вектор отрицательно заряженного домена CH3 для обеспечения возможности получения бивалентных IgG к LAG-3 или PD-1. Адаптированные к суспензионному росту клетки 293F Freestyle культивировали в колбах T125 10 на плоской поверхности шейкера до достижения плотности  $3,0 \times 10^6$  клеток/мл. Клетки высевали с плотностью  $0,3-0,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/мл в каждую лунку 24-луночного планшета с глубокими лунками. Клетки подвергали временной трансфекции смесью двух плазмид, кодирующих различные антитела, клонированных в запатентованную векторную систему. 15 Через семь дней после трансфекции клеточный супернатант собирали и фильтровали через фильтр с диаметром пор  $0,22 \mu\text{м}$  (Sartorius). Полученный стерильный супернатант хранили при  $4^\circ\text{C}$  до очистки антител.

#### **Очистка биспецифического IgG**

20 Очистку IgG проводили в малом масштабе ( $< 500 \text{ мкг}$ ) путем аффинной хроматографии на белке А. Маломасштабную очистку проводили в стерильных условиях в 24-луночных фильтровальных планшетах с использованием фильтрации. Сначала pH среды доводили до 8,0, и затем содержащие IgG супернатанты инкубировали с гранулами сефарозы CL-4B, содержащими 25 иммобилизованный белок А (50% об./об.) (Pierce) в течение 2 часов при  $25^\circ\text{C}$  на качающейся платформе при 600 об./мин. Далее гранулы собирали путем фильтрации. Гранулы дважды промывали ФСБ, pH 7,4. Затем связанный IgG элюировали при pH 3,0 с помощью 0,1 М цитратного буфера, и полученный и элюат немедленно нейтрализовали с использованием Трис, pH 8,0. Замену 30 буфера осуществляли путем центрифугирования с использованием многослойных мембранных фильтров Ultracel 10 (Millipore). Полученные образцы собирали в ФСБ, pH 7,4. Концентрацию IgG концентрация определяли с помощью Octet. Образцы белка хранили при  $4^\circ\text{C}$ .

### **Количественное определение IgG с помощью Octet**

Для определения количества очищенного IgG концентрацию антитела определяли с помощью аналитической системы Octet analysis с использованием биосенсоров с белком А (Forte-Bio, в соответствии с 5 рекомендациями поставщика), используя в качестве стандарта общий IgG человека (Sigma Aldrich, номер по каталогу I4506).

### **Анализ специфичности IgG к huLAG-3 и huPD-1**

Антитела (бивалентные антитела к LAG-3 и биспецифическое антитела к 10 PD-1хТТ) тестировали методом FACS для определения связывания со стабильными линиями клеток, экспрессирующими соответствующие ортологи человека и макака (таблица 1), и клетками дикого типа. Следовательно, клетки собирали и разводили до  $10^6$  клеток/мл в буфере для FACS (ФСБ/0,5%БСА/0,5мМ ЭДТА). 1-2  $\times 10^5$  клеток добавляли в каждую лунку с U- 15 образным дном 96-луночного планшета. Клетки центрифугировали в течение 2 минут при 300 g при 4°C. Супернатант отбрасывали, переворачивая планшет (планшеты). Добавляли 50 мкл каждого образца IgG в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч на льду. Клетки центрифугировали один раз, супернатант удаляли, и клетки дважды промывали 150 мкл буфера для FACS. 20 Добавляли 50мкл разведенного 1:400 антитела козы к IgG человека, меченного PE (Invitrogen), и инкубировали в течение 30 минут на льду в темноте. После добавления буфера для FACS клетки центрифугировали один раз, супернатант удаляли, и клетки дважды промывали буфером для FACS. Клетки анализировали на проточном цитометре FACSCanto (Becton and Dickinson) в 25 режиме HTS. Связывание антител с клетками оценивали путем определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) популяции окрашенных клеток. Считали, что антитела связываются со своей мишенью, если MFI по меньшей мере в пять раз превышала MFI той же популяции клеток, окрашенных с применением несвязывающего антитела (нацеленного на столбчатый 30 анатоксин) (отрицательного контроля).

**Биннинг специфических в отношении huPD-1 Fab-фрагментов, присутствующих в биспецифическом IgG PD-1хТТ, по способности блокировать лиганд**



Клоны, связывающиеся с huPD-1, тестировали для определения их способности блокировать взаимодействие PD-L1 с PD-1. Таким образом, PD1-Fc (R & D systems; номер по каталогу 1086-PD) наносили на планшет Maxisorp в концентрации 1 мкг/мл. Лунки с покрытием блокировали 4% БСА в ФСБ. Затем добавляли 0,55 мкг/мл биотинилированного PD-L1 (BPS bioscience; номер по каталогу 71105) в присутствии или отсутствии IgG в диапазоне от 0,15 до 20 мкг/мл. Связанные биотинилированный PD-L1 обнаруживали с помощью конъюгированного с ПХ стрептавидина (BD bioscience; номер по каталогу 554066), разведенного 1:2000 в блокирующем буфере. После каждой стадии инкубирования планшет для ELISA три раза промывали ФСБ-Т (ФСБ-0,05% об./об. Tween 20). Связанный стрептавидин визуализировали с помощью окрашивания ТМВ/Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>, и окрашивание количественно оценивали путем определения OD<sub>450нм</sub>. Считали, что клоны блокируют взаимодействие PD-1 с PD-L1, если сигнал ELISA снижается более чем на 70% при концентрации IgG (PD-1xТТ) 10 мкг/мл по сравнению с контролем, в который добавляли специфическое к ТТ конкурирующее антитело. На фигуре 10 представлены результаты, полученные при репрезентативной селекции панели антител к PD-1, протестированных в качестве PD-1xТТ биспецифических молекул.

## 20 Ранжирование по аффинности специфических в отношении huLAG-3 и huPD-1 Fab-фрагментов, присутствующих в биспецифических IgG LAG-3xТТ и PD-1xТТ

Биспецифические антитела, которые, как было показано, связываются с соответствующими ортологами человека и макака в FACS, ранжировали методом FACS по кажущейся аффинности к обоим ортологам. Следовательно, стабильные линии клеток, экспрессирующие соответствующие ортологи (таблица 1), собирали и разводили до 10<sup>6</sup> клеток/мл в буфере для FACS (ФСБ/0,5%БСА/0,5мМ ЭДТА). Клетки центрифугировали в течение 2 минут при 300 g при 4°C. Супернатант отбрасывали, переворачивая планшет (планшеты). Добавляли 50 мкл каждого образца IgG в виде 11-ступенчатой серии 2-кратных разведений в диапазоне от 10 до 0,01 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч на льду. Клетки центрифугировали один раз, супернатант удаляли, и клетки дважды промывали 150 мкл буфера для FACS. Добавляли 50мкл разведенного 1:400 антитела козы к IgG человека, меченного PE (Invitrogen), и

инкубировали в течение 30 минут на льду в темноте. После добавления буфера для FACS клетки центрифугировали один раз, супернатант удаляли, и клетки дважды промывали буфером для FACS. Клетки анализировали на проточном цитометре FACSCanto (Becton and Dickinson) в режиме HTS. Связывание антител с клетками оценивали путем определения средней интенсивности флуоресценции (MFI) популяции окрашенных клеток. Считали, что антитела связываются со своей мишенью, если MFI по меньшей мере в пять раз превышала MFI той же популяции клеток, окрашенных с применением несвязывающего антитела (нацеленного на столбнячный анатоксин) (отрицательного контроля).

Биннинг специфических в отношении huLAG-3 Fab-фрагментов, присутствующих в бивалентном IgG LAG-3xLAG-3, по специфичности к домену huLAG-3-связывающих клонов в формате бивалентного IgG осуществляли путем анализа на специфичность к домену методом FACS на клетках HEK293T, которые были подвергнуты временной трансфекции пятью различными экспрессионными конструкциями pIRES-Neo3, кодирующими гибриды LAG-3, содержащие последовательности мыши/человека, экспрессионной конструкцией IRES-Neo3, кодирующей полноразмерный LAG-3 мыши (см. ниже аминокислотные последовательности вставок) или экспрессионной конструкцией pIRES-Neo3\_huLAG-3, используемой для получения клеток Freestyle 293F, стабильно экспрессирующих huLAG-3 (таблица 1). Тот же протокол FACS использовали при выполнении анализа специфичности панели антител, как описано выше. Для создания гибридных конструкций внеклеточный домен LAG-3 мыши и человека был разделен на 5 доменов; 4 Ig-подобных домена на основе эталонных последовательностей Uniprot P18627 (huLAG-3) и Q61790 (moLAG-3) и 1 шарнирный домен от конца Ig-подобного домена 4 до трансмембранного домена. Следующие аминокислотные последовательности вставок были клонированы в pIRES-Neo3 (фигура 4) с использованием сайтов рестрикции NheI/EcoRI. Текст, выделенный жирным шрифтом, представляет собой сигнальный пептид. Подчеркнутый текст представляет собой последовательность, идентичную LAG-3 человека. Текст, выделенный курсивом, представляет собой последовательности трансмембранного и внутриклеточного доменов.

*Аминокислотная последовательность полноразмерной вставки LAG-3 мыши.*

**MREDLLLGFLLGLLWEAPVVSSGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCKSLKSPNL**  
DPNFLRRGGVIWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGG  
LRSGRQPLHPHVQLEERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCS  
5 LRLRVGQASMIASPSGVLKLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQNRVPVYNS  
PRHFLAETFLLLPQVSPLDSGTWGCVLTYRDGFNVSITYNLKVLGLEPVAPLTV  
YAAEGSRVELPCHLPPGVGTPSLLIAKWTPPGGGPELPVAGKSGNFTLHLEAVG  
LAQAGTYTCSIHLQGGQLNATVTLAVITVTPKSFGLPGSRGKLLCEVTPASGKER  
FVWRPLNNSRSCPGPVLEIQEARLLAERWQCQLYEGQRLLGATVYAAESSGA  
10 HSARRISGDLKGGHLVVLILGALSFLLVAGAFGFHWWRKQLLLRRFSALEHG  
**IQPFPAQRKIEELERELETEMGQEPEPEPEPQLEPEPRQL**

*Аминокислотная последовательность химерной вставки А то/huLAG-3 (Полноразмерная последовательность LAG-3 мыши, в которой сигнальный пептид и Ig-подобный домен 1 мыши заменены сигнальным пептидом и Ig-подобным доменом 1 человека).*

**MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGA**EVVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQ  
**DL**SLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSV  
**GPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRA**  
**LSCRLRLRLGQASMIASPSGVLKLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQNRVP**  
20 VYNSPRHFLAETFLLLPQVSPLDSGTWGCVLTYRDGFNVSITYNLKVLGLEPVA  
PLTVYAAEGSRVELPCHLPPGVGTPSLLIAKWTPPGGGPELPVAGKSGNFTLHL  
EAVGLAQAGTYTCSIHLQGGQLNATVTLAVITVTPKSFGLPGSRGKLLCEVTPAS  
GKERFVWRPLNNSRSCPGPVLEIQEARLLAERWQCQLYEGQRLLGATVYAAE  
SSSGAHSARRISGDLKGGHLVVLILGALSFLLVAGAFGFHWWRKQLLLRRFS  
25 **ALEHGIQPFPAQRKIEELERELETEMGQEPEPEPEPQLEPEPRQL**

*Аминокислотная последовательность химерной вставки В то/huLAG-3 (Полноразмерная последовательность LAG-3 мыши, в которой Ig-подобный домен 2 мыши заменен Ig-подобным доменом 2 человека).*

30 **MREDLLLGFLLGLLWEAPVVSSGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCKSLKSPNL**  
DPNFLRRGGVIWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGG  
LRSGRQPLHPHVQLEERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCS  
LRLRVGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFNRNRGQGRVPVR

ESPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDFNVSITYNLKVLGLEPVAPL  
TVYAAEGSRVELPCHLPPGVGTPSLLIAKWTPPGGGPELPAVAGKSGNFTLHLEA  
VGLAQAGTYTCSIHLQGGQLNATVTLAVITVTPKSFGLPGSRGKLLCEVTPASG  
KERFVWRPLNLSRSCPGPVLEIQEARLLAERWQCQLYEGQRLLGATVYAAES  
5 SSGAHSARRISGDLKGGHLVLVLILGALSFLLVAGAFGFHWWRKQLLLRRFSA  
LEHGIQPFPAQRKIEELERELETEMGQEPEPEPEPQLEPEPRQL

*Аминокислотная последовательность химерной вставки C то/huLAG-3  
(Полноразмерная последовательность LAG-3 мыши, в которой Ig-подобный  
10 домен 3 мыши заменен Ig-подобным доменом 3 человека).*

**MREDLLLGFLLLGLLWEAPVVSSGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCKSLKSPNL**  
DPNFLRRGGVIWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGG  
LRSGRQPLHPHVQLEERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALS  
LRLRVGQASMIASPSGVKLKLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQNRVPVYNS  
15 PRHFLAETFLLLPQVSPLDSGTWGCVLTYRDFNVSIMYNLTVLGLEPPTPLTV  
YAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDV  
SQAQAGTYTCHIHLQEQQLNATVTLAVITVTPKSFGLPGSRGKLLCEVTPASGK  
ERFVWRPLNLSRSCPGPVLEIQEARLLAERWQCQLYEGQRLLGATVYAAESS  
GAHSARRISGDLKGGHLVLVLILGALSFLLVAGAFGFHWWRKQLLLRRFSALE  
20 HGIQPFPAQRKIEELERELETEMGQEPEPEPEPQLEPEPRQL

*Аминокислотная последовательность химерной вставки D то/huLAG-3  
(Полноразмерная последовательность LAG-3 мыши, в которой Ig-подобный  
25 домен 4 мыши заменен Ig-подобным доменом 4 человека).*

**MREDLLLGFLLLGLLWEAPVVSSGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCKSLKSPNL**  
DPNFLRRGGVIWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGG  
LRSGRQPLHPHVQLEERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALS  
LRLRVGQASMIASPSGVKLKLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQNRVPVYNS  
PRHFLAETFLLLPQVSPLDSGTWGCVLTYRDFNVSITYNLKVLGLEPVAPLTV  
30 YAAEGSRVELPCHLPPGVGTPSLLIAKWTPPGGGPELPAVAGKSGNFTLHLEAVG  
LAQAGTYTCSIHLQGGQLNATVTLAITVTPKSFSGPSLGKLLCEVTPVSGQER  
FVWSSLDTPSQRSESGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGATVYAAESS

GAHSARRISGDLKGGHLVVLVILGALSFLLVAGAFGFHWWRKQLLLRRFSALE  
HGIQPFPAQRKIEELERELETEMGQEPEPEPEPQLEPEPRQL

Аминокислотная последовательность химерной вставки E то/huLAG-3  
5 (Полноразмерная последовательность LAG-3 мыши, в которой Ig-подобный домен 4 мыши, содержащий шарнирную область до трансмембранной последовательности, заменен Ig-подобным доменом 4 человека, содержащим шарнирную область).

**MREDLLLGFLLGLLWEAPVVSSGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCSLKSPNL**  
10 DPNFLRRGGVIWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGG  
LRSGRQPLPHVQLEERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALS  
LRLRVGQASMIASPSGVCLKLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQNRVPVYNS  
PRHFLAETFLLLPQVSPLDSGTWGCVLTYRDGFNVSITYNLKVLGLEPVAPLTV  
YAAEGSRVELPCHLPPGVGTPSLLIAKWTPPGGGPELPVAGKSGNFTLHLEAVG  
15 LAQAGTYTCSIHLQGGQLNATVTLAITVTPKSFSGPSLGKLLCEVTPVSGQER  
FVWSSLDTPSQRSESGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAVYFTELSS  
PGAQRSGRAPGALPAGHLVVLVILGALSFLLVAGAFGFHWWRKQLLLRRFSAL  
EHGIQPFPAQRKIEELERELETEMGQEPEPEPEPQLEPEPRQL

20 В таблицах 3 и 4 показаны бины, к которым был отнесен каждый бивалентный IgG LAG-3xLAG-3 на основе специфичности к домену.

## 25 **Эталонные антитела**

Антитела, которые ингибируют функцию PD-1 и LAG-3, известны в данной области техники. Информация, касающаяся антитела ниволумаба против PD-1, была получена на основе информации, раскрытой в CA2607147, и были экспрессированы в клетках CHO-S. Антитело 25F7 против LAG-3 было вновь  
30 получено на основе информации, представленной в WO 2010/019570A2 (Medarex. Inc), путем реклонирования в остов IgG1 и экспрессировано в клетках 293F Freestyle.

### Репортерный анализ блокирования LAG-3

Репортерные анализы блокирования LAG-3 проводили с помощью репортерного анализа блокирования LAG-3, разработанного Promega, в котором применяется двухклеточная система на основе клеток Raji, экспрессирующих ГКСЦ, и репортерной линии клеток Jurkat/NFAT-RE, сверхэкспрессирующей LAG-3. Активация клеток Jurkat регулируется посредством суперантигена SED, энтеротоксинов D стафилококка. Эффекторные клетки Jurkat, экспрессирующие LAG-3, были предоставлены Promega в формате модели культивирования клеток (Cell Propagation Model, CPM), и их культивировали в среде RPMI 1640 (с добавлением L-глутамина, 10 % инактивированной нагреванием ЭБС, 100 мкМ заменимых аминокислот в среде MEM, 1 мМ пирувата натрия, 200 мкг/мл гигромицина и 500 мкг/мл G418). Клетки Raji культивировали в среде RPMI 1640 (с добавлением L-глутамина и 10 % инактивированной нагреванием ЭБС). Клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста, собирали и ресуспендировали в среде RPMI 1640 (содержащей 1 % инактивированной нагреванием ЭБС) в концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/мл в случае клеток Raji и  $4 \times 10^6$  клеток/мл в случае клеток Jurkat/NFAT-RE. Далее, 25 мкл суспензии клеток Jurkat/NFAT-RE добавляли во внутренние лунки 96-луночного планшета (Corning, номер по каталогу 3917). Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл исследуемого антитела в среде для анализа (RPMI 1640, содержащая 1 % ЭБС) в серийном разведении (начальная концентрация 25 мкг/мл). Каждый планшет содержал серийное разведение отрицательного (PG1337) и положительного контрольного антитела 25F7, которые служили эталонными контролями. Наконец, добавляли 25 мкл смеси 1:1 клеток Raji и (100 нг/мл) SED (Toxin Technologies). Планшеты инкубировали в течение 6 ч при 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> при относительной влажности 95 %. На следующий день добавляли 40 мкл люциферазы (Bio-Glo Luciferase Assay System, номер по каталогу G794L) и количественно определяли активность люциферазы с помощью многофункционального микропланшетного ридера BioTek Synergy 2. Антитела к LAG-3 подвергали скринингу в бивалентном формате для определения их способности блокировать LAG-3 (фигура 11).

