

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201992145 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.02.12

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

(22) Дата подачи заявки  
2018.04.04

---

(54) АНТИ-PD-L1-АНТИ-TIM-3 БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА

---

(31) 62/484,025

(32) 2017.04.11

(33) US

(86) PCT/US2018/026060

(87) WO 2018/191074 2018.10.18

(71) Заявитель:  
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US);  
ЗАЙМВОРКС ИНК. (СА)

(72) Изобретатель:

Д'Анджело Игор Эдмондо Паоло (СА),  
Ли Ивэнь, Людвиг Дейл Линкольн,  
Шэнь Ян, Чжан И (US)

(74) Представитель:

Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,  
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О.,  
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,  
Лыу Т.Н., Строкова О.В. (RU)

---

(57) Данное изобретение относится к антителам, которые являются гетеродимерными и связывают человеческий PD-L1 и человеческий TIM-3 и могут быть полезны для лечения рака в отдельности и в сочетании с химиотерапией и другими противораковыми терапевтическими средствами.

---

A1

201992145

201992145

A1

## АНТИ-PD-L1-АНТИ-TIM-3 БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА

Данное изобретение относится к области медицины. В частности, данное изобретение относится к биспецифическим антителам, которые связывают лиганд 1 человеческого белка программируемой гибели клеток 1 (PD-L1) и белок-3, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и домен муцина (TIM-3), и могут быть полезны для лечения солидных и гематологических опухолей отдельно и в комбинации с химиотерапией и другими противораковыми терапевтическими средствами.

Опухолевые клетки избегают обнаружения и уничтожения иммунной системой посредством множества механизмов. Пути иммунных контрольных точек используются для поддержания аутоотолерантности и контроля активации Т-клеток, но раковые клетки могут использовать эти пути для подавления противоопухолевого ответа и предотвращения их уничтожения.

Путь PD-L1/белка программируемой гибели клеток 1 (PD-1) является одной из таких иммунных контрольных точек. Человеческий PD-1 обнаруживается на Т-клетках, а PD-L1 aberrантно экспрессируется различными типами опухолей; связывание PD-L1 с PD-1 ингибирует пролиферацию Т-клеток и выработку цитокинов. Ось ингибирования PD-1/PD-L1 используется опухолями как часть естественного селективного процесса, который формирует эволюцию опухоли в контексте противоопухолевого иммунного ответа.

TIM-3 является рецептором контрольной точки, который был определен как играющий ключевую роль в функциональном подавлении истощенных Т-клеток. Т-клетки, распознающие опухолевые антигены, можно выделять из образцов, полученных от пациентов и мышинных моделей, но такие клетки могут демонстрировать истощенный фенотип, характеризующийся нарушением цитотоксических функций, выработки эффекторных цитокинов и пролиферации. Эти Т-клетки могут экспрессировать высокие уровни регулятора контрольных точек TIM-3.

Несмотря на то, что терапевтическое нацеливание на путь PD-1/PD-L1 является клинически валидированным, у больных раком наблюдается переменный объективный ответ, составляющий 9–45% в случае отрицательных по PD-L1 и высокоположительных по PD-L2 опухолей, а многие пациенты не достигают продолжительного ответа. Комбинированное блокирование двух или более рецепторов контрольных точек может увеличить частоту объективных ответов и обеспечить эффективность в случае больных раком, которые могут быть невосприимчивы к монотерапии блокирующим антителом к PD-1 или PD-L1.

Результатом *in vitro* обработки инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, полученных от несущих опухоль СТ26 мышей, двумя антителами, антителом против мышинового TIM-3, которое может взаимодействовать с Т-клетками, и антителом против мышинового PD-L1, которое может отдельно взаимодействовать с мышинными опухолевыми клетками, стал более эффективным контроль роста мышинных опухолей, чем при нацеливании на любой путь в отдельности (Sakuishi et. al. JEM 2010, 207: 2187 и WO 2015/048312).

Сообщалось о пероральной малой молекуле, которая оказывает антагонистическое действие на PD-L1 и TIM-3 (Sasikumar et al., AACR; Cancer Res 2016;76(14 Suppl):Abstract 4861). Сообщалось, что это низкомолекулярное соединение демонстрирует эффективность в сингенных мышинных опухолевых моделях.

Остается потребность в создании соединений, которые могут связывать и ингибировать как человеческий PD-L1, так и человеческий TIM-3, но также обладают целевой специфичностью и фармакокинетикой антитела. В частности, остается потребность в создании гетеродимерных биспецифических антител, которые связывают как человеческий PD-L1, так и человеческий TIM-3, при этом в гетеродимерном биспецифическом антителе обеспечена возможность спаривания двух разных тяжелых цепей и двух разных легких цепей в одно IgG-подобное антитело. Кроме того, существует необходимость в том, чтобы биспецифическое антитело

напоминало структуру нативного антитела, что определяется с помощью моделирования, масс-спектрометрии и анализа стабильности, для таких целей, как низкая иммуногенность, стабильная фармакокинетика *in vivo* и адекватная стабильность. Кроме того, остается потребность в создании биспецифических антител против человеческого PD-L1 и против человеческого TIM-3, которые обладают одной или более из следующих особенностей: одновременно связывают и соединяют экспрессирующие PD-L1 опухолевые клетки и экспрессирующие TIM-3 Т-клетки, подавляют пути ингибиторов контрольных точек PD-1 и TIM-3, проявляют лучшую противоопухолевую активность, определяемую в опухолевой модели, чем комбинация антитела против PD-L1 и антитела против TIM-3, и характеризуются отсутствием иммунных эффекторных функций антитела.

Соответственно, в данном изобретении предложено антитело, которое связывает человеческий PD-L1 (SEQ ID NO: 1) и человеческий TIM-3 (SEQ ID NO: 2), содержащее:

- a) первую тяжелую цепь (HC), содержащую переменную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3,
- b) первую легкую цепь (LC), содержащую переменную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4,
- c) вторую HC, содержащую HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7,
- d) вторую LC, содержащую LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 10;

и при этом первая LC образует межцепочечную дисульфидную связь с первой HC, вторая LC образует межцепочечную дисульфидную связь со второй HC, а первая HC образует две межцепочечные дисульфидные связи

со второй HC, и первая HC и вторая HC принадлежат к изотипу IgG1 человека.

В данном изобретении дополнительно предложено антитело, в котором вторая HC содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, а вторая LC содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В данном изобретении дополнительно предложено антитело, в котором вторая HC содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, а вторая LC содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В данном изобретении дополнительно предложено антитело, в котором вторая HC содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, а вторая LC содержит LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В данном изобретении дополнительно предложено антитело, в котором:

- a) первая HC содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 22,
- b) вторая HC содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 26,
- c) первая LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, а
- d) вторая LC содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

В данном изобретении предложено антитело, которое связывает человеческий PD-L1 (SEQ ID NO: 1) и человеческий TIM-3 (SEQ ID NO: 2), содержащее:

- a) первую HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 22,
- b) первую LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 27,

с) вторую HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 26,

d) вторую LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 28;

5 и при этом первая LC образует межцепочечную дисульфидную связь с первой HC, вторая LC образует межцепочечную дисульфидную связь со второй HC, а первая HC образует две межцепочечные дисульфидные связи со второй HC, и первая HC и вторая HC принадлежат к изотипу IgG1 человека.

10 В данном изобретении предложено антитело, которое связывает человеческий PD-L1 (SEQ ID NO: 1) и человеческий TIM-3 (SEQ ID NO: 2), содержащее:

a) первую HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 22,

15 b) первую LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 27,

c) вторую HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 26,

20 d) вторую LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 28;

и при этом первая LC образует межцепочечную дисульфидную связь с первой HC, вторая LC образует межцепочечную дисульфидную связь со второй HC, а первая HC образует две межцепочечные дисульфидные связи со второй HC, и первая HC и вторая HC принадлежат к изотипу IgG1 человека.

25 В данном изобретении предложено антитело, которое связывает человеческий PD-L1 (SEQ ID NO: 1) и человеческий TIM-3 (SEQ ID NO: 2), содержащее:

30 a) первую HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 22,

- b) первую LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 27,
- c) вторую HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 26,
- 5 d) вторую LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 28;

и при этом первая LC образует межцепочечную дисульфидную связь с первой HC, вторая LC образует межцепочечную дисульфидную связь со второй HC, а первая HC образует две межцепочечные дисульфидные связи со второй HC, и первая HC и вторая HC принадлежат к изотипу IgG1 человека.

В данном изобретении дополнительно предложено антитело, которое связывает человеческий PD-L1 (SEQ ID NO: 1) и человеческий TIM-3 (SEQ ID NO: 2), в котором:

- 15 a) первая HC содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21, а
- b) вторая HC содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25.

Для SEQ ID NO: 19–28 в Таблице 1 показано, где указанные последовательности имеют соответствие с антителом. Для SEQ ID NO: 3–10 в Таблице 2 показано, где указанные последовательности имеют соответствие с антителом.

В данном изобретении предложено антитело, которое связывает человеческий PD-L1 (SEQ ID NO: 1) и человеческий TIM-3 (SEQ ID NO: 2), содержащее две легкие цепи (LC) и две тяжелые цепи (HC), при этом:

- a) первая LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12,
- b) первая HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11,
- 30 c) вторая LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18, и

d) вторая HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15.

В данном изобретении предложено антитело, содержащее две легкие цепи (LC) и две тяжелые цепи (HC), при этом:

5 a) первая LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12,

b) первая HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11,

10 c) вторая LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18, и

d) вторая HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15.

В данном изобретении предложено антитело, которое связывает человеческий PD-L1 (SEQ ID NO: 1) и человеческий TIM-3 (SEQ ID NO: 2),  
15 содержащее две легкие цепи (LC) и две тяжелые цепи (HC), при этом:

a) первая LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, а первая HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и

20 b) вторая LC и вторая HC имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 15, соответственно.

В данном изобретении дополнительно предложено антитело, в котором вторая LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, а вторая HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.

В данном изобретении дополнительно предложено антитело, в котором вторая LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, а вторая HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В данном изобретении дополнительно предложено антитело, в котором  
30 вторая LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, а вторая HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

В данном изобретении предложено полу-антитело, которое связывает человеческий PD-L1 (SEQ ID NO: 1), содержащее LC и HC, при этом LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, а HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

5 В данном изобретении предложено полу-антитело, которое связывает человеческий TIM-3 (SEQ ID NO: 2), содержащее LC и HC, при этом LC и HC имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO : 13, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 15, соответственно.

10

15

20

25

30

**Таблица 1: Последовательности, картированные в области тяжелой цепи или легкой цепи IgG1**

<b>SEQ ID NO</b>	<b>Область</b>	<b>Аминокислотные позиции антитела С, которые имеют соответствие с последовательностью</b>
19	CH1	128–190 тяжелой цепи антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 11)
20	CH2	237–271 тяжелой цепи антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 11)
21	CH2	330–340 тяжелой цепи антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 11)
22	CH3	350–410 тяжелой цепи антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 11)
23	CH1	128–190 тяжелой цепи антитела к TIM-3 (SEQ ID NO: 15)
24	CH2	231–265 тяжелой цепи антитела к TIM-3 (SEQ ID NO: 15)
25	CH2	330–340 тяжелой цепи антитела к TIM-3 (SEQ ID NO: 15)
26	CH3	350–410 тяжелой цепи антитела к TIM-3 (SEQ ID NO: 15)
27	CL	131–181 легкой цепи антитела к PD-L1 (SEQ ID NO: 12)
28	CL	131–181 легкой цепи антитела к TIM-3 (SEQ ID NO: 18)

В данном изобретении предложена клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 18, при этом указанная клетка способна экспрессировать антитело по данному изобретению.