### Репортерный анализ блокирования PD-1/PD-L1

Используемый репортерный анализ блокирования PD-1/PD-L1 был разработан Promega, и основан на двухклеточной системе: клетки CHO, экспрессирующие PD-L1, и активатор Т-клеток, и репортерная линия клеток Jurkat / NFAT-RE, сверхэкспрессирующая PD-1. Репортерный анализ  
5 блокирования PD-1/PD-L1 проводили с использованием формата «размораживания и использования» («thaw и use») анализа от Promega. Клетки, экспрессирующие PD-L1 (номер по каталогу C187103), размораживали в 14,5 мл среды для восстановления клеток (DMEM/F12, содержащая 10% ЭБС). Затем 50 мкл суспензии клеток добавляли во внутренние лунки 96-  
10 луночного планшета с половинным объемом лунок (Corning, номер по каталогу 3688). Планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, относительной влажности 95%. На следующий день культуральную среду удаляли и в каждую лунку добавляли 20 мкл исследуемого антитела в среде для анализа (RPMI 1640, содержащая 4% ЭБС) в серийном разведении  
15 (начальная концентрация 10 мкг/мл). Каждый планшет содержал серийное разведение отрицательного (контр. АТ) и положительного контрольного антитела (ниволумаба), которые служили эталонными контролями. Эффекторные клетки PD-1 (номер по каталогу C187105) размораживали в 5,9 мл среды для анализа, и в каждую лунку добавляли 20 мкл суспензии клеток.  
20 Планшеты инкубировали в течение 6 ч или в течение ночи при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, относительной влажности 95%. На следующий день добавляли 40 мкл люциферазы (Bio-Glo Luciferase Assay System, номер по каталогу G794L) и количественно определяли активность люциферазы с помощью многофункционального микропланшетного ридера BioTek Synergy 2.  
25 Эффективность определяли как активность люциферазы в сравнении с ее активностью при применении отрицательного контрольного антитела.

### **Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК)**

Цельную кровь человека получали из лейкоцитарных пленок (Sanquin) и  
30 разбавляли 1:1 ФСБ. Пробирки Leucosep (Greiner Bio-One, номер по каталогу 227 290) заполняли 17,5 мл реагента Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, номер по каталогу 17-1440-02), нагретого до комнатной температуры (КТ). Ficoll-Paque Plus осаждали путем центрифугирования в течение 30 секунд при 1000 x g при

КТ. Сверху наливали 30 мл разбавленной цельной крови. Пробирки центрифугировали при  $1000 \times g$  в течение 10 минут при КТ, и находящиеся на поверхности раздела МКПК собирали, дважды промывали в ФСБ и ресуспендировали в 250 мкл ФСБ. МКПК подсчитывали, доводили их  
5 концентрацию до  $1 \times 10^6$ /мл в среде для культивирования тканей (DMEM с 10 % ЭБС) и замораживали путем добавления равного объема ледяной среды для замораживания (80 % культуральной среды/20 % ДМСО). Клетки хранили в аликвотах объемом 1 мл при  $-150^\circ C$  до дальнейшего использования.

#### 10           **Анализ с применением энтеротоксина В стафилококка (SEB)**

Функциональную активность биспецифических антител определяли с использованием МКПК, стимулированных энтеротоксином В стафилококка (SEB). SEB специфически активирует Т-клетки, экспрессирующие цепи  $V\beta 3$  и  $V\beta 8$  рецептора Т-клеток. МКПК от 3 доноров размораживали, промывали,  
15 подсчитывали и ресуспендировали в культуральной среде (RPMI 1640 с добавлением 10 % инактивированной нагреванием ЭБС) до концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/мл. Клетки высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном ( $2 \times 10^5$  клеток/луночка) в присутствии SEB (2000 или 125 нг/мл). Добавляли серийные разведения антител, начиная с 20 мкг/мл. Каждый планшет содержал серийное  
20 разведение отрицательного (контр. АТ) и положительного контрольного антитела (ниволумаба и антитела 25F7 к LAG-3), которые служили эталонными контролями. Клетки стимулировали в течение 3 дней при  $37^\circ C$ , 5 %  $CO_2$  при относительной влажности 95 % перед анализом на секрецию цитокинов и/или экспрессию антигенов на поверхности клеток.

25

#### **Анализ содержания цитокинов**

ELISA: После стимуляции Т-клеток или МКПК в различные моменты времени планшеты центрифугировали и среду удаляли. Содержание цитокинов определяли с помощью AlphaLISA в соответствии с инструкциями производителя  
30 (Perkin Elmer). Концентрации рассчитывали с помощью стандартной кривой.

Анализ luminex: Другой метод, используемый для определения выработки цитокинов *in vitro*, представлял собой анализ luminex, разработанный eBioscience.



Содержание ИЛ-2 определяли в супернатантах культуральной среды в соответствии с инструкциями производителя. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения для анализа eBioscience.

## 5 Скрининг панели антител к PD-1

VH из панели антител к PD-1 получали в 24-луночном формате и тестировали в качестве бивалентных антител в полулогарифмическом серийном титровании (начальная концентрация 10 мкг/мл) в репортерном анализе блокирования PD-1/PD-L1 *t* для ранжирования антител по 10 эффективности блокирования в сравнении с ниволумабом. На основе данных об активности из панели антител к PD-1 выбирали антитела для последующего биспецифического скрининга PD1xLAG-3. Активность выбранных кандидатов в репортерном анализе представлена в таблице 2. Панель Fab к PD-1 состояла из 15 вариантов функциональной активности в двух кластерах антител, а именно А и В.

### Скрининг панели антител PD1xLAG-3

VH из панели антител к PD-1 и LAG-3 были реклонированы в нагруженные сконструированные Fc-молчащие векторы таким образом, что при экспрессии 20 тяжелых цепей антитела происходила усиленная гетеродимеризация тяжелых цепей, что приводило к образованию биспецифических антител после трансфекции. Fab-фрагменты к PD-1 клонировали в векторе MV1625, тогда как Fab-фрагменты к LAG-3 реклонировали в векторе MV1624. Пятнадцать Fab-фрагментов к LAG-3, представляющих различные бины (таблица 3), комбинировали с 25 тремя фрагментами к PD-1 (MF6226, MF6930 и MF6256), демонстрирующими диапазон активности в отношении блокирования PD-1 (таблица 2). Биспецифические антитела LAG-3xPD-1 (таблица 4), их бивалентные исходные антитела к LAG-3 и отрицательные контрольные антитела исследовали на способность активировать Т-клетки с применением серийного разведения SEB (2000 – 500 – 125 – 31 – 8 – 2 30 нг/мл). На фигуре 12 показана активность двух бивалентных антител к LAG-3 по сравнению с антителами LAG-3xPD-1 с различным сродством к PD-1 на МКПК, стимулированных 2 мкг/мл SEB. Активность представлена в виде индекса стимуляции (ИС). Каждое значение для ИЛ-2 сравнивали с отрицательным

контрольным антителом для определения ИС (ИС для ИЛ-2, равный 2, означает увеличение выработки ИЛ-2 на 200 % по сравнению с контрольным антителом). Биспецифические антитела LAG-3xPD-1 индуцировали большее количество ИЛ-2 в анализе с применением SEB по сравнению с бивалентными антителами к LAG-3.

5 Выбранные биспецифические антитела, представляющие каждый бин, впоследствии подвергали скринингу в серийных разведениях в анализах с применением SEB, при выполнении которых МКПК стимулировали 2 мкг/мл SEB (фигура 13). Большинство биспецифических антител LAG-3xPD-1 были более эффективными, чем исходное бивалентное антитело к PD-1 или эталонное антитело к LAG-3, в

10 отношении индукции высвобождения ИЛ-2. Биспецифические антитела LAG-3xPD-1, которые связывают домены, отличные от связываемых взаимодействующим доменом ГКГ класса II, то есть домены 3 и 4, были также более эффективными, чем исходное бивалентное антитело к PD-1 или эталонное антитело к LAG-3, в отношении индукции высвобождения ИЛ-2.

15

#### **Пример 4. Скрининг панели антител PD1xLAG-3**

Fab-фрагмент антитела 25F7, антитела к LAG-3, клонировали и получали в формате IgG1 человека в виде PG7431, как описано выше в примере 3. Вариабельный домен 25F7 также клонировали в формате моновалентного

20 антитела к LAG-3 в виде PB22283, в котором первое плечо содержало вариабельный домен 25F7, а второе плечо содержало вариабельный домен, связывающий столбнячный токсин (MF1337). Связывание этих антител показано на фигуре 14. PG1337P300 представлял собой контрольное антитело, для которого ожидалось отсутствие связывания с клетками и наличие связывания со

25 столбнячным токсином.

Связывание этих антител сравнивали с бивалентным антителом PG7116, которое содержало два вариабельных домена с MF7116, и форматом моновалентного антитела к LAG-3, в котором первое плечо содержало вариабельный домен MF7116, а второе плечо содержало вариабельный домен, содержащий MF1337,

30 связывающий столбнячный токсин.

Связывание антител в бивалентной форме является аналогичным, что можно увидеть при сравнении связывания PG7431 с PG7116 на левой панели, где

антитела титровали на клетках Freestyle 293F\_huLAG-3 (293FF LAG-3). Связывание моновалентного переменного домена 25F7 аналогично связыванию в бивалентной форме (ср. PB22283 с PG7431 на правой панели фигуры 15, где антитела титровали на активированных Т-клетках). Связывание моновалентного  
5 переменного домена с MF7116 снижено по сравнению с бивалентным антителом PG7116 (ср. PB21775 с PG7116, левая панель фигуры 15).

Соответственно, IgG к LAG-3 исследовали в анализах связывания в бивалентном и моновалентном форматах и сравнивали с антителом 25F7 (PG7431). Антитела к LAG-3 в бивалентном формате демонстрировали кривые связывания,  
10 аналогичные кривым для эталонных антител. Моновалентные антитела LAG-3×ТТ, обычно, демонстрировали сниженную связывающую активность по сравнению с бивалентными молекулами.

С целью дополнительной характеристики биспецифических антител PD-1×LAG-3 была создана панель биспецифических антител PD-1×LAG-3, представленная в  
15 таблице 5, и функционально исследована в репортерном анализе PD-1×LAG-3.

В репортерном анализе PD1/Lag3 эффекторные клетки Jurkat, описанные выше (модифицированные для сверхэкспрессии PD-1 и LAG-3), и клетки-мишени Raji (модифицированные для сверхэкспрессии PD-L1), SED и антитела к LAG-3 смешивают и инкубируют. Линия клеток Jurkat содержит репортерный ген  
20 люциферазы, который может активироваться посредством сигнального пути NFAT (ядерного фактора активированных Т-клеток). Взаимодействие ГКГП с LAG-3 будет ингибировать этот сигнал, а блокирование взаимодействия ГКГП/LAG-3 с помощью биологических агентов может высвободить этот сигнал, так же как и блокирование сигнала PD-1/PD-L1 с помощью биологических  
25 агентов, действующих рецептор PD-1.

Биспецифические антитела PD-1 x LAG-3 титровали в репортерном анализе PD-1/LAG-3, и активность сравнивали с бивалентным антителом 25F7 к LAG-3 и бивалентным антителом к PD-1 (оба описаны выше в примере 3). Биспецифические антитела облегчали активацию клеток Jurkat при значительно  
30 более низких концентрациях, чем моноспецифические бивалентные контрольные антитела. Наблюдаемая активность была сравнима с активностью, достигаемой при объединении двух контрольных антител, несмотря на то, что

биспецифические антитела являются моновалентными для каждой из мишеней, что, как показано выше, может снижать связывание моновалентного антитела к LAG-3 с LAG-3 (см. фигуру 16).

Иллюстративный пример скрининга с помощью репортерного анализа  
5 представлен на фигуре 17: показаны различные комбинации переменных доменов, связывающихся с LAG-3 и PD-1.

На панели А показаны биспецифические антитела с переменными доменами, которые связывают PD-1 и LAG-3 и которые блокируют связывание природных лигандов с рецептором (соответственно PD-L1/L2 и ГКГ класса II).  
10 Конкретные биспецифические антитела, показанные на панели А, обеспечивают активацию репортерных клеток Jurkat по сравнению с эталоном, содержащим два моноспецифических бивалентных антитела к PD-1 и 25F7. На панели В показаны биспецифические антитела, содержащие тот же переменный домен, связывающий LAG-3, но в данном случае в комбинации с переменным доменом,  
15 который связывает PD-1, но не блокирует передачу сигнала PD-1/PD-L1. Ясно, что активность биспецифического антитела в панели А опосредована по меньшей мере плечом, которое связывает PD-1 и которое блокирует передачу сигнала PD-1/PD-L1. На панели С показан обратный пример, плечо из панели А, связывающееся с PD-1, в сочетании с переменными доменами, связывающими  
20 LAG-3, которые связываются, но не блокируют передачу сигнала ГКГ II/LAG-3. Результаты показывают, что активность биспецифического антитела, показанного на панели А, опосредована по меньшей мере плечом, связывающим LAG-3, которое блокирует связывание ГКГ класса II с LAG-3.

На фигуре 18 кратко представлены результаты репортерного скрининга и  
25 показана площадь под кривой относительно контроля.

Анализы с применением SEB выполняли, как описано в примере 3. На фигуре 19 представлен иллюстративный пример анализа титрования с применением SEB для биспецифических антител PD-1/LAG, описанного в настоящем документе. На фигуре показана активность двух бивалентных антител  
30 к LAG-3 по сравнению с антителами PD-1xLAG-3 с различным сродством к PD-1 на МКПК, стимулированных 2 мкг/мл SEB.

На панели А показан результат для биспецифических антител с переменными доменами, которые связывают PD-1 и LAG-3 и которые блокируют связывание природных лигандов с соответствующими рецепторами. Эти антитела облегчают выработку ИЛ-2 в МКПК. На панели В показаны  
5 результаты для биспецифических антител PD-1xLAG-3, содержащих переменный домен, который связывает PD-1, но не блокирует связывание PD-L1 с рецептором. Переменный домен, связывающийся с LAG-3, блокирует связывание LAG-3 с ГКГ II. На панели С показаны результаты для  
10 биспецифических антител с переменным доменом, который связывает LAG-3, но не блокирует связывание LAG-3 с ГКГ II. Переменный домен, который связывает PD-1, блокирует связывание PD-1 с PD-L1.

Краткий результат скрининга биспецифической панели, представленной в таблице 5, показан на фигуре 20. Переменные домены, связывающиеся с PD-1, были ранжированы сверху вниз в зависимости от активности бивалентного  
15 антитела в репортерном анализе (верхняя панель) и анализе с применением SEB с участием 2 доноров (средняя и нижняя панели), при этом переменный домен, связывающийся PD-1 с самой высокой активностью в репортерном анализе, находится сверху. Переменные домены, связывающиеся с LAG-3, были  
20 ранжированы от высокой до низкой активности в репортерном анализе (верхняя панель) и анализе с применением SEB с участием 2 доноров (средняя и нижняя панели), при этом переменный домен с самой высокой активностью в формате бивалентного антитела находится в первом столбце.

Плечи, связывающиеся с PD-1, в биспецифических антителах PD-1xLAG3, были ранжированы по тому, сколько раз данное плечо в биспецифических PD-1xLAG3  
25 появлялось в верхних 15 % биспецифических антител на основе процента площади под кривой по сравнению с положительным контролем в: 1) репортерном анализе; 2) скрининге с применением SEB с участием донора 1 (данные по ИЛ-2); 3) скрининге с применением SEB с участием донора 2 (данные по ИЛ-2). См. фигуры 21 и 23. Это ранжирование показано в двух самых правых  
30 столбцах фигуры 23.

Можно видеть, что клоны с плечами, связывающимися с PD-1, содержащими переменный домен с VH MF6974 или VH MF6076, были ранжированы наиболее

высоко на основе вышеуказанных критериев, при этом большинство содержали плечи, связывающиеся с LAG-3, в репортерном анализе и анализе с применением SEB.

5 Тот же подход был использован для биспецифических антител, несущих специфические в отношении LAG-3 плечи, которые также оценивали по тому, сколько раз они присутствовали в верхних 15 % (плечи, имеющие одинаковую оценку, в верхних 15 %, далее ранжировали с использованием оценки по верхним 25 %). Окончательный рейтинг показан на фигуре 22.

10 Несколько бивалентных, моноспецифических антител (в формате IgG), которые связывают домен 1 LAG3, согласно описанным выше экспериментам по биннингу гибрида LAG-3 мышь/человек, получили наивысшую оценку на основе процента площади под кривой для положительного контроля в репортерном анализе. Однако биспецифические антитела, связывающие PD1 и LAG3, которые имели наивысший ранг на основе репортерных анализов и в анализе с применением SEB  
15 при индукции ИЛ-2, являлись содержащими домен 2 (как определено в соответствии с экспериментами с использованием гибрида LAG-3 мышь/человек). Этот результат кратко представлен на фигуре 24. Из восьми находящихся сверху биспецифических антител, ранжированных на основании репортерного анализа PD1/LAG3 и анализа с применением SEB, шесть содержали плечо,  
20 связывающееся с LAG3, которое связывало домен 2 (как определено в соответствии с экспериментами с использованием гибрида LAG-3 мышь/человек). Активность плеч, связывающихся с LAG3 (на основе процента площади под кривой для контроля), для этих 6 биспецифических антител, определенная с помощью репортерного анализа блокирования LAG3 в бивалентном  
25 моноспецифическом формате, была, обычно, ниже, чем у плеч, связывающихся с LAG3, исследованных в том же формате, для которых определяли связывание домена 1.

## Пример 5

### **Биспецифические антитела к PD-1 x LAG-3 усиливают продукцию IFN $\gamma$ CD14+ Т-клетками в реакции смешанной культуры лимфоцитов.**

5 Анализ реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ) обычно используют для понимания влияния антител на активацию и пролиферацию Т-клеток. Такие исследования помогают понять, будут ли такие соединения влиять на способность Т-клеток вызывать ответ в микроокружении опухоли. В настоящем примере авторы изобретения использовали протокол аллогенной  
10 СКЛ с незрелыми ДК для определения способности биспецифических антител к PD-1 x LAG-3 усиливать продукцию IFN $\gamma$  CD14+ Т-клетками по сравнению с эталонными антителами. Реактивность Т-клеток количественно оценивали путем определения содержания IFN $\gamma$  в супернатанте культуры.

С этой целью мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК)  
15 человека от здоровых доноров получали из лейкоцитарных пленок. Незрелые дендритные клетки моноцитарного происхождения (Мо-ДК) получали путем выделения CD14+ клеток (EasySep Stemcell, лот № 16C69672) с использованием магнитно-активированной сортировки клеток (MACS) и культивирования их в среде для дифференцировки в течение семи дней.  
20 Иммунореактивные Т-клетки донора, отличного от того, от которого получали Мо-ДК, готовили из криоконсервированных МКПК в день, когда это было необходимо, с помощью набора для выделения Т-клеток (EasySep Stemcell, лот № 16D70573) с получением свежих Т-клеток. Для обеспечения биологической репликации проводили шесть отдельных реакций СКЛ.

25 Для анализа  $1 \times 10^4$  незрелых Мо-ДК культивировали совместно с  $1 \times 10^5$  CD4+ Т-клеток в течение 4 дней в присутствии или в отсутствие исследуемого антитела в конечной концентрации 10 мкг/мл. Культивирование выполняли в трех повторностях. В конце периода культивирования супернатанты собирали и оценивали на содержание IFN $\gamma$  с помощью ELISA (R&D BioTechne, лот №  
30 342687) в соответствии с инструкциями производителя со считыванием ОП в планшетах при длине волны 450 нм.

Результаты

Исследование СКЛ включало экспериментальные группы биспецифических антител к LAG3/PD1 (PB15307 = MF7137 (LAG3) и MF6930 (PD1)) и контрольную группу с изотипами LAG-3 (моноспецифическое антитело против LAG-3 (бивалентное моноспецифическое антитело PG7431), столбняка и mIgG1). Также были включены контрольная группа отдельных клеток и группа контроля-носителя.

Культивирование выполняли в трех повторностях с получением технических репликатов. В конце 4-дневного периода культивирования супернатант собирали и проводили ELISA для оценки влияния антител на продукцию IFN- $\gamma$  в соответствии с инструкциями производителя со считыванием ОП в планшетах при длине волны 450 нм.

CD14+ клетки сортировали в 0 день и культивировали в течение 7 дней, незрелые ДК использовали на 7 день, а зрелые ДК получали путем культивирования в течение еще 3 дней в среде для созревания. Позитивность по CD14 оценивали в 0 день для подтверждения чистоты исходного сорта, и в незрелых и зрелых ДК на 7 день и 10 день, соответственно, для подтверждения отрицательной регуляции CD14 в качестве маркера дифференцировки в Мо-ДК (данные не приведены). Маркеры жизнеспособности и активации (CD80, CD83 и CD86) также оценивали как у незрелых, так и зрелых ДК для подтверждения дифференцировки и созревания. Мо-ДК (незрелые или зрелые) культивировали с иммунореактивными Т-клетками в течение 4 дней, затем собирали супернатант и проводили ELISA для оценки влияния исследуемых антител на продукцию IFN- $\gamma$ . В зрелых MLR (mMLR) вариативность доноров была такова, что указанные данные были нормированы к контролю с применением носителя для каждого донора (необработанные данные и нормализованные).

Результаты теста представлены на фигуре 15. Выработка IFN- $\gamma$  CD14+ Т-клетками в СКЛ была значительно выше при применении биспецифического антитела, специфического в отношении PD-1/LAG-3, чем продукция в контроле и при применении суррогатного моноспецифического антитела к LAG3.



**Таблица 1:** Экспрессионные конструкции для каждой мишени, которые применяли для иммунизации ДНК (на основе вектора pVAX1) и для получения стабильных линий клеток Freestyle 293F или CHO-S (на основе вектора pIRES-neo3 или схожих)

<b>Мишень</b>	<b>Векторы</b>	<b>Стабильная линия клеток</b>
PD-1	pVAX1_huPD-1 pIRES-neo3_huPD-1 pIRES-neo3_maPD-1	н/п CHO-S_huPD-1 CHO-S_maPD-1
LAG-3	pVAX1_huLAG-3 pVAX1_raLAG-3 pIRES-neo3_huLAG-3 pIRES-neo3_maLAG-3	н/п н/п Freestyle 293F_huLAG-3 Freestyle 293F_maLAG-3

hu = человек, ma = макак, ra = крыса, н/п = не применимо

## 10 **Таблица 2**

Функциональная активность Fab-фрагментов PD-1, определенная с помощью репортерного анализа блокирования PD-1/PD-L1 бивалентным антителом в сравнении с положительным контролем ниволумабом. Исследовали варианты того же кластера (B), который демонстрировал различную PD-1 блокирующую активность.

<b>Клон</b>	<b>CDR3</b>	<b>Кластер</b>	<b>% от активности положит. контроля</b>
MF6226	GGYSGYGGDSFDL	A	47,77614647
MF6256	GTVEATLLFDF	B	57,85260834
MF6930	GTVEATLLFDY	B	51,50445453

**Таблица 3.** Панель фрагментов к LAG3, описывающая сортировку на основе профилей FASC, связывания домена и блокирующей активности в отношении LAG3 в составе бивалентного антитела

ID	CDR3H	VH	Bin	Блок LAG-3:
7111	IPLTGEFDY	VH4-59	D1	Да
7165	GGTYYYGSGSYTLDY	VH1-24	D1	Да
7116	DGDNDVFDI	VH3-30	D1	Да
7100	ERGWDVFDI	VH3-30	D1	Да
7137	GGTYYYGSGSYTLDF	VH1-24	D1	Да
7518	DGSGWDDFDY	VH1-18	D1+D4	Да
7134	EPNWGVYFDY	VH7-4-1	D2	Да
7146	DREVGAIYFDY	VH1-69	D2	Да
7142	ERDIGSLYFDS	VH1-69	D2	Да
7185	DREMFTLYFFDQ	VH1-69	D2	Да
7136	DSTYYTSGSYSVFDY	VH3-23	D2	Нет
7118	VPAAATPSGTYYWIFDL	VH3-23	D3	Нет
7443	DTSTWQRGGYKAFDY	VH3-23	D3	Нет
7167	DRGYDYSGSYHNWFDP	VH3-23	D4	Нет
7515	RPGPALGD LDS	VH1-18	D4	Нет
5 7444	DTGQSWSNYYHAFDY	VH3-23	hu/мо перекрестно-реакт. D3	Нет

**Таблица 4.** Панель плечей Fab LAG-3, описывающая биннинг на основе профилей FACS и связывания доменов.

ID	CDR3H	VH	Bin
7096	DLLYKWNYYVEGFDI	VH4-59	D1
7097	DLLYKWNYYVEGFDI	VH4-59	D1
7106	DKAVAGLYYFDS	VH1-69	D2
7118	VPAAATPSGTYYWIFDL	VH3-23	D3
7120	ERELGALYAFDI	VH1-69	D2
7133	DRETGTLYYFDY	VH1-69	D2
7139	DRAIGTLYYFDY	VH1-69	D2
7144	DRDSGGLYFDS	VH1-69	D2
7524	GSILAAQMWGDI	VH1-18	hu/мо перекрестно-реакт. – мо 1

10

**Таблица 5. Номера РВ и их композиция MF**

	<b>PD-1</b>		
<b>LAG-3</b>	MF6930	MF6226	MF6256
MF7111	PB15292	PB16336	PB15254
MF7116	PB15296	PB16367	PB15258
MF7100	PB15289	PB16369	PB15251
MF7137	PB15307	PB16365	PB15269
MF7518	PB15383	PB16364	PB15347
MF7134	PB15305	PB16337	PB15267
MF7146	PB15313	PB16338	PB15275
MF7142	PB15311	PB16339	PB15273
MF7165	PB15317	PB16366	PB15279
MF7185	PB15363	PB16340	PB15359
MF7136	PB15306	PB16341	PB15268
MF7118	PB15297	PB16342	PB15259
MF7443	PB15369	PB16343	PB15333
MF7444	PB15403	PB16346	PB15393
MF7167	PB15318	PB16344	PB15280
MF7515	PB15380	PB16345	PB15344

### Формула изобретения

1. Способ предотвращения опосредуемому белком запрограммированной  
5 гибели клеток 1 (PD-) и активатором лимфоцитов 3 (LAG-3), ингибированию в PD-1-положительной и/или LAG-3-положительной клетке, включающий приведение указанной клетки в контакт с антителом или его функциональной частью, производным и/или аналогом, которые содержат:
- переменный домен, который может связываться с внеклеточной  
10 частью PD-1, и
  - переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3, с ингибированием опосредуемой PD-1 и/или LAG-3 активности в указанной клетке.
- 15 2. Способ по п. 1, причем связывание указанного связывающего PD-1 переменного домена с PD-1 блокирует связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2.
3. Способ стимулирования формирования, стабильности или активности иммунологического синапса, включающий обеспечение системы, которая  
20 содержит по меньшей мере две клетки, способные связываться друг с другом через иммунологический синапс, и введение в указанную систему антитела или его функциональной части, производного и/или аналога, которые содержат:
- переменный домен, который может связываться с внеклеточной  
25 частью PD-1, и
  - переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3,
- тем самым стимулируя формирование, стабильность или активность иммунологического синапса между указанными по меньшей мере двумя  
30 клетками.
4. Антитело или его вариант, содержащее(ий) переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1, и переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3.

5. Антитело или его вариант по п. 4, причем переменный домен, который связывается с PD-1, блокирует связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2.
- 5 6. Антитело или его вариант по пп. 4 или 5, причем указанный переменный домен, который связывается с LAG-3, связывается с внеклеточным доменом 1, 2, 3 или 4 LAG-3, предпочтительно доменом 1 или доменом 2, предпочтительно доменом 2.
- 10 7. Антитело или его вариант по любому из пп. 4-6, причем переменный домен, который связывается с внеклеточной частью PD-1, определяется как переменная область, которая в случае бивалентного моноспецифического антитела, содержащего два из указанных переменных доменов, которые связываются с PD-1, подавляет обусловленное PD-1/PD-L1 ингибирование в  
15 клетке Jurkat в диапазоне 20-150% по сравнению с ингибированием, достигнутым при применении на клетке Jurkat антитела ниволумаба.
8. Антитело или его вариант по любому из пп. 4-7, содержащее(ий) переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1  
20 и содержит переменную область тяжелой цепи с участком CDR3, содержащим аминокислотную последовательность CDR3 переменной области тяжелой цепи одной из VH, представленных для MF6076; MF6226; MF6236; MF6256; MF6930; MF6932; MF6935; MF6936; MF6972; MF6974 или MF6982 на фигуре 3; предпочтительно MF6256; MF6930; MF6076, MF6974 или MF6226,  
25 предпочтительно MF6930, MF6076 или MF6974.
9. Антитело или его вариант по п. 8, где указанный переменный домен, который связывается с PD-1, содержит переменную область тяжелой цепи с участком CDR1, CDR2 и CDR3, который содержит аминокислотную  
30 последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области тяжелой цепи одной из VH, представленных для MF6076; MF6226; MF6236; MF6256; MF6930; MF6932; MF6935; MF6936; MF6972; MF6974 или MF6982 на фигуре 3; предпочтительно MF6256; MF6930; MF6076, MF6974 или MF6226, предпочтительно MF6930, MF6076 или MF6974.

10. Антитело или его вариант по любому из пп. 4-7, содержащие  
вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1  
и содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную  
5 последовательность вариабельной области тяжелой цепи, представленную для  
MF6076; MF6226; MF6236; MF6256; MF6930; MF6932; MF6935; MF6936;  
MF6972; MF6974 или MF6982 на фигуре 3; предпочтительно MF6256; MF6930;  
MF6076, MF6974 или MF6226, предпочтительно MF6930, MF6076 или MF6974,  
содержащую не более 15, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и  
10 предпочтительно содержащую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен  
аминокислот или комбинацию указанного относительно аминокислотной  
последовательности VH, представленного для MF.

11. Антитело или его вариант по любому из пп. 4-10, содержащее(ий)  
15 вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-  
3 и который содержит вариабельную область тяжелой цепи с участком CDR3,  
содержащей аминокислотную последовательность области CDR3 вариабельной  
области тяжелой цепи, представленную для MF7100; MF7111; MF7116;  
MF7118; MF7134; MF7136; MF7137; MF7142; MF7146; MF7165; MF7167;  
20 MF7185; MF7443; MF7444; MF7515; MF7518; MF7096; MF7097; MF7106;  
MF7120; MF7133; MF7139; MF7144; или MF7524 на фигуре 3, предпочтительно  
MF7518; MF7165; MF7116; MF7096; MF7133; MF7139; MF7524 или MF7137,  
предпочтительно MF7139; MF7524, MF7133, MF7518 или MF7096.

25 12. Антитело или его вариант по п. 11, содержащие вариабельный домен,  
который может связываться с внеклеточной частью LAG-3 и который содержит  
вариабельную область тяжелой цепи с участком CDR1, CDR2 и CDR3, который  
содержит аминокислотную последовательность CDR1, CDR2 и CDR3  
вариабельной области тяжелой цепи одной из VH, представленных для  
30 MF7100; MF7111; MF7116; MF7118; MF7134; MF7136; MF7137; MF7142;  
MF7146; MF7165; MF7167; MF7185; MF7443; MF7444; MF7515; MF7518;  
MF7096; MF7097; MF7106; MF7120; MF7133; MF7139; MF7144; или MF7524 на  
фигуре 3, предпочтительно MF7518; MF7165; MF7116; MF7096; MF7133;

MF7139; MF7524 или MF7137, предпочтительно MF7139; MF7524, MF7133, MF7518 или MF7096.

13. Антитело или его вариант по любому из пп. 4-10, содержащие  
5 переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3 и содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи, представленную для MF7100; MF7111; MF7116; MF7118; MF7134; MF7136; MF7137; MF7142; MF7146; MF7165; MF7167; MF7185; MF7443; MF7444;  
10 MF7515; MF7518; MF7096; MF7097; MF7106; MF7120; MF7133; MF7139; MF7144; or MF7524 на фигуре 3, предпочтительно MF7518; MF7165; MF7116; MF7096; MF7133; MF7139; MF7524 или MF7137, предпочтительно MF7139; MF7524, MF7133, MF7518 или MF7096, содержащую не более 15, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и предпочтительно  
15 содержащую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или комбинацию указанного относительно аминокислотной последовательности указанного MF.

14. Антитело или его вариант по любому из пп. 4-7, причем указанное  
20 антитело содержит:

переменный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3, содержащий переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи, представленную для MF7139; MF7524; MF7133; MF7518 или MF7096 (на  
25 фигуре 3), содержащую не более 15, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и предпочтительно содержащую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или комбинацию указанного относительно аминокислотной последовательности указанного MF; и

переменный домен, который может связываться с внеклеточной  
30 частью PD-1, содержащий переменную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи, представленную для MF6076 (представленного на фигуре 3), содержащую не более 15, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и предпочтительно содержащую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен

аминокислот или комбинацию указанного относительно аминокислотной последовательности VH, представленного для MF.

15. Антитело или его вариант по любому из пп. 4-7, причем указанное  
5 антитело содержит:

вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, представленную для MF7139; MF7524; MF7133; MF7518 или MF7096 (на  
10 фигуре 3), содержащую не более 15, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и предпочтительно содержащую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или комбинацию указанного относительно аминокислотной последовательности указанного MF; и

вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной  
15 частью PD-1, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, представленную для MF6974 (представленного на фигуре 3), содержащую не более 15, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и предпочтительно содержащую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен  
20 аминокислот или комбинацию указанного относительно аминокислотной последовательности VH, представленного для MF.

16. Антитело или его вариант по любому из пп. 4-7, причем указанное антитело содержит:

25 вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, представленную для MF7139; MF7524; MF7133; MF7518 или MF7096 (на  
30 фигуре 3), содержащую не более 15, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и предпочтительно содержащую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или комбинацию указанного относительно аминокислотной последовательности указанного MF; и

вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, который



содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, представленную для MF6930 (представленную на фигуре 3), содержащую не более 15, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и предпочтительно содержащую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или комбинацию указанного относительно аминокислотной последовательности V<sub>H</sub>, представленного для MF.

17. Антитело или его вариант, содержащее(ий) вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью PD-1 и содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, представленную для MF6076; MF6974 или MF6930 (представленную на фигуре 3), содержащую не более 15, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и предпочтительно содержащую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или комбинацию указанного относительно аминокислотной последовательности V<sub>H</sub>, представленного для MF.