В данном изобретении предложена клетка млекопитающего, содержащая первую молекулу ДНК и вторую молекулу ДНК, причем первая молекула ДНК содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, а вторая молекула ДНК содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 18, при этом указанная клетка способна экспрессировать антитело по данному изобретению.

В данном изобретении предложена клетка млекопитающего, содержащая первую молекулу ДНК, вторую молекулу ДНК, третью молекулу ДНК и четвертую молекулу ДНК, причем первая молекула ДНК содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO : 11, вторая молекула ДНК содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, третья молекула ДНК содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, а четвертая молекула ДНК содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, при этом указанная клетка способна экспрессировать антитело по данному изобретению.

В данном изобретении предложен способ получения антитела по данному изобретению, включающий культивирование клетки млекопитающего по данному изобретению в условиях, в которых происходит экспрессия антитела, и выделение экспрессированного антитела.

В данном изобретении предложено антитело, полученное способом по данному изобретению.

В данном изобретении предложено антитело, полученное путем культивирования клетки млекопитающего, содержащей молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 18 в условиях, в которых происходит экспрессия антитела, и выделение экспрессированного антитела.

В данном изобретении предложен антитело, полученное путем культивирования клетки млекопитающего, содержащей первую молекулу ДНК и вторую молекулу ДНК, причем первая молекула ДНК содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, а вторая молекула ДНК содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 18 в условиях, в которых происходит экспрессия антитела, и выделение экспрессированного антитела.

В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело по данному изобретению и приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела по данному изобретению. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела по данному изобретению, при этом рак представляет собой меланому, рак легкого, рак головы и шеи, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак эндометрия, рак пищевода, саркому мягких тканей, холангиокарциному или гепатоцеллюлярную карциному.

В данном изобретении предложен способ лечения рака, при этом рак представляет собой меланому. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, при этом рак представляет собой рак легкого. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения

5 рака, при этом рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого или мезотелиому. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, при этом рак представляет собой рак головы и шеи. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, при этом рак представляет

10 собой рак печени. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, при этом рак представляет собой колоректальный рак. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, при этом рак представляет собой рак поджелудочной железы. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, при этом рак

15 представляет собой рак желудка. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, при этом рак представляет собой рак почки. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, при этом рак представляет собой рак мочевого пузыря. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, при этом рак

20 представляет собой рак предстательной железы. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, при этом рак представляет собой рак молочной железы. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, при этом рак представляет собой рак яичника. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения

25 рака, при этом рак представляет собой рак эндометрия. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, при этом рак представляет собой рак пищевода. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, при этом рак представляет собой саркому мягких тканей. В данном изобретении дополнительно предложен способ

30 лечения рака, при этом рак представляет собой холангиокарциному. В

данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, при этом рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному.

В данном изобретении дополнительно предложены способы, включающие введение эффективного количества антитела по данному изобретению одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с одним или более соответствующими стандарту лечения агентами, выбранными из группы, состоящей из цисплатина, карбоплатина, дакарбазина, липосомального доксорубина, доцетаксела, циклофосфамида и доксорубина, навелбина, эрибулина, паклитаксела, связанных с белками частиц паклитаксела для инъекционной суспензии, иксабепилона, капецитабина, FOLFOX (лейковорин, фторурацил и оксалиплатин), FOLFIRI (лейковорин, фторурацил и иринотекан), гемцитабина, топотекана, липосомального иринотекана, пеметрекседа и цетуксимаба.

В данном изобретении дополнительно предложены способы, включающие введение эффективного количества антитела по данному изобретению одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с одним или более противоопухолевыми агентами, выбранными из группы, состоящей из ниволумаба, ипилимумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, тремелизумаба, урелумаба, лирилумаба, атезолизумаба, эпакадостата и дурвалумаба.

В данном изобретении дополнительно предложены способы, включающие введение эффективного количества антитела по данному изобретению одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с ионизирующим излучением.

В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения в терапии. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при лечении рака. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при лечении рака, при этом рак представляет собой меланому, рак легкого, рак головы и шеи, рак печени, колоректальный

рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак эндометрия, рак пищевода, саркому мягких тканей, холангиокарциному или гепатоцеллюлярную карциному.

5 В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при лечении меланомы. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при лечении рака легкого. В данном изобретении дополнительно предложено антитело по данному изобретению, при этом  
10 рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого или мезотелиому. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при лечении рака головы и шеи. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при лечении рака печени. В данном  
15 изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при лечении колоректального рака. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при лечении рака поджелудочной железы. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при лечении рака  
20 желудка. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при лечении рака почки. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при лечении рака мочевого пузыря. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при  
25 лечении рака предстательной железы. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при лечении рака молочной железы. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при лечении рака яичника. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для  
30 применения при лечении рака эндометрия. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при

лечении рака пищевода. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при лечении саркомы мягких тканей. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при лечении холангиокарциномы. В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения при лечении гепатоцеллюлярной карциномы.

В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с одним или более соответствующими стандарту лечения агентами, выбранными из группы, состоящей из цисплатина, карбоплатина, дакарбазина, липосомального доксорубина, доцетаксела, циклофосфида и доксорубина, навелбина, эрибулина, паклитаксела, связанных с белками частиц паклитаксела для инъекционной суспензии, иксабепилона, капецитабина, FOLFOX (лейковорин, фторурацил и оксалиплатин), FOLFIRI (лейковорин, фторурацил и иринотекан), гемцитабина, топотекана, липосомального иринотекана, пеметрекседа и цетуксимаба, при лечении рака.

В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с одним или более противоопухолевыми агентами, выбранными из группы, состоящей из ниволумаба, ипилимумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, тремелизумаба, урелумаба, лирилумаба, атезолизумаба, эпикадостата и дурвалумаба, при лечении рака.

В данном изобретении предложено антитело по данному изобретению для применения одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с ионизирующим излучением при лечении рака.

В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении рака, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении

рака, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению, при этом рак представляет собой меланому, рак легкого, рак головы и шеи, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак эндометрия, рак пищевода, саркому мягких тканей, холангиокарциному или гепатоцеллюлярную карциному. В данном изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении рака, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению, при этом рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого или мезотелиому.

В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении меланомы, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении рака легкого, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении рака головы и шеи, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении рака печени, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении колоректального рака, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении рака поджелудочной железы, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении рака желудка, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для

применения при лечении рака почки, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении рака мочевого пузыря, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении рака предстательной железы, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении рака молочной железы, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении рака яичника, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении рака эндометрия, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении рака пищевода, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении саркомы мягких тканей, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении холангиокарциномы, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении гепатоцеллюлярной карциномы, содержащая эффективное количество антитела по данному изобретению.

В данном изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении рака, при этом указанную фармацевтическую композицию вводят одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с одним или более соответствующими стандарту лечения агентами, выбранными из группы,

состоящей из цисплатина, карбоплатина, дакарбазина, липосомального доксорубицина, доцетаксела, циклофосфамида и доксорубицина, навелбина, эрибулина, паклитаксела, связанных с белками частиц паклитаксела для инъекционной суспензии, иксабепилона, капецитабина, FOLFOX (лейковорин, фторурацил и оксалиплатин), FOLFIRI (лейковорин, фторурацил и иринотекан), гемцитабина, топотекана, липосомального иринотекана, пеметрекседа и цетуксимаба.

В данном изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении рака, при этом указанную фармацевтическую композицию вводят одновременно, 10  
раздельно или последовательно в комбинации или с одним или более противоопухолевыми агентами, выбранными из группы, состоящей из ниволумаба, ипилимумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, тремелимумаба, урелумаба, лирилумаба, атезолизумаба, эпакадостата и дурвалумаба. 15

В данном изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция для применения при лечении рака, при этом указанную фармацевтическую композицию вводят одновременно, 20  
раздельно или последовательно в комбинации с ионизирующим излучением.

В данном изобретении предложено применение антитела по данному изобретению для производства лекарственного средства для лечения рака. В данном изобретении дополнительно предложено применение антитела по 25  
данному изобретению для производства лекарственного средства для лечения рака, при этом рак представляет собой меланому, рак легкого, рак головы и шеи, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак эндометрия, рак пищевода, саркому мягких тканей, холангиокарциному или гепатоцеллюлярную карциному. В 30  
данном изобретении дополнительно предложено применение антитела по данному изобретению для производства лекарственного средства для

лечения рака, при этом рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого или мезотелиому.

В данном изобретении дополнительно предложено применение антитела по данному изобретению для производства лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное лекарственное средство  
5 следует вводить одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с одним или более соответствующими стандарту лечения агентами, выбранными из группы, состоящей из цисплатина, карбоплатина, дакарбазина, липосомального доксорубицина, доцетаксела,  
10 циклофосфамида и доксорубицина, навелбина, эрибулина, паклитаксела, связанных с белками частиц паклитаксела для инъекционной суспензии, иксабепилона, капецитабина, FOLFOX (лейковорин, фторурацил и оксалиплатин), FOLFIRI (лейковорин, фторурацил и иринотекан), гемцитабина, топотекана, липосомального иринотекана, пеметрекседа и  
15 цетуксимаба.

В данном изобретении дополнительно предложено применение антитела по данному изобретению для производства лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное лекарственное средство  
20 следует вводить одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с одним или более противоопухолевыми агентами, выбранными из группы, состоящей из ниволумаба, ипилимумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, тремелиумаба, урелумаба, лирилумаба, атезолизумаба, эпакадостата и дурвалумаба.

В данном изобретении предложено применение антитела по данному  
25 изобретению для производства лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с ионизирующим излучением.

Антитело по данному изобретению представляет собой  
30 сконструированный, не встречающийся в природе полипептидный комплекс. Молекула ДНК по данному изобретению представляет собой не

встречающуюся в природе молекулу ДНК, которая содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность одного из полипептидов в антителе по данному изобретению.

5 Антитело по данному изобретению представляет собой антитело типа IgG и имеет «тяжелые» цепи и «легкие» цепи, которые перекрестно сшиты внутри- и межцепочечными дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из N-концевой HCVR и константной области тяжелой цепи («HCCR»). Каждая легкая цепь состоит из LCVR и константной области легкой цепи («LCCR»). Каждая легкая цепь образует дисульфидные связи с тяжелой цепью, а две тяжелые цепи образуют две дисульфидные связи между собой.

Константная область тяжелых цепей содержит домены CH1, CH2 и CH3. CH1 идет после HCVR; CH1 и HCVR образуют часть тяжелой цепи Fab. CH2 идет после шарнирной области и перед CH3. CH3 идет после CH2 и находится в карбокси-конце тяжелой цепи.

Константная область легких цепей содержит один домен, CL. CL идет после LCVR; CL и LCVR образуют часть легкой цепи Fab.