18. Антитело или его вариант, содержащее(ий) вариабельный домен, который может связываться с внеклеточной частью LAG-3 и содержит вариабельную область тяжелой цепи, который содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, представленную для MF7139; MF7524; MF7133; MF7518 или MF7096 (на фигуре 3), содержащую не более 15, предпочтительно 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и предпочтительно содержащую 0, 1, 2, 3, 4 или 5 вставок, делеций, замен аминокислот или комбинацию указанного относительно аминокислотной последовательности указанного MF.

19. Антитело или его вариант по любому из предшествующих пунктов, которое(ый) содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи, представленные на фигуре 1B, или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от

последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области легкой цепи, представленных на фигуре 1B.

20. Антитело или его вариант по любому из предшествующих пунктов, содержащее(ий) варибельную область легкой цепи, имеющую последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична аминокислотной последовательности, представленной на фигуре 1B или фигуре 1A.

21. Способ по любому из пп. 1-3, причем указанное антитело или его вариант представляет собой антитело по любому из пп. 4-20.

22. Антитело или его вариант по любому из пп. 4-20 для применения в качестве лекарственного средства.

15

23. Антитело или его вариант по любому из пп. 4-20 для применения в способе лечения рака или инфекционного заболевания, вызванного патогеном, таким как вирус или паразит.

24. Композиция или набор компонентов, содержащая(ий) по меньшей мере одно антитело или его вариант по любому из пп. 4-20.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно антитело или его вариант по любому из пп. 4-20 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

26. Молекула нуклеиновой кислоты длиной по меньшей мере 15 нуклеотидов, кодирующая по меньшей мере один участок CDR антитела или варианта по любому из пп. 4-20.

30

27. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 26, кодирующая по меньшей мере варибельную область тяжелой цепи антитела или варианта по любому из пп. 4-20.

28. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 26 или 27, кодирующая переменную область тяжелой цепи, представленный на фигуре 3.
29. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или вариант по  
5 любому из пп. 4-20.
30. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент по любому из пп. 26-29.
- 10 31. Выделенная или рекомбинантная клетка, или животное, не являющееся человеком, содержащая(ее) молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 26-29 или вектор по п. 30.
- 15 32. Способ лечения рака или инфекционного заболевания, вызванного патогеном, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела или варианта по любому из пп. 4-20, композиции по пп. 24 или 25, молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 26-29 или вектора по п. 30.
- 20 33. Способ получения антитела или его варианта по любому из пп. 4-20 из единственной клетки, где указанное антитело или его вариант содержит два домена СН3, которые способны образовывать область контакта, включающий обеспечение:
- 25 - клетки, содержащей а) первую молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь IgG, которая специфически распознает внеклеточную часть PD-1 и которая содержит первый домен СН3, и b) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь IgG, которая специфически распознает внеклеточную часть LAG3 и которая содержит второй домен СН3, где указанные последовательности нуклеиновой кислоты кодируют остатки для
- 30 предпочтительной конъюгации указанных первого и второго доменов СН3, дополнительно включающий стадию культивирования указанной клетки и обеспечение возможности экспрессии указанных последовательностей нуклеиновой кислоты и сбора указанного антитела или его варианта из культуры.

34. Способ по п. 33, где указанная клетка содержит третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей общую легкую цепь, предпочтительно подвергшуюся перегруппировке на уровне генов зародышевой линии легкую цепь типа каппа IgV<sub>κ</sub>1-39\*01/IGJ<sub>κ</sub>1\*01 человека.

35. Способ по п. 33 или 34, где указанная первая нуклеиновая кислота кодирует указанный первый домен СН3, содержащий аминокислотные замены L351K и T366K (нумерация согласно индексу EU), и где указанная вторая нуклеиновая кислота кодирует указанный второй домен СН3, содержащий аминокислотные замены L351D и L368E (нумерация по EU), дополнительно включающий стадию культивирования указанной клетки и обеспечения возможности экспрессии указанных последовательностей нуклеиновых кислоты и сбора указанного антитела или его варианта из культуры.

15

**ФИГУРА 1****Фигура 1А**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP  
 SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK  
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
 EQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**Фигура 1В**

gacatccagatgaccagctctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc  
 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T  
 atcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctacttaaattggtatcagcagaaaacca  
 I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P  
 gggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatca  
 G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S  
 aggttcagtgccagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagctctgcaacct  
 R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P  
 gaagattttgcaacttactactgtcaacagagttacagtaccctccaacggttcggccaa  
 E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P P T F G Q  
 gggaccaaggtggagatcaaa  
 G T K V E I K

**Фигура 1С**

cgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatct  
 R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S  
 ggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacag  
 G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q  
 tggaaaggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggac  
 W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D  
 agcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgag  
 S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E  
 aaacacaaagtctacgcctgcaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaag  
 K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K  
 agcttcaacaggggagagtgtag  
 S F N R G E C -

**Фигура 1D**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG  
TDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK

**Фигура 1E**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG  
TDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQSYSTP

## ФИГУРА 2

### Фигура 2А

VH: в зависимости от MF (мишени): фигура 3.

### Фигура 2В

gctagcaccsaagggcccatcgggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggg  
 A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G  
 ggcacagcggccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgctg  
 G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S  
 tggaaactcaggcgccttgaccagcggcgtgcacaccttccccggctgtcctacagtctca  
 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S  
 ggactctactccctcagcagcgtcgtgaccgtgcctccagcagcttgggcacccagacc  
 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T  
 tacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagtt  
 Y I C N V N H K P S N T K V D K R V

### Фигура 2С

gagccsaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcca  
 E P K S C D K T H T C P P C P

### Фигура 2D

gcacctgaactcctgggggggaccgtcagttcttcttccccccaaaaccsaaggacacc  
 A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T  
 ctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagac  
 L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D  
 cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag  
 P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K  
 ccgcgggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcac  
 P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H  
 caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc  
 Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A  
 cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaa  
 P I E K T I S K A K

**Фигура 2Е**

gcacctgaactcggcaggggaccgtcagtccttcttccccccaaaacccaaggacacc  
 A P E L G R G P S V F L F P P K P K D T  
 ctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagac  
 L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D  
 cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaaag  
 P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K  
 ccgcggggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacctcctgcac  
 P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H  
 caggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcc  
 Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A  
 cccatcgagaaaaccatctccaagccaaa  
 P I E K T I S K A K

**Фигура 2F**

gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccaagcccccatcccgggaggagatgaccaag  
 G Q P R E P Q V Y T K P P S R E E M T K  
 aaccaggtcagcctgaagtgcctggtcaaaggcttctatcccagcgcacatcgccgtggag  
 N Q V S L K C L V K G F Y P S D I A V E  
 tgggagagcaatgggcagccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc  
 W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S  
 gacggctccttcttctctatagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagcagggg  
 D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G  
 aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc  
 N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S  
 ctctccctgtctccgggttga  
 L S L S P G -



**Фигура 2G**

gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccgaccccccatcccgggaggagatgaccaag  
G Q P R E P Q V Y T D P P S R E E M T K  
aaccaggtcagcctgacctgcgaggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag  
N Q V S L T C E V K G F Y P S D I A V E  
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc  
W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S  
gacggctccttcttctctatagcaagctcacctgggacaagagcaggtggcagcagggg  
D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G  
aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc  
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S  
ctctccctgtctccgggttga  
L S L S P G -

**ФИГУРА 3****Фигура 3А**

MF6076

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSTDSLGFYFWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSAN  
FNPSLKSRVTMSIDTSNNQFSLKLRVTAADTAVYFCARGGYTG YGGDWFDPWGQG  
 TLVTVSS

MF6226

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSIGYYFWSWIRQPPGKGLEWIGYVYYSGSNN  
LNPSLKSRVTLSVDTSKNQFSLRLNSMTAADTAVYYCARGGYSGYGGDSFDLWGQGT  
 TVTVSS

MF6236

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIGYYFWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTN  
FNPSLKSRVTMSVDTSKNQFSLNLRVTTADTAVYYCARGGYTG HGGDWFDPWGQG  
 TLVTVSS

MF6256

EVQLVQSGAEVKKPGSSMKVSKASGGTFSSYVISWVRQAPGQGLEWMGMIIPVFDT  
SSYEKKFQGRITIIADKSTSTVYLELSSLRSEDAAVYYCARGTVEATLLFDYWGQGT  
 TVSS

MF6930

EVQLVQSGAEVKKPGSSMKVSKASGGTFSNYVISWVRQAPGQGLEWMGMIIPVFET  
ATYEKKFQGRVTIIADKSTSTVYMESSLRSEDAAVYYCARGTVEATLLFDYWGQGT  
 LTVSS

MF6932

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGMIIPFFDT  
ANYAQKFQGRVTITADKSTSTASME LRSLEDTAVYYCARGTVSATLVFDYWGQGT  
 LTVSS

MF6935

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYVISWVRQAPGQGLEWMGMIIPFD  
ANYAQKFQGRVTITADKSTSTASMELRSLRSEDTAVYYCARGTVSGTLVFDYWGQGT  
LVTVSS

MF6936

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFSNYVINWVRQAPGQGLEWMGMIIPVFD  
TSYERKFQGRVTITADKSTSTAYMELTSRLRSEDTAVYYCARGTVGATLLFDNWGQGT  
LVTVSS

MF6972

EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISTYFWSWIRQPPGKGLEWIGYIIYSGSTNY  
NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYSGYGGDDFDIWGQGT  
MTVSS

MF6974

EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGGGA  
NIYYADSVKGRFTISRDNSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYFCASPYGSGYFDVWGQGT  
LTVSS

MF6982

EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGGGTN  
IYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAGDTAVYYCASPYGSGYLDVWGQGT  
LTVSS

**Фигура 3B**

MF7100

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDTHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSN  
KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERGWDVFDIWGQGT  
LTVSS

MF7111

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSDDSISDYYSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGNTK  
YNPSLKNRVTISVDTSKSKQFSLKLT SVTAADTAVYYCARIPLTGEFDYWAQGTLTVSS

MF7116

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYHGS  
DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGDNDVFDIWGQ  
TLVTVSS

MF7118

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGGGVS  
TFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIVPAATPSGTYWIFDL  
WGRGTLVTVSS

MF7134

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTTNALNWVRQAPGQGLEWVSGWINTHTG  
NPTYAQGFGRFVFSLDTSVSTAYLQIRSLKAEDTAVYYCAREPNWGVYFDYWGQGT  
LTVSS

MF7136

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISGSGRS  
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSTYYYTSGSYSVFDY  
WGQGT LTVSS

MF7137

QVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGSDPEH  
GETVDAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCTTGGTYYYGSGSYT  
DFWGQGTTLTVSS

MF7142

QVQLVQSGAEVRKPGSSVMVSCKASGGTFNTYAINWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGT  
PYYGQRFQGRVTITADKSTNTVMELSSLRSEDTAMYFCARERDIGSLYYFDSWGQG  
TLTVSS

MF7146

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNNYFITWVRQAPGQGLEWMGGIIPSGT  
GNYAQKFQGRVAITADKSTNTAYMELSSLRSEDTAIYYCVRDREVGAIYYFDYWGQG  
TMVTVSS

MF7165

QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKVSGYTLTELSIHWVRQAPGKGLEWMGAFDPEDG  
ETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYFCATGGTYYYGSGSYT  
LDYWGQGTTLTVSS

MF7167

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSTISGSGVS  
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNTLRAEDTAVYYCAKDRGYDYSGSYHNWFD  
PWGQGTTLTVSS

MF7185

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSGGTFSNYAFSWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGS  
TNYAQSFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDREMGTLYFFDQWGQG  
TTVTVSS

MF7443

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS  
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDTSTWQRGGYKAFDY  
WGQGTLVTVSS

MF7444

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS  
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDTGQSWSNYYHAFDY  
WGQGTLVTVSS

MF7515

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSG  
NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARRPGPALGDLDSWGQ  
GTLVTVSS

MF7518

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSG  
NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDGSGWDDFDYWGQ  
GTLVTVSS

MF7096

QVQLQESGPGLVRPSETLSLTCTVSGGSISSYSWSWIRQPPGKGLEWIGYIDYSGSTNY  
NPSLKSRVTISVDTSKTQFSLKLSSVSAADTAVYYCAKDLLYKWNYVEGFDIWGQGT  
TVSS

MF7097

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYSWSWIRQPPGKGLEWIGYIDYSGTTN  
FNPSLKSRVTISVDTSKTQFSLKLSSVSAADTAVYYCAKDLLYKWNYVEGFDIWGQGT  
MVTVSS

MF7106

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSKYVVSWVRQAPGQGFDWMGGIIPMFG  
TANYAQMFQGRVTITADKSTSTVNMELSSLRSEDTAVYYCVRDKAVAGLYYFDSWGQ  
GTLVTVSS

MF7120

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFSTYAINWIRQAPGQGLEWMGGIPIFGTA  
YQAQEFQDRVTITADKSTSTGYMEMSSLISEDTAVYYCARERELGALYAFDIWGQGT  
MVTVSS

MF7133

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSHAISWVRQVPGQGLEWMGGIPLFDT  
AKNAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDRETGTLYYFDYWGQG  
TLVTVSS

MF7139

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNFAFSWVRQAPGQGLEWMGGIIPMFD  
TAKYAQKFQGRVTIADKSTNTAYMDLNSLRSEDTAVYYCVRDRAIGTLYYFDYWGQ  
GTLVTVSS

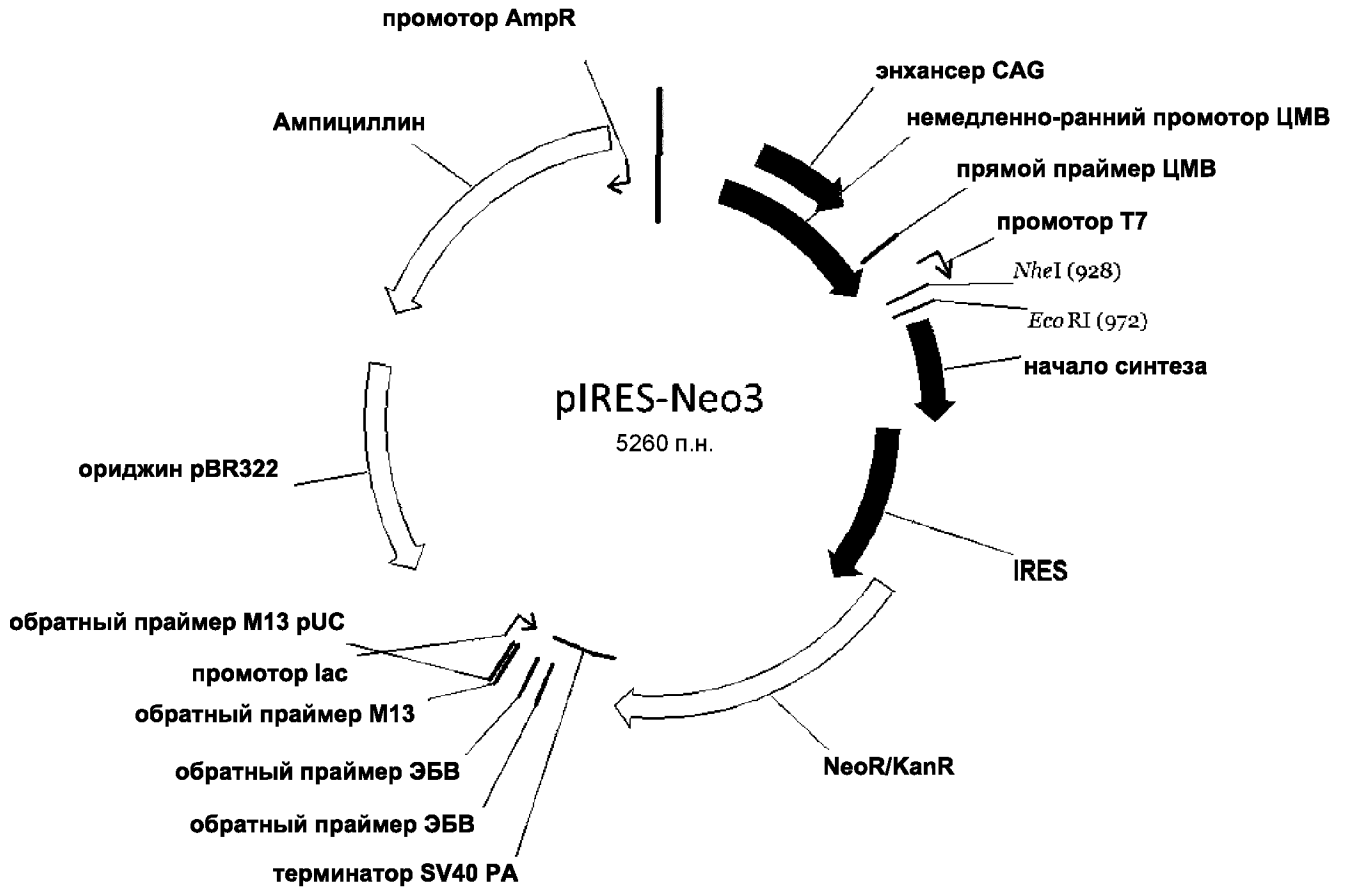
MF7144

QVQLVQSGAEVRKPGSSVMVSKASGGTFSYAINWLRQAPGQGLEWMGGIPIFGT  
PYYGQRFQGRVTITADKSTNTVFMELSSLRSEDTAIYYCARDRDSGGLYFDSWGQG  
TLVTVSS

MF7524

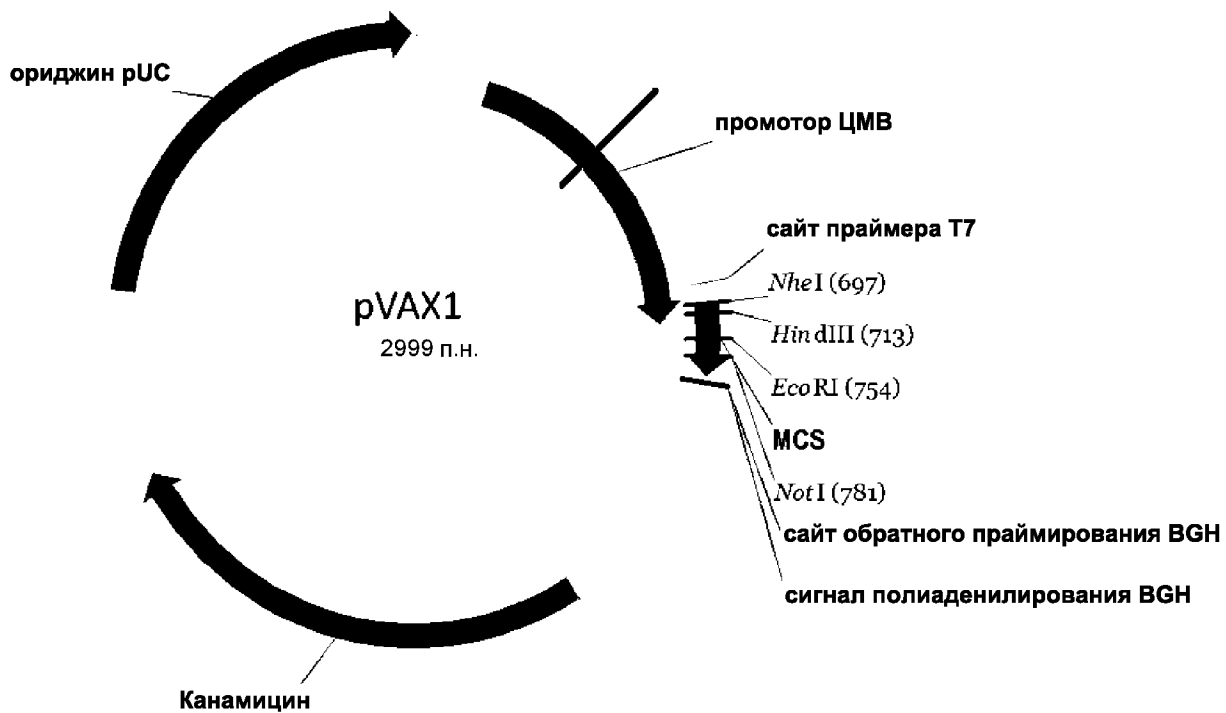
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSG  
NTNYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGSILAAQMWGDIWG  
QGTLVTVSS

## ФИГУРА 4

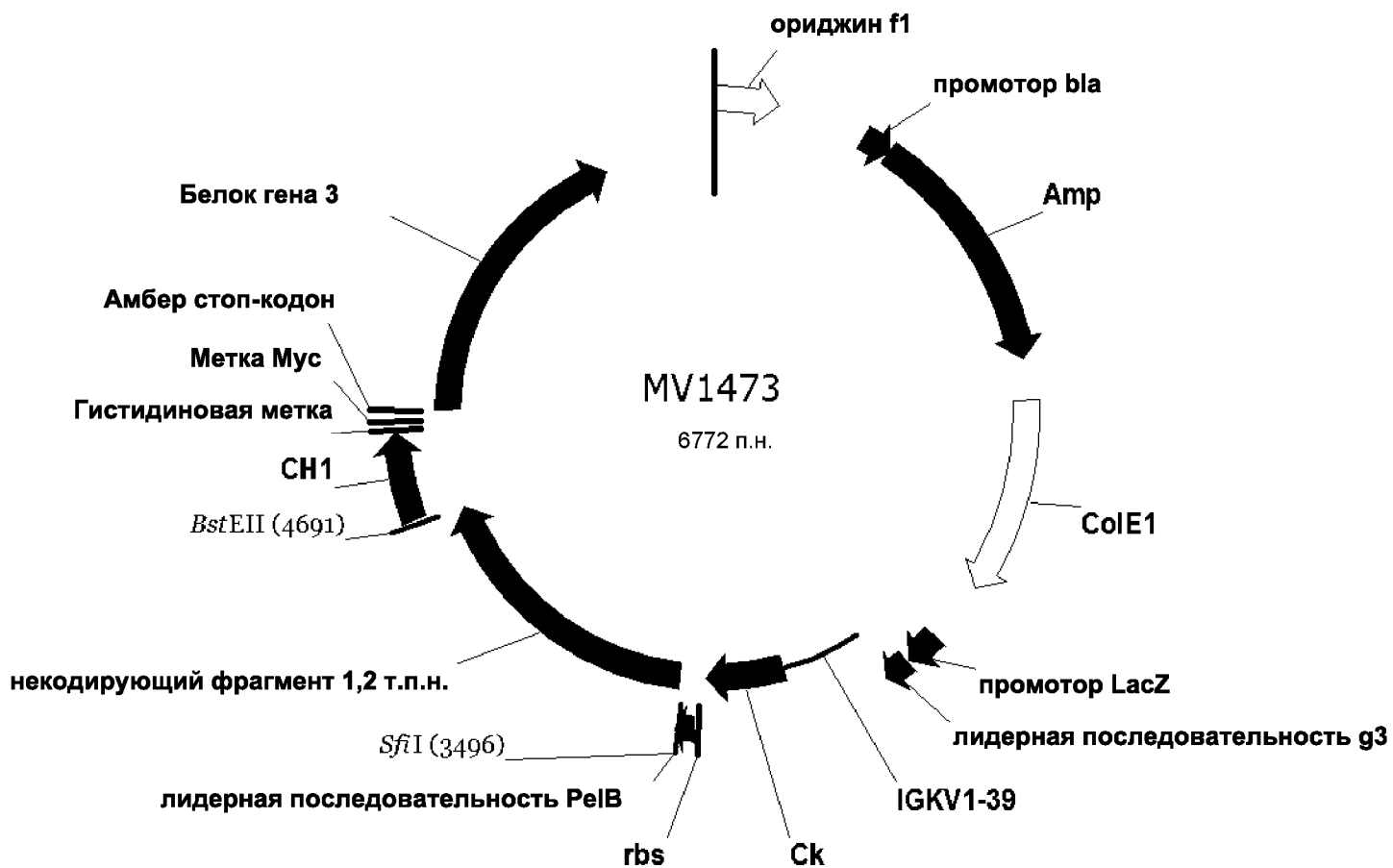




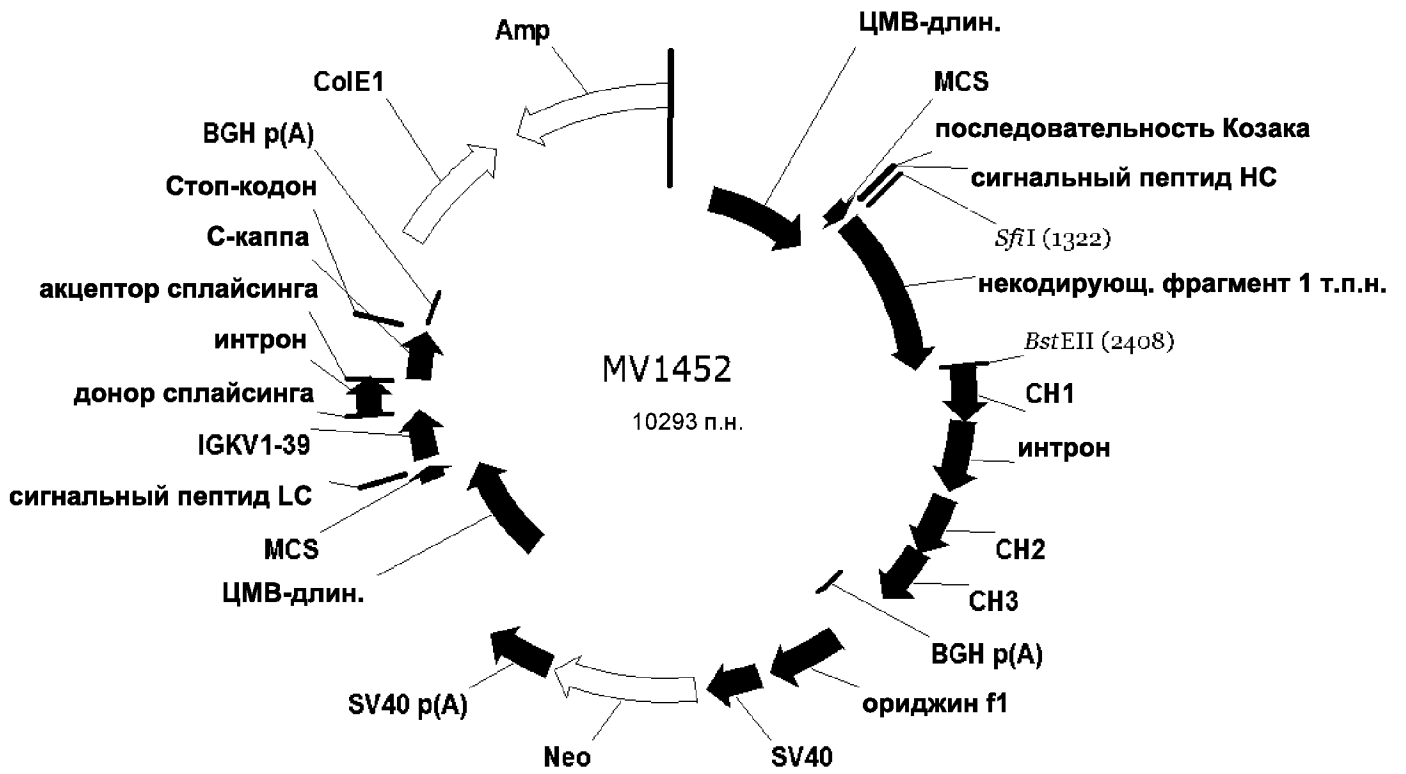
ФИГУРА 5



ФИГУРА 6



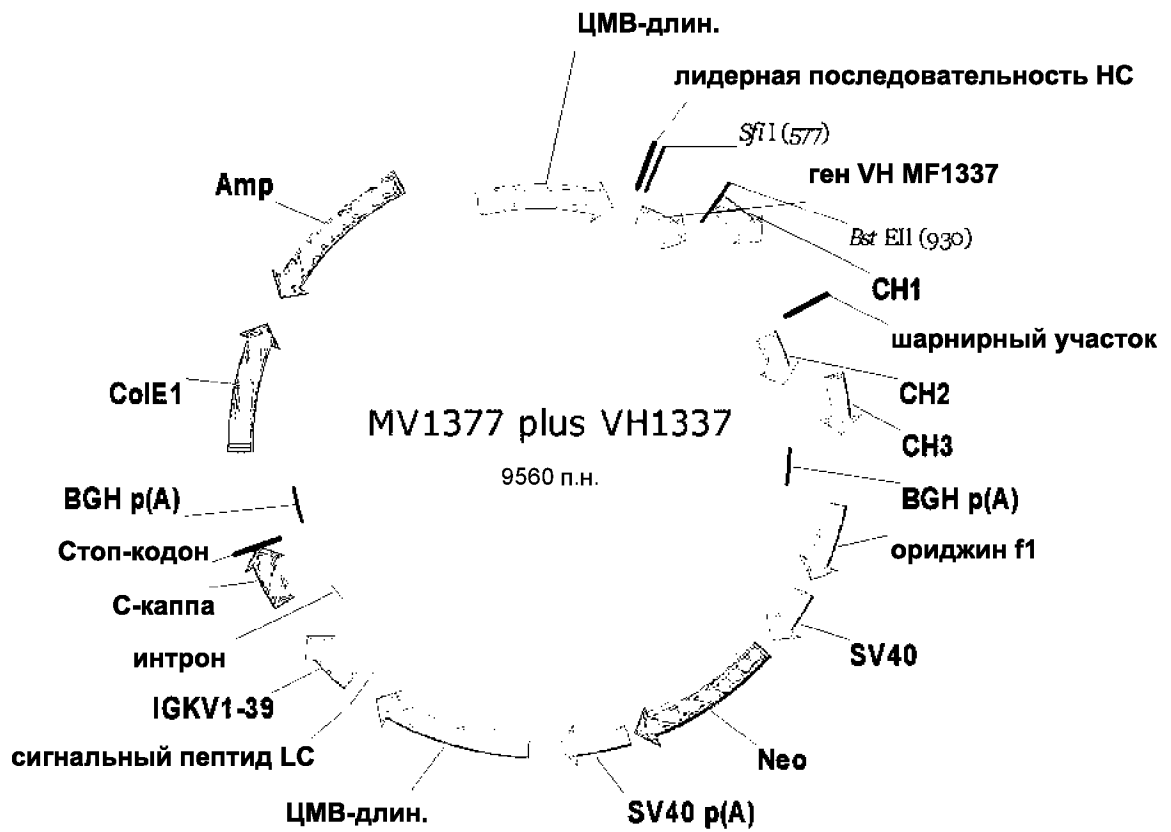
## ФИГУРА 7



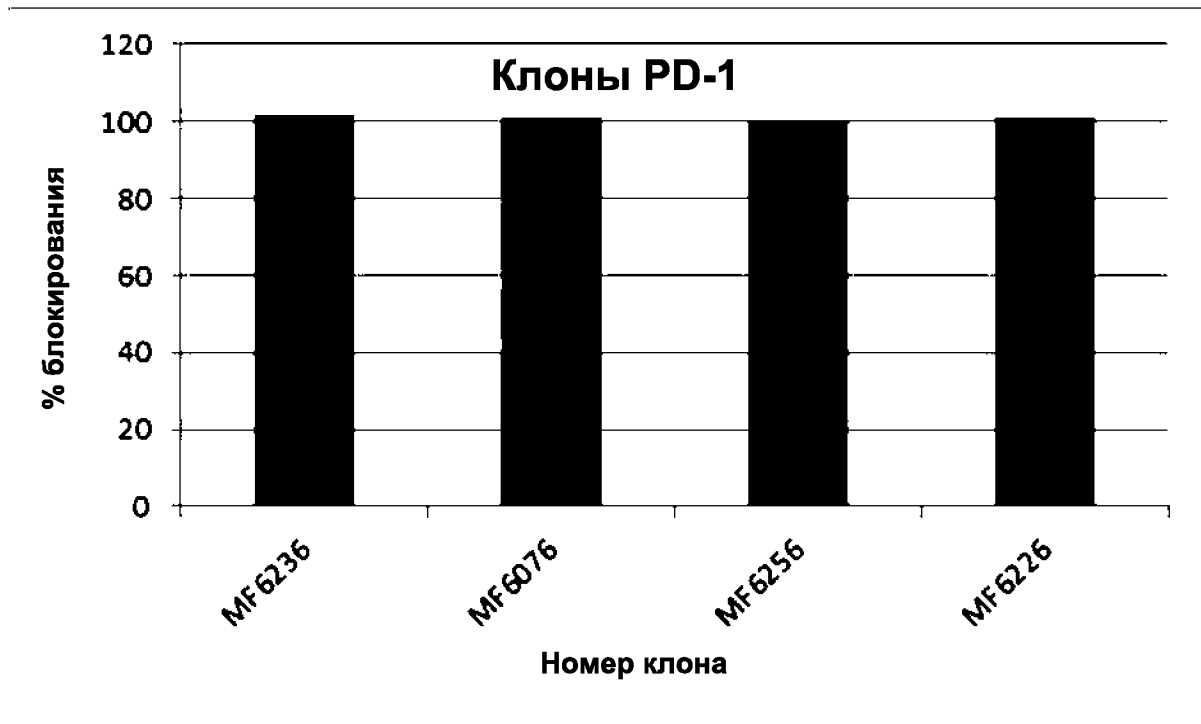
## ФИГУРА 8

EVQLVETGAEVKKPGASVKVSCKASDYIFTKYDINWVRQAPGQGLEWMGWMSANTGNTGYAOKFQGRVTMTRDTS  
INTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGTITVTVSS

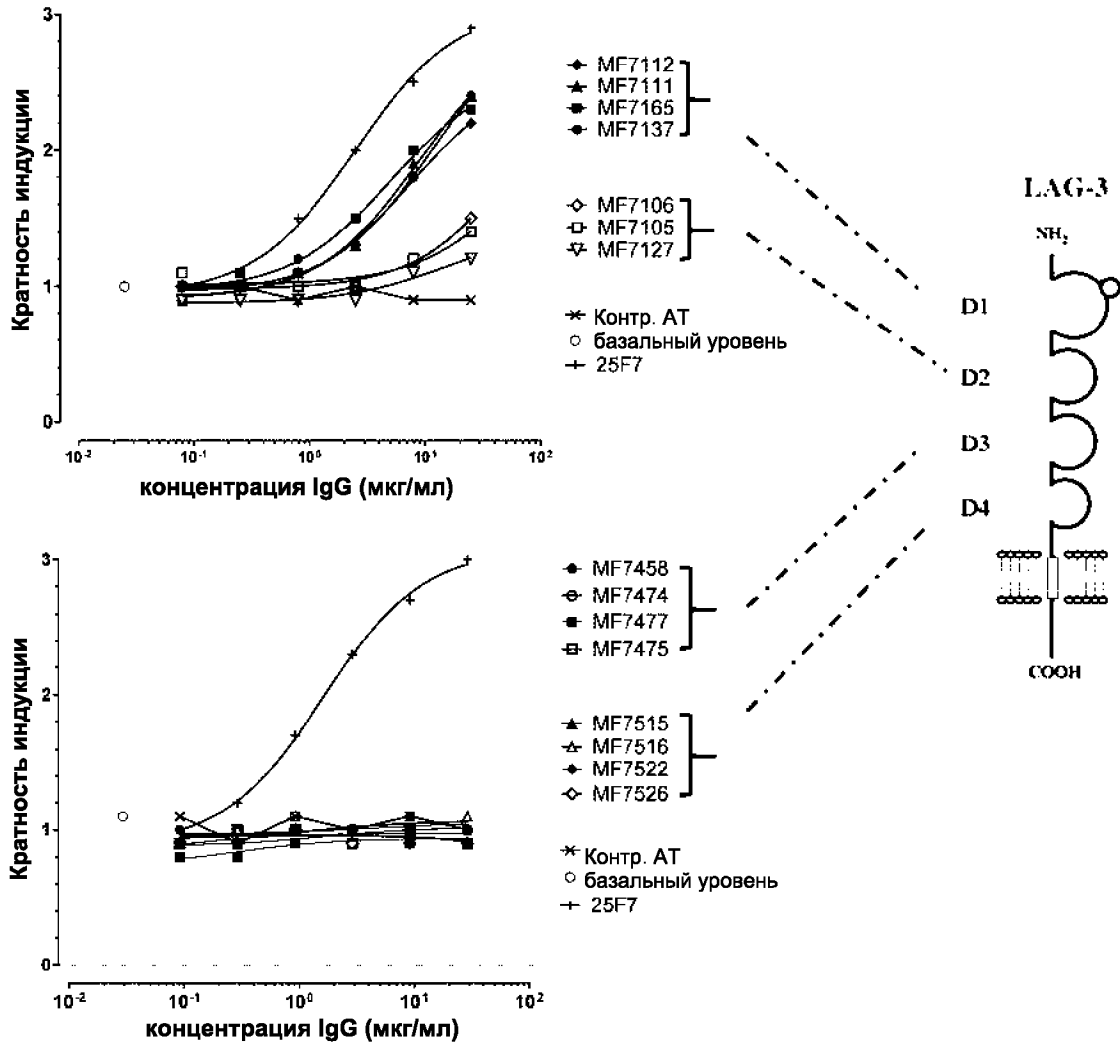
## ФИГУРА 9



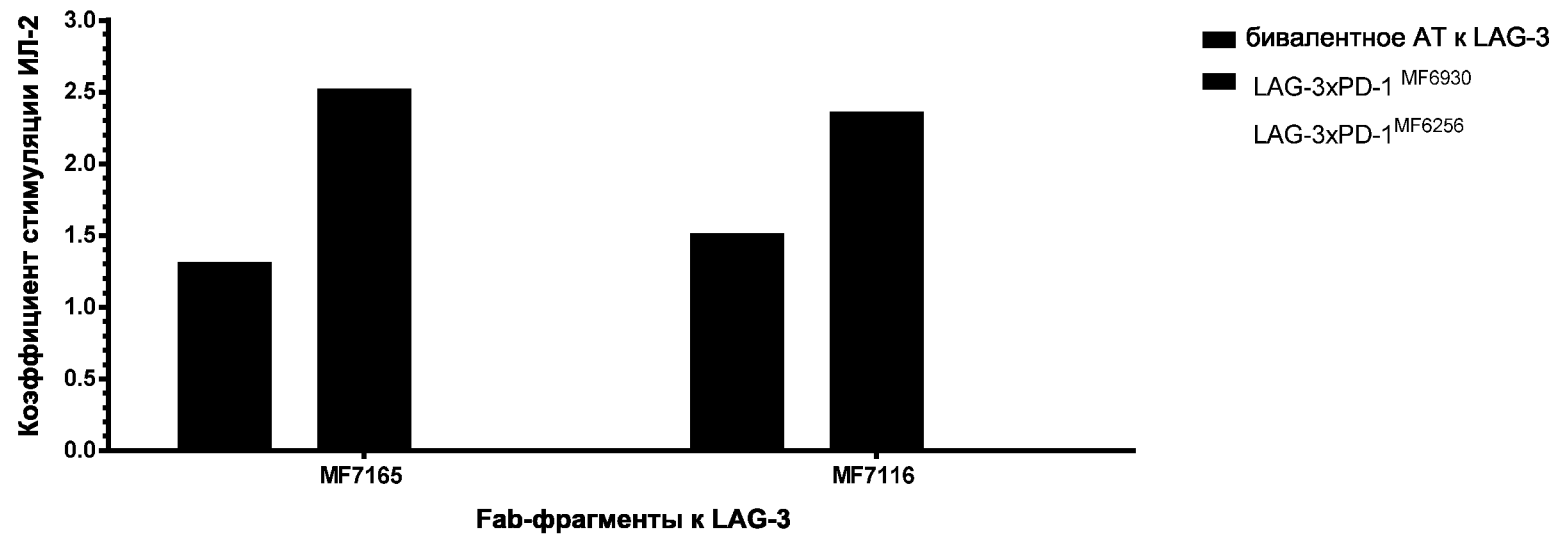
ФИГУРА 10



ФИГУРА 11

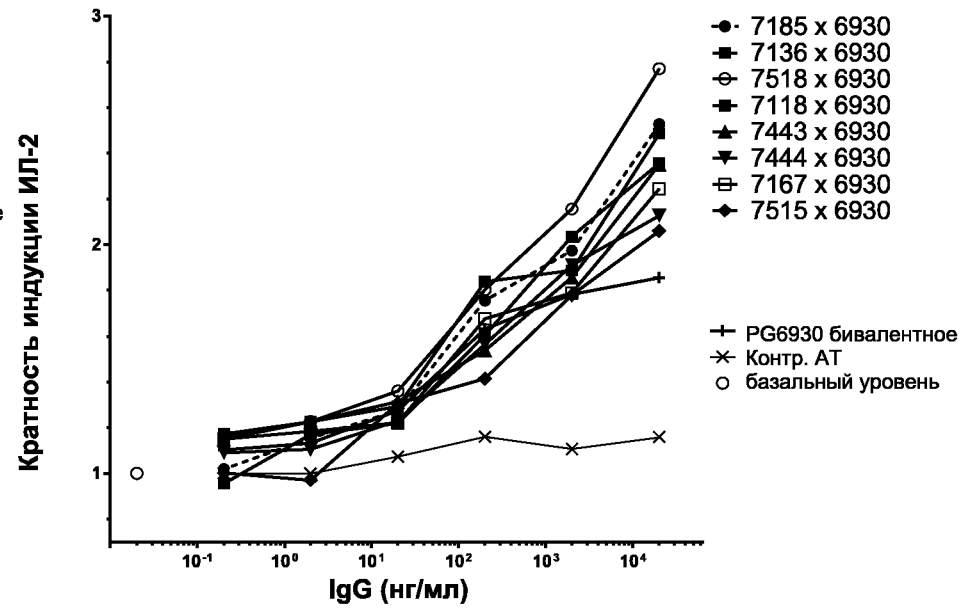
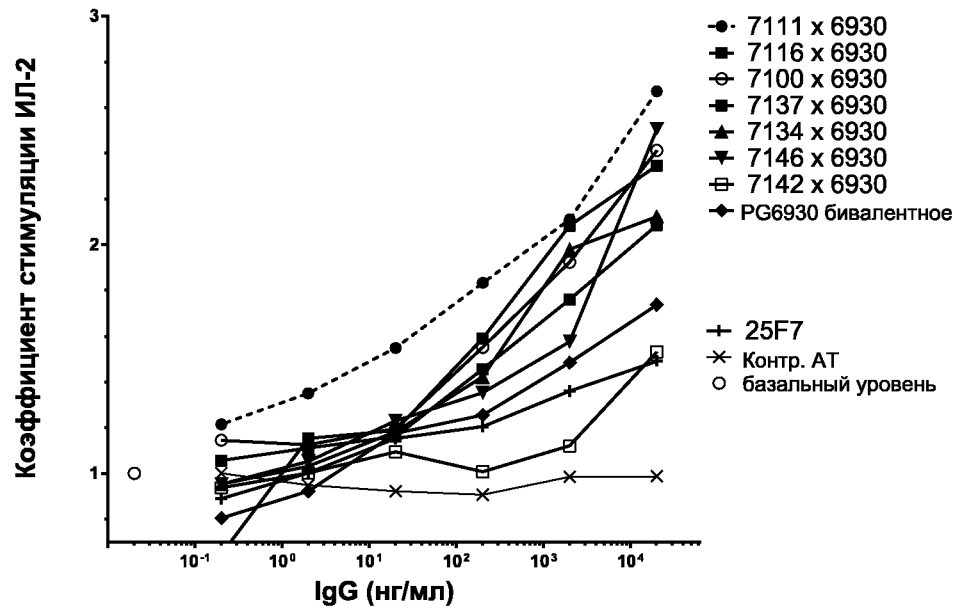


**ФИГУРА 12**





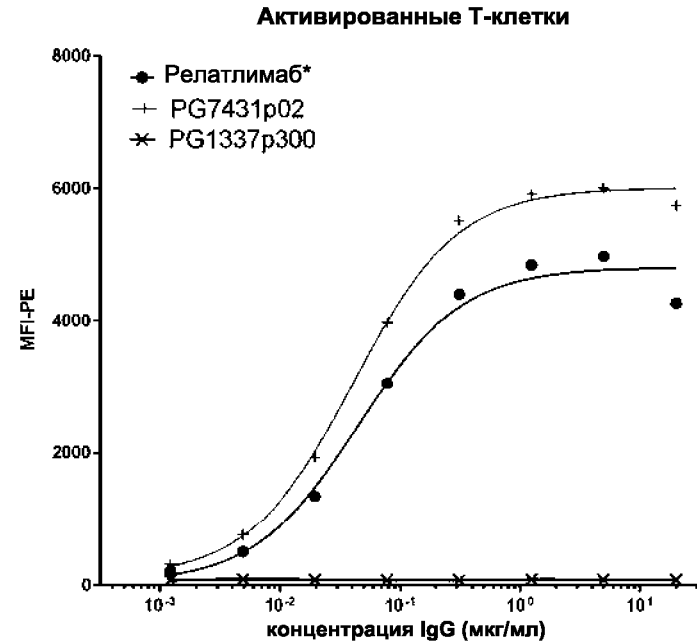
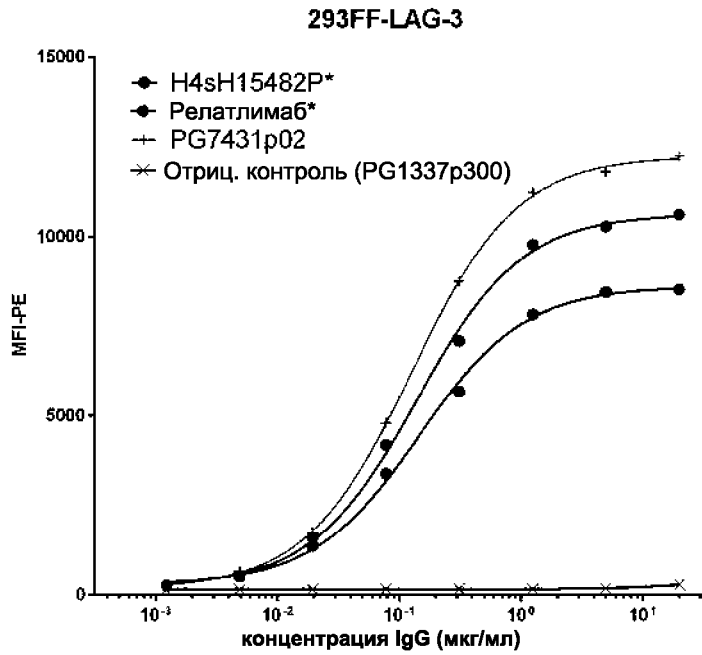
ФИГУРА 13



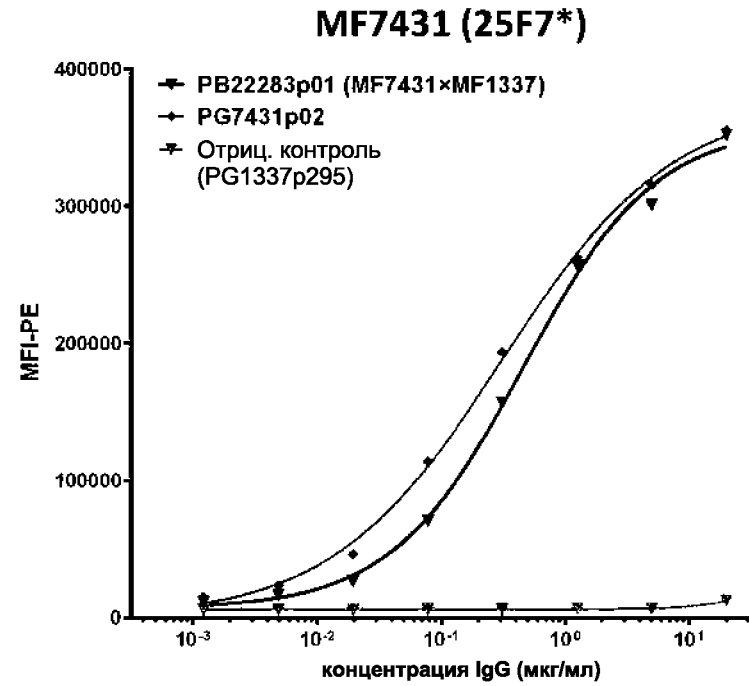
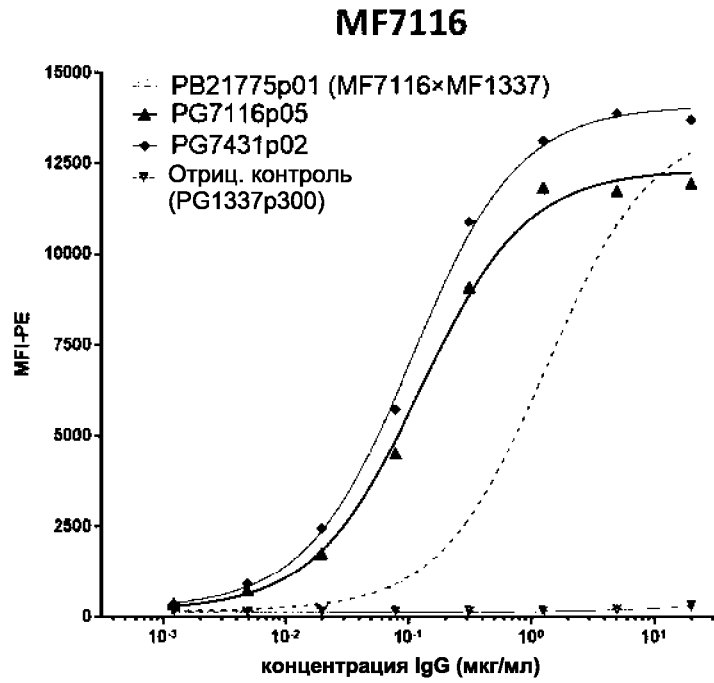
**ФИГУРА 14**

Антитело	формат IgG
25F7* (PG7431)	p02=IgG1 дикого типа
Релатлимаб*	IgG4 со стабилизирующей мутацией S228P
H4sH15482P*	IgG4 со стабилизирующей мутацией S228P

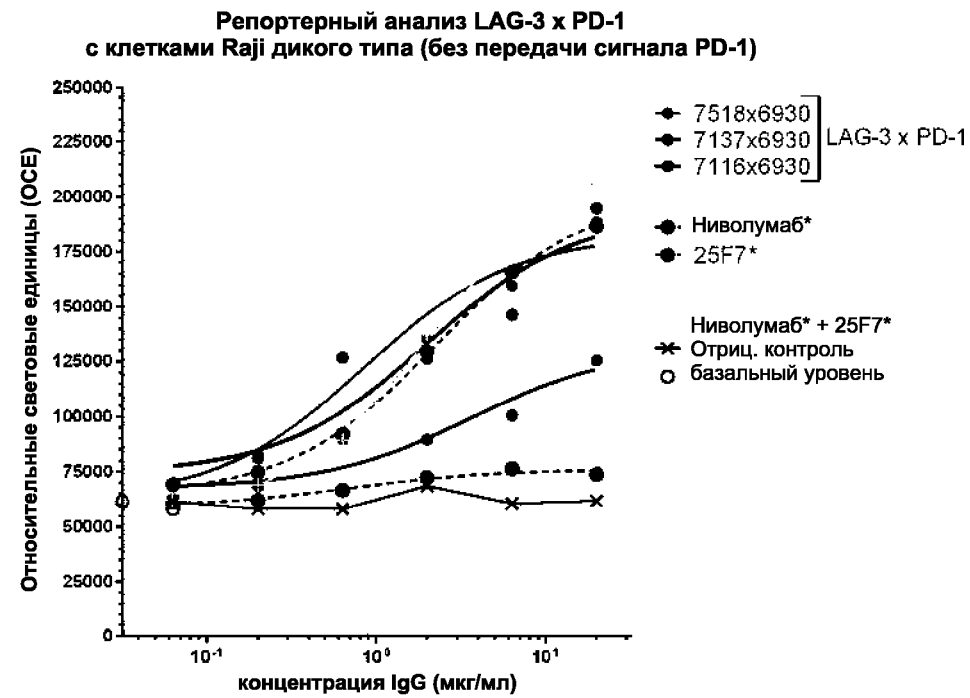
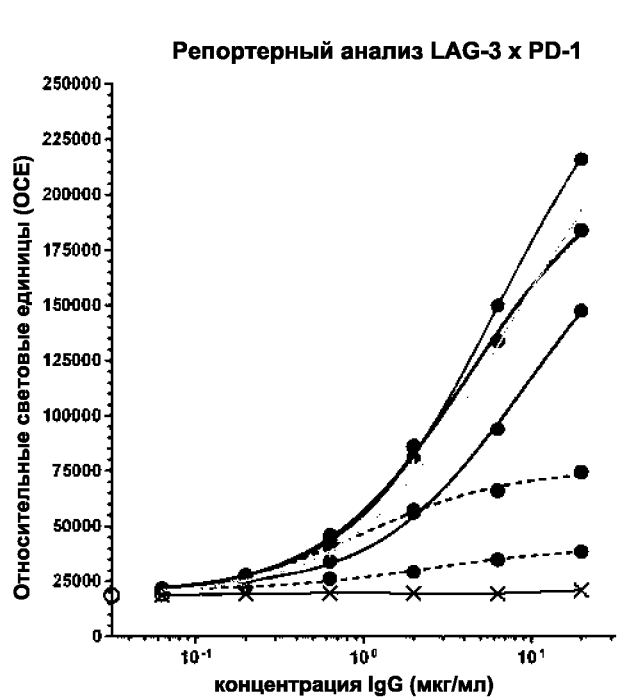
\*Суррогатные антитела