Антитела по данному изобретению являются гетеродимерными в том смысле, что каждое плечо антитела проявляет селективное моновалентное связывание со своим распознаваемым антигеном благодаря наличию двух разных тяжелых цепей и двух разных легких цепей, образующих антитело. В данном изобретении одно плечо антитела связывает человеческий PD-L1 (SEQ ID NO: 1), а другое плечо связывает человеческий TIM-3 (SEQ ID NO: 2). Чтобы гарантировать правильную сборку этих биспецифических антител, в последовательность тяжелых цепей в пределах областей CH1 и CH3 и в последовательность легких цепей в пределах константной области легкой цепи вводят мутации. Мутации CH1 и LC вводят для того, чтобы стимулировать нативное спаривание необходимых пар легких цепей и тяжелых цепей и препятствовать ошибочному спариванию легких цепей. Мутации CH3 вводят для того, чтобы стимулировать гетеродимерное

спаривание двух различных тяжелых цепей и препятствовать образованию гомодимеров. Мутации в CH3-области анти-PD-L1 части антитела предпочтительно включают позиции 356, 372, 398 и 400, пронумерованные по абсолютной позиции в SEQ ID NO: 11 (позиции 350, 366, 392 и 394 при применении нумерации EU). Мутации в CH3-области анти-TIM-3 части антитела предпочтительно включают позиции 350, 351, 356, 405 и 407, пронумерованные по абсолютной позиции в SEQ ID NO: 15 (позиции 350, 351, 405 и 407 при применении нумерации EU). Мутации в CH1-области анти-PD-L1 части антитела предпочтительно включают позицию 189, пронумерованную по абсолютной позиции в SEQ ID NO: 11 (позиция 183, при применении нумерации EU). Мутации в CH1-области анти-TIM-3 части антитела предпочтительно включают позиции 128, 147, 175 и 183, пронумерованные по абсолютной позиции в SEQ ID NO: 15 (позиции 128, 147, 175 и 183 при применении нумерации EU).

Мутации в CL-области анти-PD-L1 части антитела предпочтительно включают позиции 179 и 181, пронумерованные по абсолютной позиции в SEQ ID NO: 11 (позиции 176 и 178, при применении нумерации EU). Мутации в CL-области анти-TIM-3 части антитела предпочтительно включают позиции 131, 133, 176 и 178, пронумерованные по абсолютной позиции в SEQ ID NO: 15 (позиции 131, 133, 176 и 178 при применении нумерации EU).

В некоторых антителах по данному изобретению мутации, связанные с гетеродимерным спариванием тяжелых цепей, приводят термостабильности CH3 более 80° C, что сравнимо с нативными антителами (Таблица 1 и Von Kreudenstein, et al., 2014).

При экспрессии в определенных биологических системах антитела, имеющие Fc-последовательности, гликозилированы в Fc-области. Как правило, гликозилирование происходит в Fc-области антитела в высококонсервативном сайте N-гликозилирования. N-гликаны, как правило, присоединяются к аспарагину. Антитела могут быть гликозилированы и в других позициях.

Необязательно, некоторые антитела по данному изобретению содержат Fc-часть, которая получена из человеческого IgG<sub>1</sub>. Хорошо известно, что IgG<sub>1</sub> связываются с белками семейства Fc-гамма-рецепторов (FcγR), а также C1q. Взаимодействие с этими рецепторами может индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ). Следовательно, в случае определенных антител по данному изобретению, включая антитело А, В и С, вводят определенные аминокислотные замены в Fc IgG<sub>1</sub> для устранения иммунной эффекторной функции. Мутации в CH<sub>2</sub>-области анти-PD-L1 части антитела могут включать позиции 240, 241 и 271, пронумерованные по абсолютной позиции в SEQ ID NO: 11 (позиции 234, 235 и 265, при применении нумерации EU). Мутации в CH<sub>2</sub>-области анти-TIM-3 части антитела могут включать позиции 234, 235 и 265, пронумерованные по абсолютной позиции в SEQ ID NO: 15 (позиции 234, 235 и 265, при применении нумерации EU).

Выделенную ДНК, кодирующую область HCVR, можно преобразовать в полноразмерный ген тяжелой цепи путем функционального связывания кодирующей HCVR ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи. Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека, а также других млекопитающих известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получать, *например*, с помощью стандартной ПЦР-амплификации.

Выделенную ДНК, кодирующую область LCVR, можно преобразовать в полноразмерный ген легкой цепи путем функционального связывания кодирующей LCVR ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи. Последовательности генов константной области легкой цепи человека, а также других млекопитающих известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получать с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа или лямбда. Предпочтительно в случае антител по данному изобретению

константная область легкой цепи анти-PD-L1 части антитела представляет собой легкую цепь лямбда, а константная область легкой цепи анти-TIM-3 части антитела представляет собой легкую цепь каппа.

Полинуклеотиды по данному изобретению экспрессируются в клетке-  
5 хозяине после функционального связывания последовательностей с последовательностью контроля экспрессии. Экспрессионные векторы, как правило, пригодны для репликации в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде неотъемлемой части хромосомной ДНК хозяина. Обычно экспрессионные векторы содержат селективные маркеры,  
10 например тетрациклина, неомицина и дигидрофолатредуктазы, чтобы обеспечить возможность обнаружения тех клеток, которые трансформированы необходимыми последовательностями ДНК.

Антитело по данному изобретению легко можно получать в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO, NS0, HEK293 или COS. Клетки-  
15 хозяев культивируют, используя методики, хорошо известные в данной области техники.

Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотидные последовательности (например, полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антитела, и последовательности контроля экспрессии), можно переносить в  
20 клетку-хозяина хорошо известными способами, которые варьируются в зависимости от типа клеточного хозяина.

Можно применять различные способы очистки белка, которые известны в данной области техники и описаны, например, в Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-89 (1990) и Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Edition, Springer, NY (1994).  
25

В другом варианте реализации данного изобретения антитело или кодирующие его нуклеиновые кислоты предоставлены в выделенной форме. В контексте данного документа термин «выделенный» относится к белку, пептиду или нуклеиновой кислоте, которые не содержат или по  
30 существу не содержат любые другие макромолекулярные компоненты, обнаруживаемые в клеточной среде. В контексте данного документа термин

«по существу не содержат» означает, что представляющие интерес белок, пептид или нуклеиновая кислота содержат более 80% (в мольном отношении) макромолекулярных компонентов, предпочтительно более 90% и более предпочтительно более 95%.

5            Антитело по данному изобретению или содержащее его фармацевтические композиции, можно вводить парентеральными путями (например, подкожным и внутривенным). Антитело по данному изобретению можно вводить пациенту отдельно с фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или наполнителями в однократной или  
10 многократных дозах. Фармацевтические композиции по данному изобретению можно получать способами, хорошо известными в данной области техники (например, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 22<sup>nd</sup> ed. (2012), A. Loyd et al., Pharmaceutical Press), и они содержат антитело, описанное в данном документе, и один или более  
15 фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или наполнителей.

          Термин «лечение» (или «лечить», или «процесс лечения») относится к замедлению, прерыванию, приостановке, облегчению, прекращению, уменьшению или обращению прогрессирующего или тяжести существующего симптома, нарушения, патологического состояния или  
20 заболевания.

          В контексте данного документа предполагается, что термин «связывать» в отношении аффинности антитела к человеческому PD-L1 (SEQ ID NO: 1), человеческому TIM-3 (SEQ ID NO: 2) или к ним обоим обозначает, если не указано иное,  $K_d$  менее чем около  $1 \times 10^{-6}$  М, предпочтительно, менее чем около  $1 \times 10^{-9}$  М, согласно определению  
25 обычными способами, известными в данной области техники, включая применение биосенсора для поверхностного плазмонного резонанса (ППР) при 37°C в целом, как описано в данном документе.

          «Эффективное количество» означает количество антитела по  
30 данному изобретению или фармацевтической композиции, содержащей антитело по данному изобретению, которое вызывает биологический или

5 медицинский ответ или необходимый терапевтический эффект в ткани, системе, организме животного, млекопитающего или человека, который предполагается исследователем, врачом или другим медицинским работником. Эффективное количество антитела может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивида, а также от способности антитела вызывать необходимый ответ у индивида. Эффективное количество также является таким, при котором любой токсический или вредный эффект антитела перевешивается терапевтически благоприятными эффектами.

10 Данное изобретение дополнительно проиллюстрировано следующим неограничивающим примером.

### **Пример 1: Экспрессия и очистка антител**

15 Полипептиды переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, полные аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антитела А, антитела В и антитела С и кодирующие их нуклеотидные последовательности, перечислены ниже в разделе разделе, озаглавленном «Аминокислотные и нуклеотидные последовательности». Кроме того, SEQ ID NO для легкой цепи, тяжелой цепи, переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи антитела А, В и С приведены в Таблице 2.

20 Антитела по данному изобретению, включая, но не ограничиваясь ими, антитело А, антитело В и антитело С, можно получать и очищать в целом следующим образом. Соответствующую клетку-хозяина, такую как CHO, можно временно или стабильно трансфицировать экспрессионной системой для секреции антител, используя четырехкомпонентный вектор, двойные векторы или четыре отдельных вектора в соотношении 20HC анти-TIM-3 : 10HC анти-PD-L1 : 24LC анти-TIM-3: 46LC анти-PD-L1. SEQ ID NO: 29 – SEQ ID NO: 32 представляют собой последовательности ДНК для 25 легких цепей и тяжелых цепей антитела С; легкая цепь антитела к PD-L1 имеет внутренний интрон для повышения уровней экспрессии относительно

легкой цепи TIM-3. Осветленную среду, в которую происходила секреция антитела, можно очищать, используя любой из многих обычно применяемых способов. Например, в случае фрагмента Fab среду удобно наносить на колонку MabSelect (GE Healthcare) или колонку KappaSelect (GE Healthcare), уравновешенную совместимым буфером, таким как фосфатно-солевой буферный раствор (pH 7,4). Колонку можно промывать для удаления неспецифических связывающих компонентов. Связанное антитело можно элюировать, например, градиентом pH (например, от 20 mM Трис-буфера, pH 7, до 10 mM цитратного натриевого буфера, pH 3,0, или от фосфатно-солевого буферного раствора, pH от 7,4, до 100 mM глицинового буфера, pH 3,0). Обнаружение фракций антител можно проводить, например, с помощью ДСН-ПААГ, а затем проводить их объединение. Растворимые агрегаты и мультимеры можно эффективно удалять обычными способами, включая эксклюзионную, с гидрофобным взаимодействием, ионообменную, мультимодальную или гидроксипатитную хроматографию. Антитело можно концентрировать и/или стерильно фильтровать, используя обычные методики. Продукт можно незамедлительно замораживать при -70° С или можно лиофилизировать.

20 **Таблица 2: SEQ ID NO (номера последовательностей)**

	Антитело А	Антитело В	Антитело С
HCVR1 – анти-PD-L1	3	3	3
HCVR2 – анти-TIM-3	5	6	7
LCVR1 – анти-PD-L1	4	4	4
LCVR2 – анти-TIM-3	8	9	10
Тяжелая цепь 1 – анти-PD-L1	11	11	11
Тяжелая цепь 2 – анти-TIM-3	13	14	15
Легкая цепь 1 – анти-	12	12	12

PD-L1			
Легкая цепь 2 – анти- TIM-3	16	17	18

### **Методы анализа**

#### **5 *In vitro* связывание антител**

В случае гетеродимерного биспецифического антитела одно плечо антитела (одна легкая цепь и одна тяжелая цепь) моновалентно связывает один антиген, а второе плечо антитела (одна легкая цепь и одна тяжелая цепь) моновалентно связывает второй антиген. Способность антител по  
10 данному изобретению поддерживать сопоставимое связывание с каждым антигеном по сравнению с родительскими антителами, которые бивалентно связывают антиген, можно оценить с помощью анализа Biacore.

Кинетику и аффинность связывания антитела С и его родительских антител с соответствующими антигенами TIM-3 и PD-L1 анализировали  
15 методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР), используя биосенсорный инструмент Biacore T200 (GE Healthcare) при 37° С. Человеческий Fab иммобилизовали на сенсорном чипе CM5, используя аминное сопряжение, с уровнем иммобилизации от 7000 до 9000 ЕО. Образцы антител разбавляли в буфере HBS-EP+ и вводили со скоростью  
20 потока 30 мкл/мин. Затем в течение 180 секунд вводили серийные концентрации человеческого антигена TIM-3 с одним плечом (TIM-3-SAG) и Fc-меченного PD-L1 (PD-L1-Fc) с последующей диссоциацией в течении 1200 секунд. Сенсограммы оценивали, используя оценочное программное обеспечение 3.0 Biacore T200, а в основе расчета констант скорости ассоциации (Касс.) и диссоциации (Кдисс.) лежала модель связывания  
25 Ленгмюра 1:1. Равновесную константу диссоциации (КД) или константу аффинности связывания рассчитывали из соотношения кинетических констант скорости Кдисс./Касс.