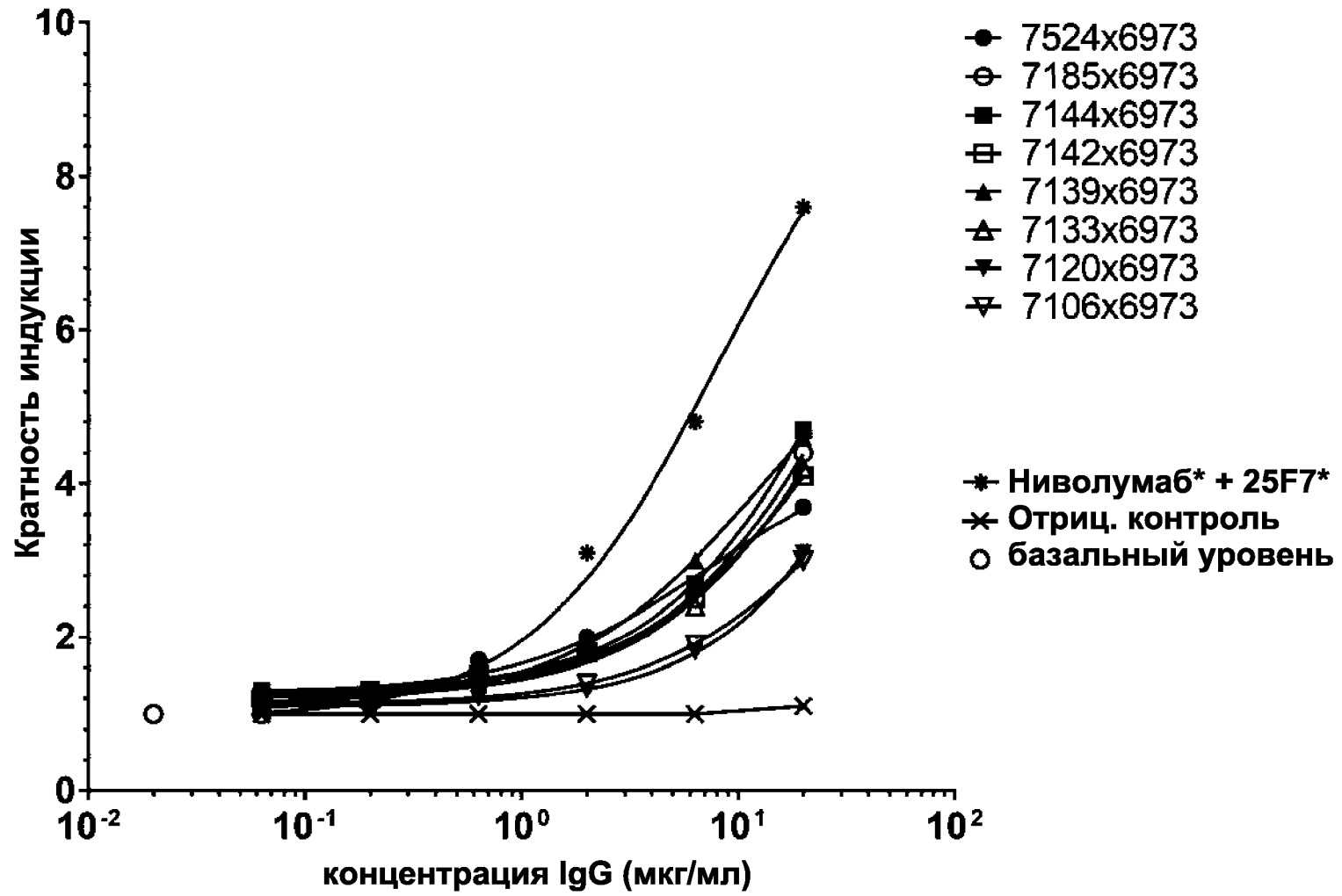
ФИГУРА 15



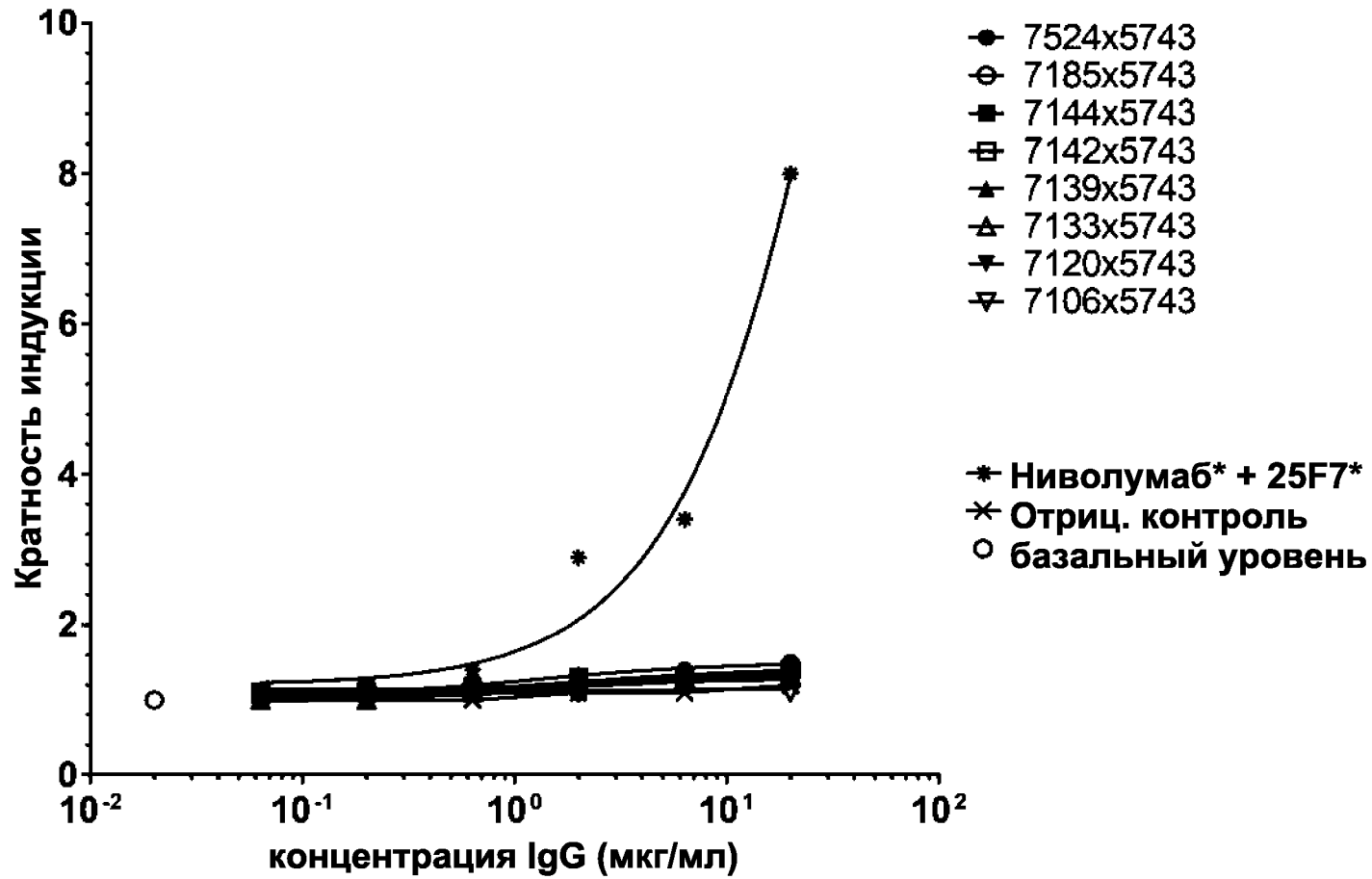
ФИГУРА 16



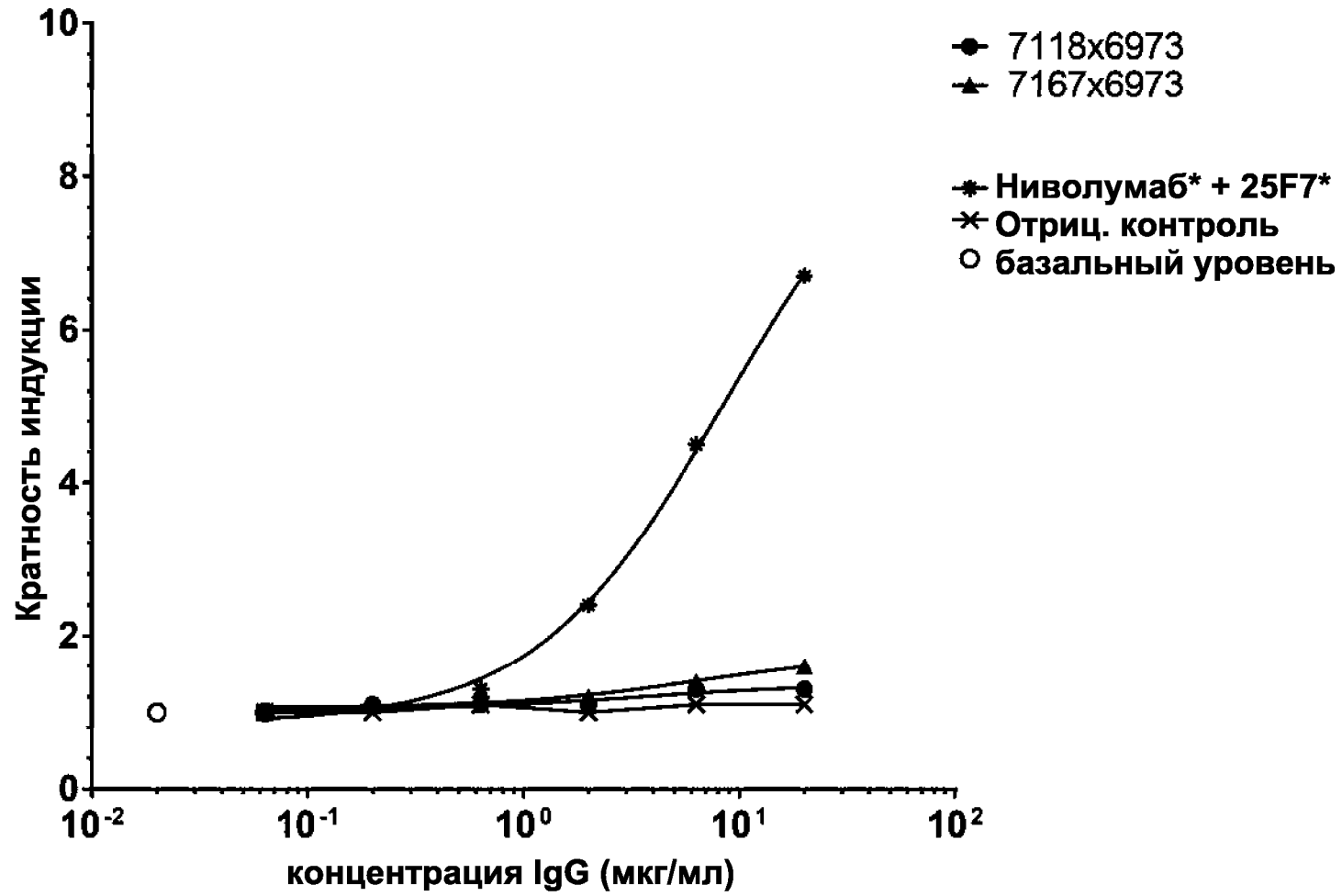
ФИГУРА 17А



ФИГУРА 17В



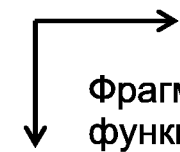
ФИГУРА 17С



# ФИГУРА 18

Выше, чем 30%	59
Серая область 15↔30%	43
Ниже, чем 15%	76

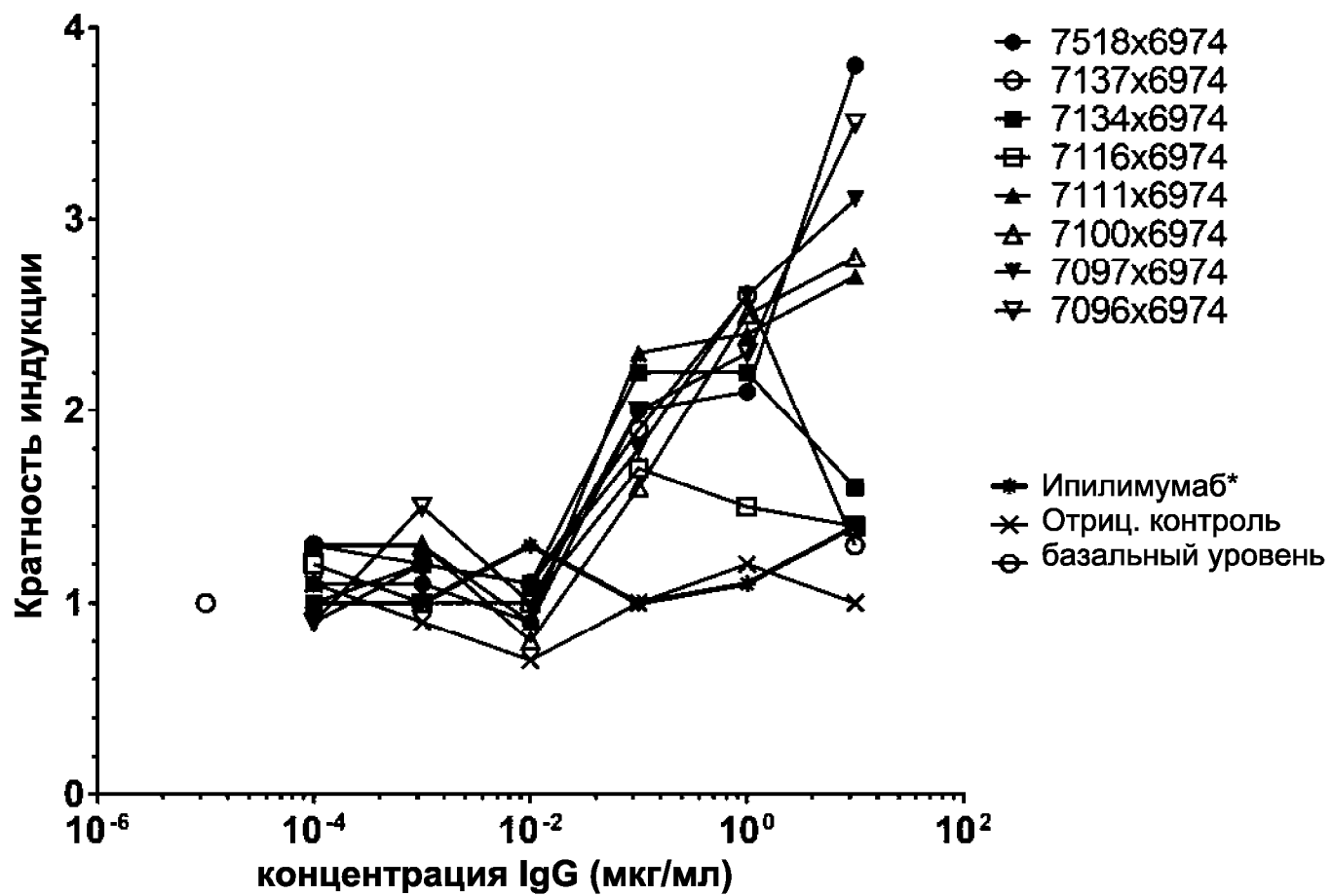
Выше, чем (%)	30.00
Ниже, чем (%)	15.00


**LAG-3**  
 Фрагменты, ранжированные по функциональной активности (от PD-1 высокой к низкой) в составе бивалентных АТ в репортерном анализе

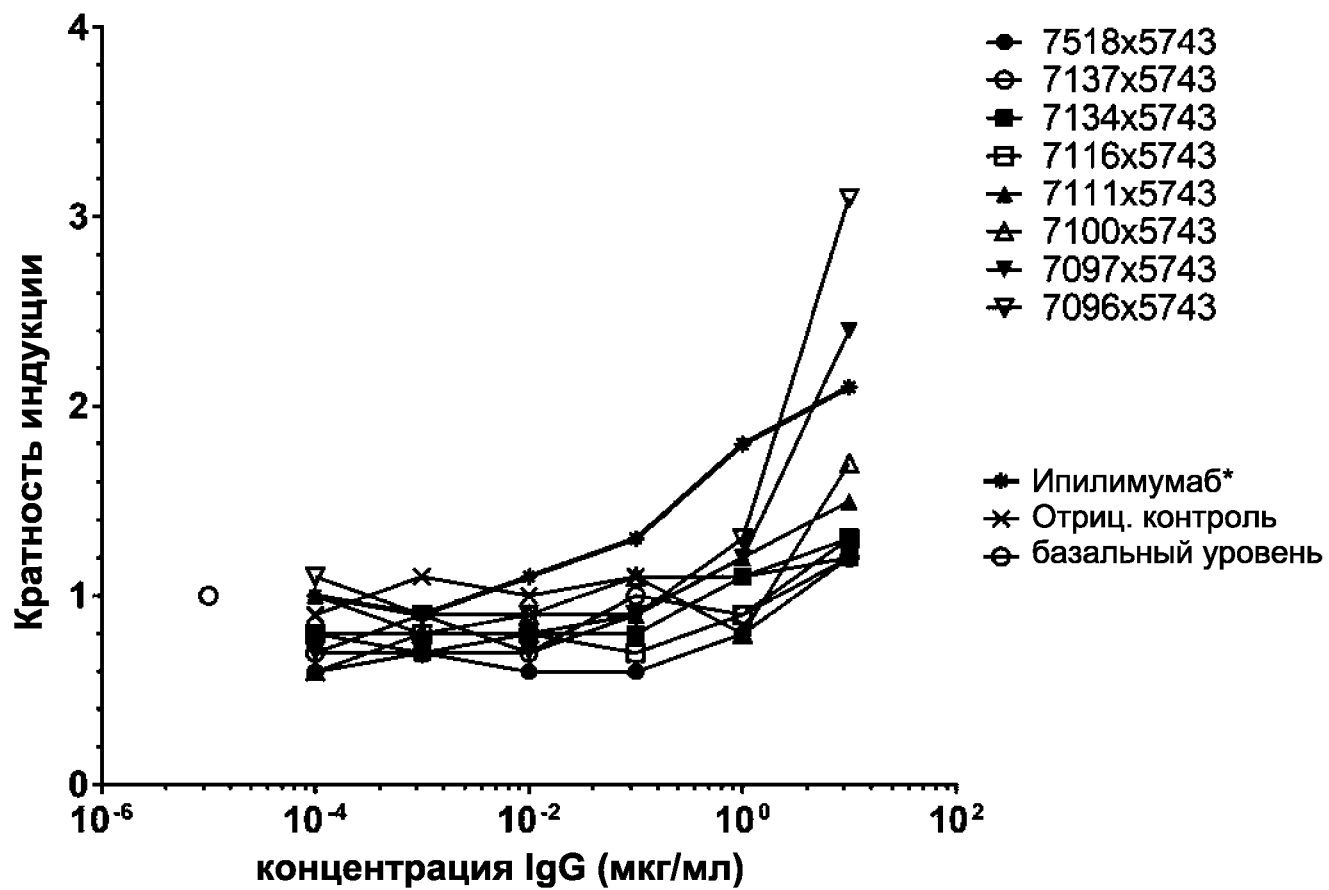
Репортер 1		1-й MG LAG-3																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
2-й MG PD-1		MG718C1624	MG716C1624	MG711C1624	MG717C1624	MG710C1624	MG709C1624	MG713C1624	MG714C1624	MG715C1624	MG707C1624	MG718C1624	MG713C1624	MG714C1624	MG710C1624	MG710C1624	MG710C1624	MG710C1624	MG710C1624	MG710C1624
1	MG6930C1873	52.22	38.92	39.41	<b>18.26</b>	33.99	31.53	45.08	<b>29.02</b>	44.56	<b>28.08</b>	<b>24.95</b>	36.79	35.23	37.31	38.86				
2	MG6076C1873	46.50	43.31	38.85	30.57	<b>28.11</b>	52.87	64.97	56.54	37.17	46.07	49.56	39.17	46.60	38.74	37.17	<b>24.61</b>	<b>15.71</b>		
3	MG6974C1873	36.88	34.75	43.26	33.33	<b>26.34</b>	31.91	50.35	46.09	40.63	35.28	33.33	32.03	45.31	45.31	<b>18.79</b>	<b>17.97</b>			
4	MG6973C1873	<b>27.18</b>	<b>26.72</b>	36.03	<b>25.10</b>	31.17	34.41	31.17	52.58	48.45	46.39	37.65	48.45	55.67	54.12	<b>27.84</b>	<b>25.26</b>			
5	MG6935C1873	<b>28.11</b>	<b>28.31</b>	<b>29.73</b>		<b>22.16</b>	<b>22.16</b>	34.59	31.07	<b>26.70</b>	<b>26.21</b>	<b>19.46</b>	<b>24.27</b>	<b>26.21</b>	<b>28.64</b>					
6	MG6227C1873	<b>17.42</b>	30.97	30.32	<b>16.13</b>	<b>29.68</b>	41.29	<b>22.58</b>	34.62	<b>18.68</b>	40.12	34.64	<b>17.58</b>	<b>15.93</b>	<b>24.18</b>	41.76	35.71			
7	MG6932C1873		<b>16.86</b>	<b>15.17</b>				<b>23.03</b>	<b>18.75</b>		<b>16.75</b>									
8	MG6983C1873			<b>15.85</b>				<b>16.38</b>												
9	MG6225C1873			<b>16.27</b>										<b>15.29</b>						
10	MG5743C1873																			



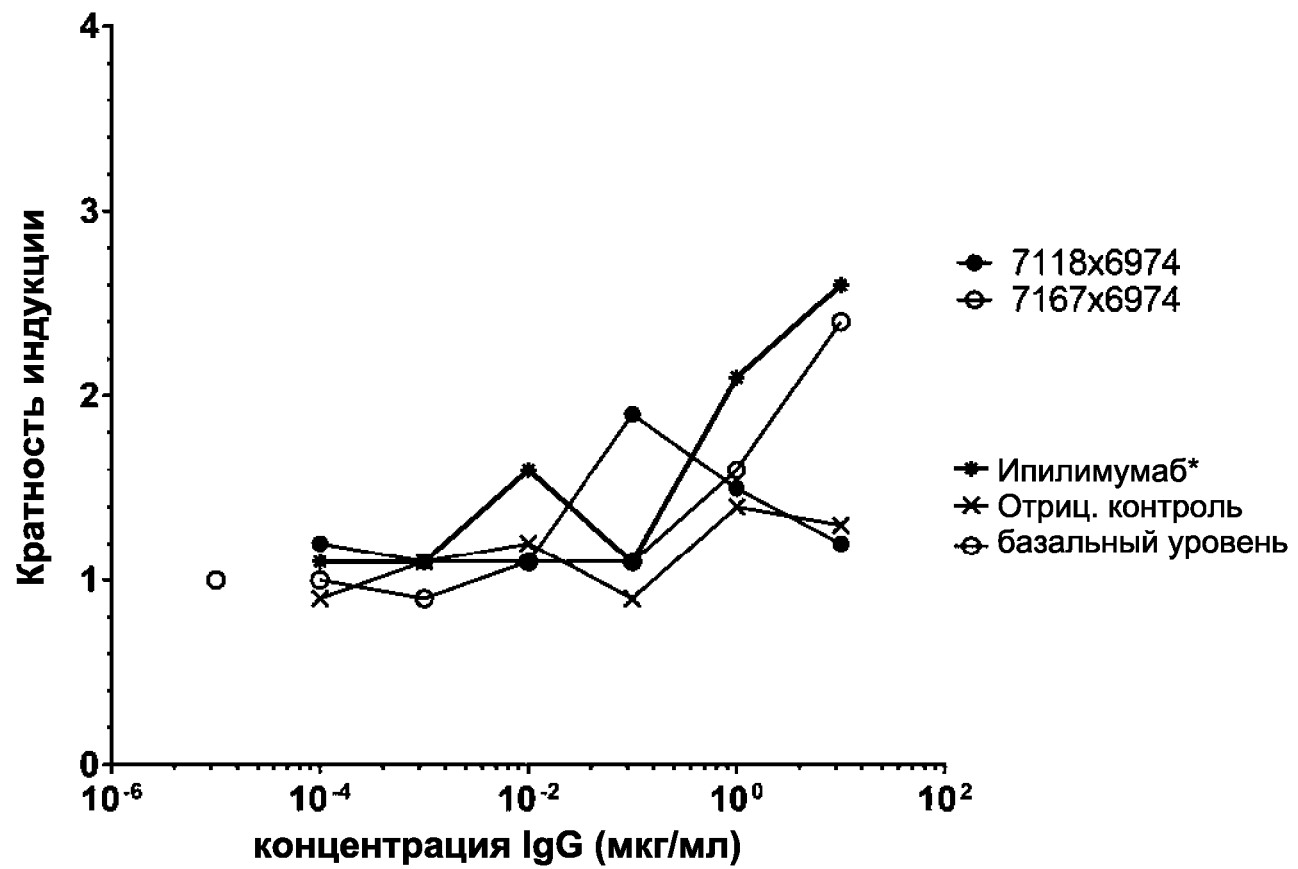
ФИГУРА 19А



ФИГУРА 19В



ФИГУРА 19С



ФИГУРА 20

Репортер 1		1-й MG LAG-3																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
2-й MG PD-1		MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824
1	MG6930C1873	52.22	36.92	89.41	34.26	83.99	81.52		45.04	29.00	44.54	28.09	24.25	86.79	86.23	97.31	21.86		
2	MG6976C1873	44.50	49.11	88.85	80.87	26.12	52.87	64.97	24.54	27.17	44.07	43.44	88.27	44.40	88.74	97.17	24.84		18.79
3	MG6977K1873	24.80	24.78	41.24	12.93	28.24	21.91	50.35	44.09	42.41	26.38	22.30	22.08	45.31	45.31	18.75	17.97		
4	MG6979C1873	37.83	26.72	84.08	28.50	81.17	84.41	21.97	52.54	48.45	44.89	27.68	48.45	55.67	54.22	27.84	25.26		
5	MG6935C1873	26.11	26.11	28.73		22.56	22.56	24.50	21.69	28.70	28.21	28.46	24.27	26.21	28.84				
6	MG6227C1873	37.42	30.97	30.32	14.13	29.88	41.73	22.55	24.62	18.48	49.11	34.84	37.58	18.89	24.18	41.74	25.71		
7	MG6932C1873		16.89	18.17				14.38	18.79		16.79								
8	MG6983C1873																		
9	MG6225C1873			24.27										15.29					
10	MG5743C1873																		

SEB Донор 1		1-й MG LAG-3																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
2-й MG PD-1		MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824
1	MG6930C1873					180.00	180.00		97.64	189.29	128.21		128.21	287.89	148.71	143.99	130.26	119.06	198.24
2	MG6976C1873							153.79	211.18	254.91	99.38	231.82	344.24	244.18	217.27	177.27	231.58	224.71	
3	MG6977K1873	491.11	129.00	540.00	433.11	453.11	512.11	420.00	146.11	182.81	200.00	513.11	200.00	233.04	238.44	208.86	134.81		
4	MG6979C1873	162.30	88.78	162.30	86.80	80.80	125.00	121.80	414.29	292.84	321.41	236.21	524.29	374.97	492.84	302.84	171.48	271.43	178.19
5	MG6935C1873	188.36	30.91	133.79		94.46	86.86	133.79	173.91	188.99	182.61	150.00	152.17	182.61	182.17	95.46	168.23	309.53	119.06
6	MG6227C1873					94.77	167.74			133.19	184.85	548.36	112.17	190.86	154.95	209.09	188.70		216.79
7	MG6932C1873					86.89	122.27					143.11			86.49			123.83	
8	MG6983C1873		94.29							154.84	187.80	148.36		168.06	112.90	138.71	116.15	208.46	
9	MG6225C1873											99.38						124.21	
10	MG5743C1873																	128.21	84.21

SEB Донор 2		1-й MG LAG-3																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
2-й MG PD-1		MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824	MG718K1824
1	MG6930C1873													41.89	81.44		81.96	44.44	89.17
2	MG6976C1873			87.57	37.84	44.39	82.26		37.25		98.82			121.17		37.25	74.47	87.74	
3	MG6977K1873	88.08			48.00		45.00		142.44	111.74	119.22	48.00	107.27	152.17	78.24	47.80	122.17	84.86	
4	MG6979C1873	82.77		37.86	110.14	42.08	37.86	89.57	48.12				90.00	48.78	90.00	82.41	41.46	88.57	40.43
5	MG6935C1873	109.74		48.78	73.17	82.66	41.46	88.54	80.64	42.85	86.22	89.01	75.91	82.19	83.77	46.21	41.56		
6	MG6227C1873	82.19	89.57	76.21		61.70	46.48	88.57	79.17	84.89	41.67		80.42	80.42		54.17	79.17	87.10	
7	MG6932C1873	115.11		89.06	11.82	82.12	48.44	82.88				48.97							
8	MG6983C1873	71.08	86.27	55.43	51.83	43.77		46.39	71.15	62.46	73.24			87.81	61.84	48.08	48.08	87.69	
9	MG6225C1873										41.88				87.47				87.74
10	MG5743C1873								73.64	41.54	88.42			92.11	73.64	129.47	86.79	107.29	

## ФИГУРА 21

Репортер	СЕВ Донор 1	СЕВ Донор 2	Сумма	Среднее
MG6930C1873	3	0	0	3 1.0
MG6076C1873	8	8	2	
MG6974C1873	6	10	8	
MG6973C1873	6	8	1	15 5.0
MG6935C1873	0	1	3	4 1.3
MG6227C1873	3	0	4	7 2.3
MG6932C1873	0	0	1	1 0.3
MG6983C1873	0	0	2	2 0.7
MG6225C1873	0	0	0	0 0.0
MG5743C1873	0	0	6	6 2.0

## ФИГУРА 22

Репортер	SEB Донор 1	SEB Донор 2	Сумма	Среднее	Ранжир.	
MG7518C1624	2	1	2	5	1.7	7
MG7116C1624	1	1	0	2	0.7	
MG7111C1624	1	1	0	2	0.7	
MG7137C1624	0	1	2	3	1.0	
MG7100C1624	0	1	0	1	0.3	
MG7096C1624	2	1	1	4	1.3	10
MG7134C1624	2	1	0	3	1.0	
MG7524C1624	4	2	3			2
MG7142C1624	2	2	2	6	2.0	5
MG7133C1624	4	2	2			3
MG7097C1624	1	2	1	4	1.3	9
MG7185C1624	1	2	3	6	2.0	6
MG7139C1624	3	3	3			1
MG7144C1624	2	3	2			4
MG7106C1624	1	1	0	2	0.7	
MG7120C1624	0	0	5	5	1.7	8
MG7118C1624	0	2	1	3	1.0	
MG7167C1624	0	1	0	1	0.3	

Репортер	SEB Донор 1	SEB Донор 2	Среднее	Среднее	
MG7518C1624	3	2	5		
MG7116C1624	3	1	1	5	1.7
MG7111C1624	4	1	2	7	2.3
MG7137C1624	0	1	2	3	1.0
MG7100C1624	0	1	0	1	0.3
MG7096C1624	2	2	2	6	2.0
MG7134C1624	2	1	1	4	1.3
MG7524C1624	5	2	4		
MG7142C1624	3	5	3		
MG7133C1624	5	5	3		
MG7097C1624	3	2	1	6	2.0
MG7185C1624	2	3	4	9	3.0
MG7139C1624	4	5	3		
MG7144C1624	4	3	3		
MG7106C1624	3	2	3	8	2.7
MG7120C1624	2	2	5	9	3.0
MG7118C1624	0	3	3	6	2.0
MG7167C1624	0	4	0	4	1.3

## ФИГУРА 23

Сведения о клоне
Моноспециф. активность  
(в составе бивалентного IgG)
Результаты скрининга

MF	CDR3	Длина CDR3	Зародышевая линия	% AUC от положит. контроля	Ранжиров. в репортерн. анализе	Ранжирование в SEB анализе
MF6076	GGYTG YGGDW FDP	13	IGHV4-59		1	2
MF6974	PYGSGYFDV	9	IGHV3-23		2/3	1
MF6973	PYGSGYFDV	9	IGHV3-23	39.1	2/3	3
MF6930	GTVEATLLFDY	11	IGHV1-69		4	
MF6227	GGYSGYGGDDFDI	13	IGHV4-59	21.5	5	
MF6935	GTVSGTLVFDY	11	IGHV1-69	32.0		
MF6932	GTVSATLVFDY	11	IGHV1-69	15.9		
MF6983	PYDSGYFDV	9	IGHV3-23	11.1		
MF6225	GGYSGYGGDSMDV	13	IGHV4-59	7.7		
MF5743	AYCSGN SCYTDYFDY	15	IGHV3-13			

ФИГУРА 24

MF	CDR3	Специфичность домена	Активность бивалентного ат (AUC, % от положит. контроля	Связывание с Т-клетками (AUC) моновалент.	EC50 моновалент. (мкг/мл)	Ранжирование в SEB и репортерном анализе
MG7139	DRAIGTLYYFDY	hu D2	20.00	2854	5.71	1
MG7524	GSILAAQMWGDI	hu/мо перекрестно-реакт. – мо D1	29.41	5551	4.2	2
MG7133	DRETGTLYYFDY	hu D2	26.67	4611	11.23	3
MG7144	DRDSGGLYYFDS	hu D2	19.39	1896	10.19	4
MG7142	ERDIGSLYYFDS	hu D2	27.62	5276	3.45	5
MG7185	DREMGTLYFFDQ	hu D2	20.95	2796	4.49	6
MG7518	DGSGWDDFDY	Hu D1 + D4		12450	0.9	7
MG7120	ERELGALYAFDI	hu D2	14.29	1597	66.19	8
MG7097	DLLYKWNYYVEGFDI	hu D1	21.43	5400	2.7	9
MG7096	DLLYKWNYYVEGFDI	hu D1	35.71	5950	1.66	10
MG7111	IPLTGFDY	hu D1		11445	1.52	>10
MG7100	ERGWDVFDI	hu D1	39.80	10615	1.14	>10
MG7134	EPNWGVYFDY	hu D1	34.29	10368	0.49	>10
MG7116	DGDNWDVFDI	hu D1		10307	0.68	>10
MG7137	GGTYYYGSGSYTLDF	hu D1		8588	1.68	>10
MG7106	DKAVAGLYYFDS	hu D2	16.28	2883	26.52	>10
MG7118	VPAAATPSGTYWIFDL	hu D3	2.04	ND	ND	>10
MG7167	DRGYDYSYHNWFDP	hu D4	-1.33	ND	ND	>10
MG7444	DTGQSWSNYYHAFDY	hu/мо перекрестно-реакт. – hu D3	-4.35	ND	ND	ND



ФИГУРА 25