Моновалентное связывание антигена с PD-L1 в случае Fab антитела А составляло  $6,5 \times 10^{-10}$  М и было сравнимо с бивалентным связыванием PD-L1 со стороны Fab родительского анти-PD-L1 антитела. Моновалентное связывание PD-L1 Fab антител В и С также было сопоставимо с Fab  
5 родительского анти-PD-L1 антитела.

Моновалентное связывание антигена с TIM-3 в случае Fab антитела А составляло  $2,53 \times 10^{-9}$  М и было приблизительно в 33 раза ниже, чем аффинность бивалентного связывания родительского анти-TIM-3 антитела. Fab антитела В характеризовался Кдисс.  $1,91 \times 10^{-10}$  М против TIM-3, а Fab  
10 антитела С характеризовался Кдисс.  $1,11 \times 10^{-10}$  М против TIM-3. Моновалентное связывание Fab антитела В характеризовалось в три раза меньшей аффинностью по сравнению с аффинностью двухвалентного связывания родительского анти-TIM-3 антитела, тогда как моновалентное связывание Fab антитела С было сопоставимо с аффинностью  
15 бивалентного связывания родительского антитела.

### **Термостабильность**

В случае гетеродимерного биспецифического антитела необходимо спаривание двух разных тяжелых цепей и избирательное спаривание  
20 родственных легких цепей с каждой соответствующей тяжелой цепью. Способность антител по данному изобретению сохранять стабильность, сравнимую с нативным антителом, можно исследовать с помощью анализа ДСК.

Исследования проводили при концентрации 1 мг/мл в ФСБ, используя  
25 ДСК MicroCal VP-Capillary (серийный № 11.05083.CAP). Все образцы сканировали в температурном диапазоне 25-100° С со скоростью сканирования 60° С/час. Во время каждого сканирования растворы находились под давлением около 60 фунтов на кв. дюйм в капиллярах. Для каждого белка скан буфер/буфер вычитали из скана буфер/белок и  
30 нормализовали термограмму по концентрации белка. Делали поправку на

фон, а среднюю точку для каждого случая термической денатурации ( $T_m$ ) получали из максимумов пиков.

В экспериментах, проведенных в целом, как описано в этом анализе, ДСК-анализ антитела С продемонстрировал термическую стабильность (5  $T_{m1}$  67°C,  $T_{m2}$  76°C,  $T_{m3}$  83°C) с температурами разворачивания, сопоставимыми с родительскими антителами (анти-PD-L1 Ab:  $T_{m1}$  67°C,  $T_{m2}$  75°C,  $T_{m3}$  82 °C, анти-TIM-3 Ab:  $T_{m1}$  64°C,  $T_{m2}$  85°C).

### 10 **Одновременное связывание с PD-L1 и TIM-3, измеренное с помощью ИФА**

Способность антител по данному изобретению одновременно связывать PD-L1 и TIM-3 можно определять в сэндвич-анализе ИФА. Чтобы исследовать связывание антител по данному изобретению с TIM-3 белок TIM-3-Fc можно наносить на планшет, но сигнал генерируется только в том (15 случае, если связанные с планшетом антитела также связывают растворимый биотинилированный PD-L1-Fc.

Для анализа связывания, 96-луночный (Immulon 2HB) планшет покрывали 50 мкл/лунку 1 мкг/мл человеческого TIM-3-Fc при 4°C в течение ночи. Затем планшет трижды промывали ФСБ, содержащим 0,2% Твин-20, и (20 блокировали 250 мкл/лунку ФСБ с 3% БСА в течение 1 ч при комнатной температуре. Блокирующий буфер удаляли и добавляли в планшет 50 мкл титрованных антител, начиная с 200 нМ, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем планшет трижды промывали ФСБ, содержащим 0,2% Твин-20, и добавляли 50 мкл 100 нг/мл биотина (25 человеческого PD-L1 и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшет трижды промывали ФСБ, содержащим 0,2% Твин-20, и добавляли 50 мкл Strep HRP (Jackson Immuno 106-030-084), разведенного 1:5000, и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшет трижды промывали ФСБ, содержащим 0,2% (30 Твин-20, и обрабатывали, используя 100 мкл/лунку 1:1 раствора субстрата ТМБ А и В (KPL) в течение 10 минут при комнатной температуре. Реакцию

останавливали с помощью 100 мкл/лунку 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и считывали на планшет-ридере Spectramax. По данным строили график, используя GraphPad Prism.

5 В экспериментах, проведенных в целом, как описано в этом анализе, антитело С давало сигнал, который возрастал с концентрацией антитела С, демонстрируя, что в этих условиях антитело С связывает человеческие PD-L1 и TIM-3 одновременно. Контрольное антитело TIM-3 в отдельности давало только фоновый сигнал.

#### 10 **Антитело С одновременно связывается с мишенями PD-L1 и TIM-3 на поверхности клетки**

Способность антител по данному изобретению одновременно задействовать белки TIM-3 и PD-L1 на клеточной поверхности можно исследовать в репортерном анализе с живыми клетками для определения ассоциации гетеротипических рецепторов (АГР) TIM-3:PD-L1 (DiscoverX, Fremont, CA). Анализ АГР основан на комплементации фрагментов фермента и в нем используются два рекомбинантные фрагмента β-галактозидазы, которые по отдельности являются каталитически неактивными и демонстрируют небольшую аффинность в отношении друг друга. При добавлении в качестве партнеров по слиянию к белкам, которые связывают друг друга, эти два фрагмента можно сблизить настолько, чтобы восстановить функциональный фермент β-галактозидазу. Активность фермента отслеживают по свету, генерируемому при расщеплении хемилюминесцентного субстрата.

25 Для анализа клетки U2OS последовательно трансфицировали конструкциями, кодирующими TIM-3 (1-223)-PK и PD-L1 (1-259)-EA (PK = фрагмент β-галактозидазы ProLink, EA = фрагмент ферментного акцептора). Клетки U2OS были выбраны за их способность допускать эктопическую экспрессию мембранного белка, а конструкции TIM-3, PD-L1 были сконструированы для устранения большинства внутриклеточных доменов и

потенциальных осложнений, таких как интернализация рецепторов и индуцированная сигналом кластеризация.

Клетки из стабильных пулов U2OS TIM-3 (1-223)-PK PD-L1 (1-259)-EA высевали в четырех повторностях в 384-луночные планшеты (5000  
5 клеток/лунку). Ряд разведений антитела С и соответствующих родительских анти-TIM-3 и анти-PD-L1 антител добавляли к клеткам и инкубировали в течение ночи (16 часов) при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Затем к клеткам добавляли реагенты для обнаружения, содержащие лизисный буфер и ферментный субстрат, и считывали планшет на люминометре Envision.

10 В экспериментах, проводимых в целом так, как описано в этом анализе, антитело С вызывает титруемое увеличение сигнала с EC50, составляющей приблизительно 2 нМ, тогда как соответствующие моноклональные антитела с единичной специфичностью к TIM-3 и PD-L1 полностью неактивны. Эти данные показывают, что в этих условиях  
15 антитело С может одновременно взаимодействовать как с TIM-3, так и с PD-L1 на клеточной поверхности.

### **Антитело С соединяет клетки, экспрессирующие TIM-3, с клетками, экспрессирующими PD-L1**

20 Способность антител по данному изобретению соединять клетки, экспрессирующие TIM-3 и PD-L1, можно определить с помощью анализа проточной цитометрии, используя трансфицированные CHO, экспрессирующие PD-L1, и клетки DO11, экспрессирующие TIM-3. Вкратце, клетки со сверхэкспрессией CHO-PD-L1 и DO11-TIM-3 можно  
25 дифференциально метить CFSE (сукцинимидиловый сложный эфир диацетата карбоксифлуоресцеина) (BD Horizon) или Cell Tracker Deep Red (CTDR/Thermo). Клетки DO11-TIM-3 и CHO-PDL1 отдельно инкубируют в течение 30 минут с исследуемым антителом, таким как антитело С (на льду в ФСБ + 1% БСА + 0,09% азиды натрия). Несвязанные антитела можно  
30 удалять путем промывания (2 раза, используя 200 мкл ФСБ + 1% БСА + 0,09% азиды натрия). Клетки CHO-PDL1 инкубируют в течение 2 часов с 45

мкг/мл родительского антитела к PD-L1 или контрольным hlgG1 на льду в ФСБ + 1% БСА + 0,09% азида натрия. Клетки DO11-TIM-3 инкубируют в течение 2 часов с 45 мкг/мл родительского антитела TIM-3 или hulgG4-PAA на льду в ФСБ + 1% БСА + 0,09% азида натрия. Клетки DO11-TIM-3/антитело С смешивают с CHO-PDL1 + родительское антитело к PD-L1 или hlgG1 в конечной концентрации 22,5 мкг/мл. Клетки CHO-PDL1/антитело С смешивают с DO11-TIM-3 + родительское антитело к TIM-3 или hulgG4-PAA в конечной концентрации 22,5 мкг/мл. После приблизительно 72-часовой инкубации при 4° С проводят измерение клеток на Fortessa X20 (с пробоотборником HTS) в каналах, подходящих для CFSE и CTDR. Используя программное обеспечение FLOWJO® (FlowJo, LLC, Ashland, OR), можно провести гейтинг двойных положительных событий (CFSE +/-CTDR +/-) и рассчитать и привести процент от общего числа событий (для 2 повторных лунок). Аппроксимацию и статистику генерируют с помощью Graphpad Prism, используя нелинейную регрессию (переменный наклон, 4 параметра).

В экспериментах, проводимых в целом, как описано выше, антитело С опосредовало соединение клеток, что должно было регистрироваться методом проточной цитометрии как двойные положительные события. Связывание антитела С с клетками DO11-TIM-3 или CHO-PDL1 (с последующим удалением несвязанных антител) и последующее смешивание с клетками CHO-PDL1 или DO11-TIM-3, соответственно, вызывало дозозависимое повышение количества двойных положительных событий по сравнению с фоном (до 4-кратного повышения по сравнению с одним буфером). Это повышение количества двойных положительных событий блокировалось добавлением избытка конкурирующих mAb к PD-L1 и/или TIM-3 в высокой концентрации, но не соответствующим неспецифическим контрольным IgG, демонстрируя специфичность и зависимость от экспрессии антигена-мишени.

### 30 **Функциональная активность *in vitro***

#### 1. **Анализ на основе клеток hTIM-3 DO11**

Способность антител по данному изобретению облегчать подавление Т-клеток посредством ингибирования TIM-3 можно определить в *in vitro* анализе DO11.

Для анализа на основе клеток hTIM-3 DO11 50 мкл клеток DO11 или  
5 сверхэкспрессирующих hTIM-3 клеток DO11 при  $2 \times 10^4$  клеток/лунку и 50 мкл клеток A20 при  $2 \times 10^4$  клеток/лунку высевали в 96-луночный планшет для тканевого культивирования с U-образным дном (Greiner Cellstar, #651180), используя среду RPMI 1640 (Gibco, #11875-085). Добавляли 50 мкл OVA (Sigma, #O1641) в конечной концентрации 0,2 мкМ (разведение в  
10 среде). Добавляли 50 мкл серийно разведенных антител (разведение в среде). В некоторые лунки добавляли среду, чтобы получить общий объем 200 мкл/лунка. Супернатант собирали через 18-22 часа и проводили измерения в отношении мИЛ-2, используя набор для ИФА (R&D, #SM2000).

В экспериментах, проводимых в целом, как описано в этом анализе,  
15 антитело С усиливало антиген-специфическую активацию Т-клеток OVA дозозависимым образом с EC50, составляющей 4,366 нМ, что определяли по повышению уровней мИЛ-2, но человеческий контрольный IgG этого не делал.

## 20 2. Анализ смешанной лейкоцитарной реакции (СЛР)

Способность антител по данному изобретению блокировать сигналы PD-L1 можно оценить путем измерения высвобождения цитокинов во время активации Т-клеток в *in vitro* анализе СЛР. Ожидается, что уровни определенных цитокинов, таких как ИФН- $\gamma$ , увеличатся, если активация Т-  
25 клеток будет стимулироваться обработкой антителами по данному изобретению.

Для анализа СЛР моноциты выделяли из человеческих МКПК (Allcells, #PB001) с помощью набора для выделения человеческих моноцитов II (Miltenyi, #130-091-153) и культивировали в течение 7 суток с 62,5 нг/мл ГМ-  
30 КСФ и 20 нг/мл ИЛ-4 для дифференцировки дендритных клеток. 100 мкл  $1 \times 10^5$  Т-клеток CD4, выделенных из МКПК (другой донор от Allcells) с помощью

набора для выделения Т-клеток CD4 (Miltenyi, кат. #130-091-155), и  $1 \times 10^4$  полученных из моноцитов дендритных клеток человека высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном с 100 мкл антител. Клетки инкубировали в увлажненном инкубаторе при  $37^\circ \text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , а супернатанты собирали через три дня. ИФА для человеческого ИФН- $\gamma$  проводили на супернатантах, используя набор для ИФА R&D (#SIF50).

В экспериментах, проводимых в целом так, как описано в этом анализе, 4 нМ антитела С повышали уровни ИФН- $\gamma$  приблизительно в три раза, тогда как 8 нМ антитела С повышали уровни ИФН- $\gamma$  приблизительно в пять раз. Эти результаты демонстрируют способность антитела С усиливать аллогенный Т-клеточный ответ в этом анализе.

### ***In vivo* функциональные исследования**

#### **1. Антитело С в модели с ксенотрансплантатом НМРЛ HSC827 человека**

Эффективность антител по данному изобретению можно исследовать в модели с ксенотрансплантатом НМРЛ HSC827 человека для оценки способности задерживать или разрушать развившиеся опухоли в модели посредством усиления Т-клеточного ответа на алло-антигены.

Для исследования на 0 сутки мышам NSG от Jackson Laboratories (возраст 7 недель, самки, в группах по 8 мышей) подкожно имплантировали в бок  $10 \times 10^6$  клеток HSC827 в HBSS (общий объем 0,2 мл). Все Т-клетки человека, выделенные из цельной крови (New York Blood Center), размножали, используя Human T-Activator CD3/CD28 Dynabeads® в течение 10 суток и проводили криоконсервацию. Т-клетки размораживали, промывали, подсчитывали и внутривенно инфузировали ( $2,5 \times 10^6$  Т-клеток в 0,2 мл ФСБ на мышь) мышам, несущим опухоль HSC827, на 36 сутки. Начиная с 36 суток мышей обрабатывали в/б инъекцией человеческого IgG (20 мг/кг), родительского антитела к PD-L1 антитела С (10 мг/кг) в комбинации с родительским антителом к TIM-3 антитела В (10 мг/кг) или родительским антителом к TIM-3 антитела С (10 мг/кг), антителом В (20

мг/кг) или антителом С (20 мг/кг), один раз в неделю в течение трех недель (с введением дозы с36, с43, с50). Состояние и поведение животных, включая уход за собой и способность к передвижению, отслеживали, по крайней мере, два раза в неделю. Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Объем опухолей измеряли два раза в неделю, начиная с 4 суток после имплантации клеток, используя электронные штангенциркули, как описано в SOP под названием: IM-Tumor Growth Measurement. Объем опухоли рассчитывали по формуле: объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = π/6 \* длина \* ширина<sup>2</sup>.

10 В экспериментах, проводимых в целом, как описано в этом анализе, на 50 сутки комбинация родительского антитела к PD-L1 антитела С и родительского антитела к TIM-3 антитела С замедляла рост опухоли на 62,5% при сравнении размера опухолей для обработанных и необработанных мышей (T/C = 27,5%). Комбинация родительского анти-PD-  
15 L1-антитела В и родительского анти-TIM-3-антитела В замедляла рост опухоли с T/C = 41,5%. На 50 сутки обработка антителом С привела к регрессии размера опухолей на 8,3% по сравнению с 35 сутками, когда проводили инфузию Т-клеток. Следовательно, хотя комбинация антитела к TIM-3 и антитела к PD-L1 в модели HCC827 замедляла рост опухолей,  
20 антитело С приводило к регрессии размера опухолей.

## 2. Антитело С у несущих опухоль L55 гуманизированных мышей HSCTFL-NOG-F (модель НМРЛ)

25 Эффективность антител по данному изобретению можно исследовать в модели с ксенотрансплантатом НМРЛ L55 человека для оценки способности задерживать или разрушать развившиеся опухоли в модели посредством усиления Т-клеточного ответа на алло-антигены.

Самкам мышей NOG от Jackson Laboratories прививали человеческие CD34<sup>+</sup> гемопоэтические стволовые клетки. Присутствие клеток huCD45<sup>+</sup> и  
30 мышинных клеток CD45<sup>+</sup> (mCD45) в периферической крови мышей подтверждали с помощью проточной цитометрии через 16 недель после

прививания. Для исследования на 0 сутки мышам HSCTFL-NOG-F имплантировали подкожно в бок фрагмент L55. Клетки L55 культивировали в среде RPMI-1640 с 10% фетальной бычьей сывороткой плюс 1 мМ Напирувата и L-глутамин и выращивали опухоли L55 у мышей NSG для

5 получения фрагмента для этого исследования. Животных рандомизировали при среднем объеме опухолей приблизительно 180 мм<sup>3</sup> по группам. Обработку начинали на 26 сутки с последующим еженедельным введением (Q7DX3) всех антител на 33 и 40 сутки. Для комбинации родительского антитела к PD-L1 антитела С и родительского антитела к TIM-3 антитела С

10 каждое антитело дозировали в концентрации 10 мг/кг. В случае биспецифического антитела антитело С дозировали в концентрации 20 мг/кг. Состояние и поведение животных, включая уход за собой и способность к передвижению, отслеживали, по крайней мере, два раза в неделю. Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Объем

15 опухолей измеряли два раза в неделю, начиная с 4 суток после имплантации клеток, используя электронные штангенциркули, как описано в SOP под названием: IM-Tumor Growth Measurement. Объем опухоли рассчитывали по формуле: объем опухоли (мм<sup>3</sup>) = π/6 \* длина \* ширина<sup>2</sup>.

В экспериментах, проводимых в целом, как описано в этом анализе,

20 на 40 сутки комбинация родительского антитела к PD-L1 антитела С и родительского антитела к TIM-3 антитела С имела T/C% 50% при сравнении размера опухоли для обработки и контроля (P = 0,314 для объема опухолей). На 40 сутки обработка антителом С задерживала рост опухоли по сравнению с комбинацией двух родительских антител и имела T/C% 7%

25 при сравнении размера опухоли для обработки и контроля (P = 0,013 для объема опухолей).

### 3. Комбинированная терапия антителом С и пеметрекседом в модели с ксенотрансплантатом НМРЛ L55 человека

30 Эффективность антител по данному изобретению можно исследовать в комбинации с пеметрекседом в модели с ксенотрансплантатом НМРЛ L55

человека для оценки способности задерживать или разрушать развившиеся опухоли в модели посредством усиления Т-клеточного ответа на алло-антигены.

Клетки L55 нужно культивировать в среде RPMI-1640 с 10% фетальной бычьей сывороткой плюс 1 мМ Na-пирувата и L-глутамина. Для исследования на 0 сутки мышам NSG от Jackson Laboratories (возраст 7 недель, самки, в группах по 8 мышей) имплантировали в бок  $5 \times 10^6$  клеток L55 в (50/50) матригель:HBSS (общий объем 0,2 мл). Все человеческие МКПК выделяли из афереза (BioSpec) и внутривенно инфузировали ( $11 \times 10^6$  клеток МКПК в 0,2 мл ФСБ на мышь) мышам, несущим опухоль L55, на 33 сутки, когда опухоли достигали  $\sim 250 \text{ мм}^3$ . Начиная с 34 суток мышей обрабатывали в/б инъекцией человеческого IgG (20 мг/кг), антитела С (20 мг/кг) или в комбинации с пеметрекседом (50 мг/кг). Пеметрексед применяли в течение 5 суток каждую неделю с 2-суточным перерывом между. Антитело применяли один раз в неделю в течение четырех недель (введение дозы на с34, с41, с48, с55). На 47 сутки мышам, несущим опухоль L55, инъектировали вторую партию 5М МКПК (такая же партия, что и первая инфузия). Состояние и поведение животных, включая уход за собой и способность к передвижению, отслеживали, по крайней мере, два раза в неделю. Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Объем опухолей измеряли два раза в неделю, начиная с 4 суток после имплантации клеток, используя электронные штангенциркули, как описано в SOP под названием: IM-Tumor Growth Measurement. Объем опухоли рассчитывали по формуле:  $\text{объем опухоли (мм}^3\text{)} = \pi/6 * \text{длина} * \text{ширина}^2$ .

В экспериментах, проводимых в целом так, как описано в этом анализе, само по себе антитело С или комбинация hulgG и пеметрекседа приводили к «отсутствию эффекта» согласно определению методом Bliss Independence в этой модели. Комбинация антитела С и пеметрекседа замедляла рост опухоли с T/C = 48,9% в конце исследования.

30

### ***In vitro* исследование высвобождения цитокинов связанным с планшетом антителом С в человеческих МКПК**

Потенциальную способность антител по данному изобретению вызывать синдром выброса цитокинов можно оценить путем измерения высвобождения цитокинов в анализе со связыванием с планшетом, используя свежие мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК). Синдром выброса цитокинов, индуцированный обработкой антителами, является нежелательной реакцией для большинства пациентов, а лечение биспецифическими антителами может повышать этот риск.

Свежевыделенные МКПК от шести здоровых субъектов инкубировали со связанным с планшетом антителом С или контрольными антителами в течение 24 часов в широком диапазоне титрования от 0,1 мкг до 10 мкг. Положительными контролями служили антитело к человеческому CD3 $\alpha$ , ОКТ3 и гомолог CD28-специфического суперагонистического терапевтического антитела, TGN1412. Известно, что оба антитела вызывают цитокиновый шторм в клинических условиях. Отрицательный контроль представлял собой эффекторное нулевое изотипическое антитело hIgG1 (IgG1-EN). В общей сложности 2 x 10<sup>5</sup> клеток на лунку (200 мкл) добавляли в трех повторностях в покрытые антителами планшеты и инкубировали в течение 24 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. После инкубации планшеты центрифугировали при 400 g в течение 5 минут; клеточные культуральные супернатанты собирали и хранили при -80°C перед определением цитокинов. Применяя пользовательский набор для 5-плексного анализа МСД (кат. # K151A0H-2; Meso Scale Discovery), проводили измерения пяти цитокинов, включая, ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНО- $\alpha$ , в клеточных культуральных супернатантах, следуя инструкциям производителя.

В экспериментах, проводимых в целом, как описано в этом анализе, инкубация человеческих МКПК с антителом С в широком диапазоне концентраций не приводит к значительным уровням высвобождения цитокинов в случае для ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНО- $\alpha$ . Напротив,

инкубация МКПК с анти-CD3 $\square$  и TGN1412-положительными контрольными антителами приводила к устойчивой выработке цитокинов для всех пяти анализируемых цитокинов у большинства доноров.

5 ***In vitro* исследование высвобождения цитокинов растворимым антителом С в цельной крови человека**

Потенциальную способность антител по данному изобретению вызывать синдром выброса цитокинов также можно оценить путем измерения высвобождения цитокинов растворимыми антителами по  
10 данному изобретению в цельной крови человека.

Свежие образцы цельной крови человека от 10 здоровых доноров инкубировали с растворимым антителом С или контрольным антителом в течение 24 часов при 100 мкг/мл. Положительные контроли включали антитело против CD3 $\square$  человека, ОКТ3 и гомолог против CD52 человека  
15 (Campath). Известно, что ОКТ3 и Campath вызывают «цитокиновый шторм» в клинических условиях. Отрицательные контроли представляли собой коммерчески доступное терапевтическое антитело инфликсимаб, не связываемое с синдромом выброса цитокинов в клинических условиях, и эффекторное нулевое (EN) изотипическое антитело hIgG1 (IgG1-EN).  
20 Анализировали широкую панель цитокинов, включая ИФН- $\gamma$ , ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12p70, ИЛ-13 и ФНО- $\alpha$ , используя специально разработанный мультиплексный анализ на платформе Mesoscale в супернатантах человеческой плазмы (кат. # K15049D-1, Meso Scale Discovery).

25 В экспериментах, проводимых в целом так, как описано в этом анализе, инкубация образцов крови человека с Campath или ОКТ3 приводила к сильному высвобождению нескольких анализируемых цитокинов у всех доноров, включая цитокины, связанные с CRS (ИФН- $\gamma$ , ИЛ-6, ФНО- $\alpha$  и ИЛ-10). Напротив, инкубация с антителом С или инфликсимабом  
30 не стимулировала какого-либо значительного высвобождения цитокинов у 10 здоровых доноров. Антитело С не приводило к сильному высвобождению

цитокинов при инкубации с цельной кровью человека в течение до 24 часов при концентрации до 100 мкг/мл.

### ***In vitro* анализ иммуногенности**

5            Антитела по данному изобретению сконструированы так, чтобы быть гетеродимерными, при этом каждая половина антитела связывается с отличной мишенью. Учитывая неприродный состав гетеродимерных антител иммуногенность является потенциальным риском, который необходимо оценить.

10            EpiScreen™ DC: Т-клеточный анализ использовали для определения относительной потенциальной возможности клинической иммуногенности антитела С. Дендритные клетки, полученные из моноцитов, получали из МКПК группы из 50 здоровых доноров, нагружали антителом С и индуцировали до зрелого фенотипа для представления Т-клеточных  
15            эпителиев аутологичным очищенным CD4+ Т-клеткам. Т-клеточные ответы измеряли, используя пролиферацию Т-клеток (поглощение [<sup>3</sup>H]-тимидина) и секрецию цитокина ИЛ-2 (ELISpot).

              Временной Т-клеточный анализ EpiScreen™ с группой известных биопрепаратов (таких как инфликсимаб, адалимумаб и бевацизумаб)  
20            показал четкую корреляцию между частотой ответов донорских Т-клеток в анализе EpiScreen™ и уровнем иммуногенности (противобелковые терапевтические ответы антител), наблюдаемую в клинических условиях. Донорские ответы с высокой частотой наблюдались в анализе EpiScreen™ для иммуногенных антител, таких как алемтузумаб, тогда как донорские  
25            ответы с относительно низкой частотой наблюдались для неиммуногенных антител, таких как омализумаб и трастузумаб. В целом, белковые терапевтические средства, которые индуцируют положительный ответ, меньший или равный 10%, в анализе EpiScreen™ связаны с низким риском иммуногенности в клинических условиях.

30            В экспериментах, проводимых в целом так, как описано в этом анализе, анализ частоты и величины ответов CD4+ Т-клеток показал, что

антитело С индуцировало умеренные положительные ответы у 6-8% донорской группы и, следовательно, демонстрирует низкий риск клинической иммуногенности.

#### 5 ***In vitro* анализ иммунной эффекторной функции антитела С**

Для потенциальной терапии при раке биспецифическим антителом к человеческому PD-L1 и человеческому TIM-3 иммунная эффекторная функция, обусловленная антителом, является нежелательной. Антитело С сконструировано так, что у него отсутствует иммунная эффекторная функция. Для того чтобы подтвердить отсутствие иммунной эффекторной функции, антитело С исследовали в стандартном твердофазном анализе связывания в отношении связывания с человеческими Fcγ-рецепторами и C1q, и в отношении индукции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ), антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ) и комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) в стандартном клеточном *in vitro* анализе.

Для твердофазного анализа связывания человеческого Fcγ-рецептора, белки рекомбинантного Fcγ-рецептора (FcγR), используемые в данном анализе, представляют собой FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb и FcγRIIIa(V). Рецепторный белок разводили в ФСБ и наносили (50 нг/лунку) на планшет Meso Scale (MSD кат. #L15XA-3). После инкубации в течение ночи при 4°C, планшеты три раза промывали ФСБ/0,05% Твин-20 (ФСБТ) и блокировали в течение 1-2 часов при комнатной температуре 150 мкл/лунку 5% MSD Blocker A (MSD кат. #R93BA-1) в ФСБТ. Затем планшеты три раза промывали ФСБТ и 30 мкл исследуемого антитела или контрольного антитела (таблица 3), разводили в 1% MSD Blocker A, добавляли в каждую лунку и оставляли инкубироваться в течение двух часов. После инкубации планшеты дважды промывали ФСБТ и в каждую лунку добавляли 30 мкл вторичного антитела (MSD кат. #D20TF-6) и оставляли инкубироваться в течение одного часа при комнатной температуре с перемешиванием. Затем планшеты промывали ФСБТ и в

каждую лунку добавляли 150 мкл 1X буфера для считывания (MSD кат. #R92TC-1). Затем планшеты считывали на Sector Imager 2400.

Для ИФА-анализа связывания С1q 96-луночный планшет для ИФА из полистирола (кат. Thermo Scientific 3855) покрывали исследуемыми антителами и контролями (ритуксимаб-IgG1-нуль-эффектор и другое человеческое антитело IgG1-нуль-эффектор) в концентрациях в диапазоне 200-0,0305 мкг/мл в ФСБ. После инкубации в течение ночи при 4°C планшеты трижды промывали ФСБТ и затем блокировали 300 мкл казеинового буфера (Thermo Fisher, кат. #37528) в течение двух часов при 10 комнатной температуре. Планшеты 3 раза промывали ФСБТ и затем добавляли 0,5 мкг/лунку С1q (Quidel, кат. #A400), разведенного в буфере, блокирующем казеин. Через два часа при комнатной температуре планшеты трижды промывали ФСБТ и в каждую лунку добавляли по 50 мкл вторичного антитела (1:200, Abd Serotec Inc #2221-5004P). Планшеты 15 инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре и затем трижды промывали ФСБТ. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ: KPL, кат. #50-65-01/02 ), субстрат HRP, и инкубировали планшеты при комнатной температуре в течение 20 минут. Реакцию останавливали (KPL, кат. #50-85-06) и измеряли оптическую 20 плотность на 450 нм, используя микропланшетный ридер.

Для анализа АЗКЦ PD-L1- и TIM-3-положительные клетки-мишени и CD20-положительные клетки Wil2S высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном (Perkin Elmer, #600-5680) при плотности 10000 клеток/лунку в 50 мкл буфера для анализа АЗКЦ (0,5% БСА в RPMI 1640). Клетки 25 инкубировали в течение 30 минут (все инкубации с клетками проводили при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, если не указано иное) с последующим добавлением 25 мкл/лунку титрованных исследуемых антител, разведенных в буфере для анализа АЗКЦ. После 30-минутной инкубации с исследуемыми антителами добавляли 25 мкл эффекторных клеток (FcγRIIIa-положительные клетки 30 Jurkat с NFAT-люциферазной репортерной конструкцией) в соотношении 15:1 (эффектор:мишень) и инкубировали в течение 5-6 часов. Активность

люциферазы активированных эффекторных клеток измеряли после 10-минутной инкубации при комнатной температуре с 100 мкл субстрата для люциферазы Bright-Glo™ (Promega, #G7940). Люминесценцию количественно оценивали, используя ридер для микротитровальных планшето  
5 планшето  
5 модель для определения значений EC<sub>50</sub> для каждого антитела.

Для анализа АЗКФ PD-L1- и TIM-3-положительные клетки-мишени и CD20-положительные клетки Wil2S высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном (Perkin Elmer, #600-5680) при плотности 10000 клеток/лунку в  
10 50 мкл буфера для анализа АЗКФ (0,5% БСА в RPMI 1640). Клетки инкубировали в течение 30 минут (все инкубации с клетками проводили при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, если не указано иное) с последующим добавлением 25 мкл/лунку титрованных исследуемых антител, разведенных в буфере для анализа АЗКФ. После 30-минутной инкубации с исследуемыми антителами  
15 добавляли 25 мкл эффекторных клеток (FcγRIIa-положительные клетки Jurkat с NFAT-люциферазной репортерной конструкцией; Promega G9885) в соотношении 6:1 (эффектор:мишень) и инкубировали в течение 5-6 часов. Активность люциферазы активированных эффекторных клеток измеряли после 10-минутной инкубации при комнатной температуре со 100 мкл  
20 субстрата для люциферазы Bright-Glo™ (Promega, #G7940). Люминесценцию количественно оценивали, используя ридер для микротитровальных планшето  
20 модель для определения значений EC<sub>50</sub> для каждого антитела.

25 Для анализа КЗЦ адгезивные клетки-мишени высевали в 96-луночные белые планшеты с плоским дном (Perkin Elmer, #600-5680) при 25000 клеток/лунку в 100 мкл/лунку среды для роста клеток. После инкубации в течение ночи (все инкубации с клетками проводили при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, если не указано иное) среду удаляли и добавляли 50 мкл буфера для анализа  
30 КЗЦ (RPMI 1640, 10% ФБС с 0,1% БСА и 25 мМ ГЭПЭС). Суспензионные клетки высевали в день анализа при плотности 50000 клеток/лунку в 50 мкл

буфера для анализа КЗЦ. Исследуемые и контрольные антитела добавляли в планшеты в двух повторностях и инкубировали в течение 30 минут. После инкубации в каждую лунку в течение одного часа добавляли 50 мкл человеческого компонента (S1764; Sigma), разведенного в 5 мл буфера для анализа (1:5). После инкубации в каждую лунку добавляли 16 мкл/лунку реагента Alamar Blue (Invitrogen, DAL1100). Планшеты инкубировали в течение 22 часов, а затем извлекали из инкубатора и оставляли до уравнивания с комнатной температурой в течение 5 минут. Флуоресценцию считывали на Synergy Neo2 (возбуждение: 560 нм, испускание: 590 нм), а обусловленный КЗЦ лизис клеток выражали относительно полного лизиса клеток, индуцированного Тритон X 100.

В экспериментах, проводимых в целом, как описано в данном анализе, антитело С не демонстрировало специфического связывания ни с любым из исследуемых человеческих Fcγ-рецепторов, ни с C1q. Кроме того, не наблюдалось обнаруживаемого ответа в клеточном анализе АЗКЦ, АЗКФ или КЗЦ при применении соответствующих TIM-3- и PD-L1-положительных клеточных линий для антитела С. Эти результаты демонстрируют, что у антитела С отсутствует обнаруживаемая иммунная эффекторная функция в пределах обнаружения проведенного анализа.

20

### **Фармакокинетика у обезьян**

Антитела по данному изобретению можно исследовать в отношении стабильности у обезьян, используя анализ сывороточной фармакокинетики (ФК) в анализе ИФА.

25 Чтобы получить характеристики сывороточной ФК антитела С, образцы сыворотки анализировали в трех разных форматах иммуноферментного анализа (ИФА). ИФА общего иммуноглобулина (IgG) применяли для количественного определения присутствия общего остова IgG независимо от способности связываться с TIM-3 или PD-L1. Диапазон стандартной кривой для антитела С составлял 125-8000 нг/мл с верхним пределом количественного определения (ВПКО) 3000 нг/мл и нижним

30

пределом количественного определения (НПКО) 300 нг/мл. Кроме того, ИФА с захватом антигена TIM-3 и ИФА с захватом антигена PD-L1 применяли для количественного определения присутствия активного лекарственного препарата в сыворотке. Для ИФА с захватом антигена TIM-3 аналитический диапазон для антитела С составлял 125-8000 нг/мл с ВПКО 3000 нг/мл и НПКО 300 нг/мл. Для ИФА с захватом антигена PD-L1 диапазон стандартной кривой для антитела С составлял 125-8000 нг/мл с верхним пределом количественного определения (ВПКО) 3000 нг/мл и нижним пределом количественного определения (НПКО) 300 нг/мл.

10 В экспериментах, проводимых в целом так, как описано в этом анализе, анализ ИФА для общего IgG и функционального захвата антигена для TIM-3 и PD-L1 был количественно сходными при всех уровнях доз, что указывает на стабильность антитела С и сохранение способности к функциональному связыванию в течение времени *in vivo*.

15

## Аминокислотные и нуклеотидные последовательности

SEQ ID NO: 1 (человеческий PD-L1)

MRIFAVFIFMTYWHELLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVY  
5 WEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAG  
VYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEV  
IWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENH  
TAELVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQD  
TNSKKQSDTHLEET

10

SEQ ID NO: 2 (человеческий TIM-3)

MFSHLPFDCVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWG  
KGACPVFECGNVLRDTERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTIENVTLADSGI  
YCCRIQIPGIMNDEKFNLKLVIK

15

SEQ ID NO: 3 (HCVR Ab к PD-L1 в антителе А, антителе В и  
антителе С)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGII  
PIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSPDYSPYY  
20 YGMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 4 (LCVR Ab к PD-L1 в антителе А, антителе В и  
антителе С)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSN  
25 RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFSGGIIKLT  
VLG

SEQ ID NO: 5 (HCVR Ab к TIM-3 в антителе А)

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSAIS  
30 GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYARTAFD  
LWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 6 (HCVR Ab к TIM-3 в антителе B)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSFYFSWVRQAPGKGLEWWSAIS  
GNGRSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYNTGFD  
5 LWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 7 (HCVR Ab к TIM-3 в антителе C)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWWSAIS  
GNGKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYNTGFD  
10 LWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 8 (LCVR Ab к TIM-3 в антителе A)

DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCQASEAIYGYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLP  
IGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYGFPPTFGQGKLEIK  
15

SEQ ID NO: 9 (LCVR Ab к TIM-3 в антителе B)

DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCQASEAIYGYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLP  
IGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYGFPPTFGQGKLEIK

20 SEQ ID NO: 10 (LCVR Ab к TIM-3 в антителе C)

DIVMTQSPSSLSASVGDGVTITCQASQDIYNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYASSIV  
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQASSFPPTFGQGKLEIK

SEQ ID NO: 11 (HC Ab к PD-L1 в антителе A, антителе B и антителе C)

25 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGGGLEWMGGII  
PIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSPDYSPYY  
YGMVWVGGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP  
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS  
NTKVDKRVKPKCDKTHTCPPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  
30 VVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPISRDELTKNQVSLCL

VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 12 (LC Ab к PD-L1 в антителе А, антителе В и антителе С)

5 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSN  
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFSGGKIL  
VLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG  
VETTTPSKQSNNKYAAESELSTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC  
S

10

SEQ ID NO: 13 (HC Ab к TIM-3 в антителе А)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWWSAIS  
GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYARTAFD  
LWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPEAPSSKSTSGGTAALGCLVTDYFPEPVTVSW  
15 NSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLWSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD  
KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVS  
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDFALVSKLTVDKSRWQQGNVFS  
20 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 14 (HC Ab к TIM-3 в антителе В)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSFYFSWVRQAPGKGLEWWSAIS  
GNGRSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYNTGFD  
25 LWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPEAPSSKSTSGGTAALGCLVTDYFPEPVTVSW  
NSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLWSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD  
KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVS  
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF  
30 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDFALVSKLTVDKSRWQQGNVFS  
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 15 (HC Ab к TIM-3 в антителе C)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWWSAIS  
5 GNGKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYNTGFD  
LWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPEAPSSKSTSGGTAALGCLVTDYFPEPVTVSW  
NSGALTSKVHTFPVAVLESSGLYSLWSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD  
KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWSV  
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
10 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFS  
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 16 (LC Ab к TIM-3 в антителе A)

15 DIVMTQSPSSLSASVGDGVTITCQASQDIYNYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL  
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGQGTKLEIKR  
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTARVGCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQE  
SVTEQDSKDYSLRSALTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20 SEQ ID NO: 17 (LC Ab к TIM-3 в антителе B)

DIVMTQSPSSLSASVGDGVTITCQASEAIYGYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLP  
IGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAYGFPPTFGQGTKLEIKRTV  
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTARVGCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESV  
TEQDSKDYSLRSALTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

25

SEQ ID NO: 18 (LC Ab к TIM-3 в антителе C)

DIVMTQSPSSLSASVGDGVTITCQASQDIYNYLNWYQQKPGKAPKLLIYASSIV  
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQASSFPPTFGQGTKLEIKRT  
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTARVGCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQES  
30 VTEQDSKDYSLRSALTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 19 (область из CH1-домена HC Ab к PD-L1)  
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL  
QSSGLYSLKS

5 SEQ ID NO: 20 (область из CH2-домена HC Ab к PD-L1)  
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVS

SEQ ID NO: 21 (область из CH2-домена HC Ab к PD-L1)  
SNKALPAPIEK

10

SEQ ID NO: 22 (область из CH3-домена HC Ab к PD-L1)  
REPQVYVLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPP  
VLDSGDSF

15 SEQ ID NO: 23 (область из CH1-домена HC Ab к TIM-3)  
EAPSSKSTSGGTAALGCLVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLY  
SLWSVVTVPS

SEQ ID NO: 24 (область из CH2-домена HC Ab к TIM-3)  
20 APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVS

SEQ ID NO: 25 (область из CH2-домена HC Ab к TIM-3)  
APIEKTISKAK

25 SEQ ID NO: 26 (область из CH3-домена HC Ab к TIM-3)  
VYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG  
SFALVSKL

SEQ ID NO: 27 (область из константной области легкой цепи Ab к PD-L1)  
30 ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAAESE

SEQ ID NO: 28 (область из константной области легкой цепи Ab к TIM-3)  
RVGCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLRSALT

SEQ ID NO: 29 Последовательность ДНК LC PD-L1 для антитела C

5 CAGTCCGTCC TGAATCAGCC ACCTTCCGCT AGCGGTACCC  
CCGGCCAGAG AGTGACAATC TCATGCTCCG GTTCCAGCTC TAACATTGGC  
TCTAACACTG TCAATTGGTA CCAGCAGCTG CCAGGAACCG CACCAAAGCT  
GCTGATCTAT GGAAGTCAA ATAGGCCTAG CGGGGTGCCA  
GACCGGTTTA GCGGATCTAA AAGTGGGACT TCAGCTTCCC TGGCAATTC  
10 TGGACTGCAG AGTGAGGACG AAGCTGATTA CTATTGCCAG TCCTACGATA  
GTTCACTGAG CGGTTCCGTG TTCGGCGGAG GGATCAAGCT  
GACAGTCCTG GGCCAGCCCA AGGTGAGTTC TAGAGGATCC  
ATCTGGGATA AGCATGCTGT TTTCTGTCTG TCCCTAACAT GCCCTGTGAT  
TATCCGCAA CAACACACCC AAGGGCAGAA CTTTGTTACT TAAACACCAT  
15 CCTGTTTGCT TCTTTCCTCA GGCCGCTCCT TCCGTGACTC TGTTTCCCCC  
TTCCAGCGAG GAACTGCAGG CCAATAAGGC CACCCTGGTG  
TGCCTGATTA GCGACTTCTA TCCTGGAGCT GTGACAGTCG CATGGAAGGC  
CGATTCTAGT CCAGTGAAAG CAGGGGTCGA GACCACAACCT  
CCCTCCAAGC AGAGCAACAA CAAGTACGCA GCCGAGTCTG  
20 AACTGAGTCT GACCCAGAA CAGTGGAAGT CCCACAGGAG TTATTCATGC  
CAGGTGACCC ATGAGGGCTC CACAGTGGAG AAGACCGTGG  
CCCCTGCTGA GTGTAGC

SEQ ID NO: 30 Последовательность ДНК LC TIM-3 для антитела C

25 GACATCGTGA TGACCCAGTC CCCTTCCAGC CTGTCTGCCT  
CCGTGGGCGA CGGAGTGACC ATCACATGCC AGGCTAGCCA  
GGATATCTAC AACTATCTGA ATTGGTACCA GCAGAAGCCT GGCAAGGCC  
CAAAGCTGCT GATCTATTAC GCTTCTTCCA TCGTGTCTGG AGTGCCATCC  
AGGTTCCAGCG GATCTGGATC CGGAACCGAC TTTACCCTGA CAATCAGCTC  
30 TCTGCAGCCT GAGGATTTTCG CCACATACTA TTGCCAGCAG GCTTCCTCTT  
TCCCCCTAC CTTTGGCCAG GGCACAAAGC TGGAGATCAA

	GAGAACCGTG	GCCGCTCCAT	CCGTGTTCAT	CTTTCCACCC
	AGCGACGAGC	AGCTGAAGTC	TGGCACAGCT	AGGGTGGGCT
	GTCTGCTGAA	CAACTTCTAC	CCCCGGGAGG	CCAAGGTGCA
	GTGGAAGGTG	GATAACGCTC	TGCAGAGCGG	CAATTCTCAG
5	GAGTCCGTGA	CCGAGCAGGA	CAGCAAGGAT	TCTACATATT
	CCCTGAGAAG	CGCCCTGACA	CTGAGCAAGG	CCGATTACGA
	GAAGCACAAG	GTGTATGCTT	GCGAGGTGAC	CCATCAGGGC
	CTGTCCAGCC CAGTGACAAA GTCTTTCAAT CGCGGCGAGT GT			

10	SEQ ID NO: 31	Последовательность ДНК HC PD-L1 для антитела С		
	CAGGTCCAGC	TGGTGCAGAG	CGGAGCCGAA	GTGAAGAAAC
	CCGGTAGCAG	CGTCAAAGTG	TCATGTAAAG	CCTCAGGGGG
	AACATTCTCC	AGCTACGCCA	TCTCCTGGGT	GAGACAGGCT
	CCAGGACAGG	GA CTGGAGTG	GATGGGAGGA	ATCATCCCTA
15	TCTTCGGCAC	CGCCAACTAC	GCTCAGAAGT	TTCAGGGCCG
	CGTGACCATC ACAGCCGACA AGAGCACCTC TACAGCTTAT ATGGAGCTGT			
	CTTCCCTGAG	AAGCGAGGAT	ACAGCCGTGT	ACTATTGCGC
	TCGCTCCCC GACTACAGCC CTTACTATTA CTATGGCATG GACGTGTGGG			
	GCCAGGGCAC	CACAGTGACC	GTGAGCTCTG	CTAGCACAAA
20	GGGCCCATCC	GTGTTCCAC	TGGCTCCATC	CAGCAAGTCC
	ACCAGCGGAG	GAACAGCCGC	TCTGGGCTGT	CTGGTGAAGG
	ACTATTTCCC	AGAGCCAGTG	ACCGTGTCTT	GGAACAGCGG
	CGCCCTGACC	TCTGGAGTGC	ACACATTTCC	CGCTGTGCTG
	CAGTCTTCCG GCCTGTACTC TCTGAAGTCC GTGGTGACCG TGCCTAGCTC			
25	TTCCCTGGGC	ACCCAGACAT	ATATCTGCAA	CGTGAATCAC AAGCCTTCCA
	ATACAAAGGT	GGACAAGAGG	GTGGAGCCAA	AGAGCTGTGA
	TAAGACCCAT	ACATGCCCCC	CTTGTCCTGC	TCCAGAGGCT
	GCTGGAGGAC	CAAGCGTGTT	CCTGTTTCCA	CCCAAGCCCA
	AGGACACCCT	GATGATCTCT	AGGACCCCTG	AGGTGACATG
30	CGTGGTGGTG	TCCGTGTCCC	ACGAGGACCC	AGAGGTGAAG
	TTTAACTGGT ACGTGGATGG CGTGGAGGTG CATAATGCTA AGACCAAGCC			

TAGGGAGGAG CAGTACAACA GCACCTATCG GGTGGTGTCT  
 GTGCTGACAG TGCTGCATCA GGATTGGCTG AACGGCAAGG  
 AGTATAAGTG CAAGGTGTCT AATAAGGCC TGCCCGCTCC TATCGAGAAG  
 ACCATCTCCA AGGCCAAGGG CCAGCCTAGG GAGCCACAGG  
 5 TGTACGTGCT GCCTCCAAGC CGGGACGAGC TGACAAAGAA  
 CCAGGTGTCT CTGCTGTGCC TGGTGAAGGG CTTCTATCCA TCTGATATCG  
 CTGTGGAGTG GGAGTCCAAT GGCCAGCCCG AGAACAATTA  
 CCTGACCTGG CCCCTGTGC TGGACAGCGA TGGCTCTTTC TTTCTGTATT  
 CCAAGCTGAC AGTGGATAAG AGCCGGTGGC AGCAGGGCAA  
 10 CGTGTTCTCC TGTTCTGTGA TGCACGAGGC ACTGCACAAT CATTACACCC  
 AGAAATCCCT GTCACTGAGC  
 CCCGGCAAG

SEQ ID NO: 32 Последовательность ДНК НС TIM-3 для антитела С

15 GAGGTGCAGC TGCTGGAGTC TGGGGGGGGT CTGGTGCAGC  
 CCGGGGGTAG CCTGCGTCTG TCTTGTGCCG CCTCTGGGTT TACTTTTCC  
 AGCTACTATA TGAGCTGGGT GAGACAGGCT CCTGGCAAGG  
 GCCTGGAGTG GGTGTCTGCC ATCAGCGGCA ACGGCAAATC  
 TACCTACTAT GCTGACTCCG TGAAGGGCAG ATTCACCATC AGCCGCGATA  
 20 ACTCTAAGAA TACTACTGTAC CTGCAGATGA ACAGCCTGCG CGCTGAGGAC  
 ACCGCCGTGT ACTATTGCGC CAGATATTAT AACACAGGCT TCGATCTGTG  
 GGGCCAGGGC ACCCTGGTGA CAGTGTCTTC CGCTAGCACC  
 AAGGGCCCAA GCGTGTTTCC AGAGGCTCCA AGCTCTAAGT  
 CCACCAGCGG AGGAACAGCC GCTCTGGGCT GTCTGGTGAC  
 25 CGACTACTTC CCAGAGCCCG TGACAGTGTC CTGGAACAGC  
 GGCCTCTGA CCTCTGGCGT GCACACATT CCAGCCGTGC  
 TGGAGTCCAG CGGCCTGTAC TCCCTGTGGT CCGTGGTGAC  
 CGTGCCCAGC TCTTCCCTGG GCACCCAGAC ATATATCTGC AACGTGAATC  
 ACAAGCCATC CAATACAAAG GTGGACAAGA GGGTGGAGCC  
 30 CAAGAGCTGT GATAAGACCC ATACATGCC CCCTTGTCTT GCTCCAGAGG  
 CTGCTGGAGG ACCATCCGTG TTCCTGTTTC CACCCAAGCC TAAGGACACC

CTGATGATCA      GCAGGACCCC      AGAGGTGACA      TGCCTGGTGG  
 TGTCCTGTGC      CCACGAGGAC      CCTGAGGTGA      AGTTCAACTG  
 GTACGTGGAT      GCGGTGGAGG      TGCATAATGC      TAAGACAAAG  
 CCCAGGGAGG      AGCAGTACAA      CAGCACCTAT      CGGGTGGTGT  
 5 CTGTGCTGAC      AGTGCTGCAT      CAGGATTGGC      TGAACGGCAA  
 GGAGTATAAG TGCAAGGTGT CTAATAAGGC TCTGCCC GCC CCTATCGAGA  
 AGACCATCTC      CAAGGCCAAG      GGCCAGCCTA      GAGAGCCACA  
 GGTGTACGTG      TATCCTCCAA      GCCGCGACGA      GCTGACCAAG  
 AACCAGGTGT CTCTGACATG TCTGGTGAAG GGCTTTTACC CTTCTGATAT  
 10 CGCTGTGGAG      TGGGAGTCCA      ATGGCCAGCC      AGAGAACAAT  
 TATAAGACCA CACCCCCTGT GCTGGACTCT GATGGCTCCT TCGCCCTGGT  
 GTCCAAGCTG      ACCGTGGATA      AGAGCAGGTG      GCAGCAGGGC  
 AACGTGTTCT CCTGTTCTGT GATGCACGAG GCACTGCACA ACCATTACAC  
 CCAGAAGTCC CTGTCCCTGA GCCCCGGCAA A

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывает человеческий PD-L1 (SEQ ID NO: 1) и человеческий TIM-3 (SEQ ID NO: 2), содержащее:
  - 5           a) первую тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 22,
  - b) первую легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 27,
  - 10          c) вторую HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 26,
  - d) вторую LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 28;и при этом первая LC образует межцепочечную дисульфидную  
15           связь с первой HC, вторая LC образует межцепочечную дисульфидную связь со второй HC, а первая HC образует две межцепочечные дисульфидные связи со второй HC, и первая HC и вторая HC принадлежат к изотипу IgG1 человека.
2. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что:
  - 20           a) первая HC содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21, а
  - b) вторая HC содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25.
3. Антитело, которое связывает человеческий PD-L1 (SEQ ID NO: 1) и человеческий TIM-3 (SEQ ID NO: 2), содержащее две легкие цепи (LC) и две тяжелые цепи (HC), отличающееся тем, что:
  - 25           a) первая LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12,
  - b) первая HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID  
30           NO: 11,

- c) вторая LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18, и
- d) вторая HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15.
- 5 4. Антитело по п. 3, отличающееся тем, что: вторая LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, а вторая HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13.
- 10 5. Антитело по п. 3, отличающееся тем, что: вторая LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, а вторая HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.
6. Антитело по п. 3, отличающееся тем, что: вторая LC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, а вторая HC имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.
- 15 7. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 18, отличающаяся тем, что указанная клетка способна экспрессировать антитело по п. 6.
- 20 8. Клетка млекопитающего, содержащая первую молекулу ДНК и вторую молекулу ДНК, причем первая молекула ДНК содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, а вторая молекула ДНК содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, имеющие
- 25 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 18, отличающаяся тем, что указанная клетка способна экспрессировать антитело по п. 6.
- 30 9. Способ получения антитела, включающий культивирование клетки млекопитающего по п. 7 или 8 в условиях, в которых происходит экспрессия антитела, и выделение экспрессированного антитела.

10. Антитело, полученное путем культивирования клетки млекопитающего, содержащей молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 18 в условиях, в которых происходит экспрессия антитела, и выделение экспрессированного антитела.
11. Антитело, полученное путем культивирования клетки млекопитающего, содержащей первую молекулу ДНК и вторую молекулу ДНК, причем первая молекула ДНК содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, а вторая молекула ДНК содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 18 в условиях, в которых происходит экспрессия антитела, и выделение экспрессированного антитела.
12. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1–6 или 10–11 и приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.
13. Способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела по любому из пп. 1–6 или 10–11.
14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой меланому, рак легкого, рак головы и шеи, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак эндометрия, рак пищевода, саркому мягких тканей, холангиокарциному или гепатоцеллюлярную карциному.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого или мезотелиому.
- 5 16. Способ по любому из пп. 13–15, дополнительно включающий одновременное, отдельное или последовательное введение одного или более соответствующих стандарту лечения агентов, выбранных из группы, состоящей из цисплатина, карбоплатина, дакарбазина, липосомального доксорубина, доцетаксела, циклофосфида и доксорубина, навелбина, эрибулина, паклитаксела, связанных с
- 10 белками частиц паклитаксела для инъекционной суспензии, иксабепилона, капецитабина, FOLFOX (лейковорин, фторурацил и оксалиплатин), FOLFIRI (лейковорин, фторурацил и иринотекан), гемцитабина, топотекана, липосомального иринотекана, пеметрекседа и цетуксимаба.
- 15 17. Антитело по любому из пп. 1–6 или 10–11 для применения в терапии.
18. Антитело по любому из пп. 1–6 или 10–11 для применения при лечении рака.
19. Антитело для применения по п. 18, отличающееся тем, что указанный
- 20 рак представляет собой меланому, рак легкого, рак головы и шеи, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак эндометрия, рак пищевода, саркому мягких тканей, холангиокарциному или гепатоцеллюлярную карциному.
- 25 20. Антитело для применения по п. 19, отличающееся тем, что рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого или мезотелиому.
21. Антитело по любому из пп. 1–6 или 10–11 для применения
- 30 одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с одним или более соответствующими стандарту лечения агентами, выбранными из группы, состоящей из цисплатина, карбоплатина,

- 5 дакарбазина, липосомального доксорубицина, доцетаксела, циклофосфамида и доксорубицина, навелбина, эрибулина, паклитаксела, связанных с белками частиц паклитаксела для инъекционной суспензии, иксабепилона, капецитабина, FOLFOX (лейковорин, фторурацил и оксалиплатин), FOLFIRI (лейковорин, фторурацил и иринотекан), гемцитабина, топотекана, липосомального иринотекана, пеметрекседа и цетуксимаба, при лечении рака.
- 10 22. Фармацевтическая композиция для применения при лечении рака, содержащая эффективное количество антитела по любому из пп. 1–6 или 10–11.
- 15 23. Композиция для применения по п. 22, отличающаяся тем, что указанный рак представляет собой меланому, рак легкого, рак головы и шеи, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак эндометрия, рак пищевода, саркому мягких тканей, холангиокарциному или гепатоцеллюлярную карциному.
- 20 24. Композиция для применения по п. 23, отличающаяся тем, что рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого или мезотелиому.
- 25 25. Композиция по любому из пп. 22–24, которую вводят одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с одним или более соответствующими стандарту лечения агентами, выбранными из группы, состоящей из цисплатина, карбоплатина, дакарбазина, липосомального доксорубицина, доцетаксела, циклофосфамида и доксорубицина, навелбина, эрибулина, паклитаксела, связанных с белками частиц паклитаксела для инъекционной суспензии, иксабепилона, капецитабина, FOLFOX (лейковорин, фторурацил и оксалиплатин), FOLFIRI (лейковорин, фторурацил и иринотекан), гемцитабина, топотекана, липосомального иринотекана, пеметрекседа и цетуксимаба.
- 30