

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992757 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.27

(51) Int. Cl. C07K 16/46 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.07.09

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА-ИНГИБИТОРЫ КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ

(31) 62/530,436

(32) 2017.07.10

(33) US

(86) PCT/US2018/041205

(87) WO 2019/014091 2019.01.17

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

(72) Изобретатель:

Кейлос Майкл Дивейн, Ли Ивэнь,
Людвиг Дейл Линкольн, Плоуман
Грегори Д., Шэнь Ян (US), Д'Анджело
Игор Эдмондо Паоло (СА)

(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 PD-L1 человека и PD-1 человека, и могут быть полезны в лечении рака сами по себе и в комбинации с химиотерапией и другими противораковыми терапевтическими средствами.

A1

201992757

201992757

A1

БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА-ИНГИБИТОРЫ КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ

Данное изобретение относится к области медицины. В частности, данное изобретение относится к биспецифическим антителам, которые связывают
5 человеческий белок 1 программируемой клеточной гибели (PD-1) и лиганд 1 человеческого PD-1 (PD-L1), и могут быть полезны для лечения солидных и гематологических опухолей отдельно и в комбинации с химиотерапией и другими противораковыми терапевтическими средствами.

Пути иммунных контрольных точек используются для поддержания
10 аутоотолерантности и контроля активации Т-лимфоцитов, но раковые клетки могут использовать эти пути для подавления противоопухолевого ответа и предотвращения их уничтожения. Путь PD-1/PD-L1 является одной из таких иммунных контрольных точек. Человеческий PD-1 обнаруживается на Т-лимфоцитах, а человеческий PD-L1 аберрантно экспрессируется различными
15 типами опухолей; связывание PD-L1 с PD-1 ингибирует пролиферацию Т-лимфоцитов 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.

В то время как терапевтические средства, нацеленные на путь PD-1/PD-L1,
20 прошли клиническую проверку и привели к значительным клиническим достижениям в лечении рака, только для части пациентов такое лечение является полезным(смотрите, например, Sharma, P. and Allison, J.P., Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. Cell. 2015; 161:2015-14). Например, только примерно 20% пациентов с
25 немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) имели ответ на лечение антителом PD-1.

Хотя в настоящее время проводятся клинические испытания, включающие совместное введение антитела к PD-L1 и антитела к PD-1 (смотрите, например, EUROPEAN SOCIETY FOR MEDICAL ONCOLOGY (ESMO) Abstract #2130; Oct. 2016), эти схемы лечения включают в себя инфузии двух отдельных продуктов-
30 антител в относительно высоких дозах для каждого антитела. Кроме того, пока неизвестно, обеспечат ли такие комбинированные терапии повышение эффективности, не ухудшая профиль побочных эффектов по сравнению с монотерапией.

В WO2017/087547, в частности, раскрыты анти-PD-L1 антитела и в целом раскрыты гетеродимерные молекулы (например, биспецифический агент), содержащие PD-L1-связывающий агент, описанный в данном документе, и «второй иммунотерапевтический агент». В некоторых вариантах осуществления, второй иммунотерапевтический агент может включать в себя «антитело, которое блокирует иммуносупрессивные функции», такое как «анти-PD антитело». Однако в этой публикации не были раскрыты какие-либо специфические биспецифические агенты PD-L1/PD-1. Таким образом, биспецифическое антитело, которое связывает PD-L1 и PD-1 с высокой аффинностью, эффективно нейтрализует активацию PD-L1 и PD-1 всеми лигандами семейства PDx и/или обеспечивает лучшую активность по сравнению с известными терапевтическими средствами, нацеленными на путь PD-1/PD-L1, или даже их комбинациями, является необходимым в качестве более эффективного фармакологического вмешательства для некоторых видов рака. В частности, желательны такие биспецифические анти-PD-L1/PD-1 антитела, которые: i) могут более эффективно лечить раковые заболевания, характеризующиеся как имеющие умеренные или высокие уровни экспрессии PD-L1 или PD-1, и ii) демонстрируют стабильность *in vivo*, физическую и химическую стабильность, включая, но не ограничиваясь ими, термическую стабильность, растворимость, низкую само-агрегацию и фармакокинетические характеристики, которые являются приемлемыми для разработки и/или применения в лечении рака.

Соответственно, согласно данному изобретению предложены новые гетеродимерные биспецифические антитела, которые могут быть одновременно нацелены на PD-L1 и PD-1, с помощью спаривания двух разных тяжелых цепей и двух разных легких цепей в одно IgG-подобное антитело. Кроме того, согласно данному изобретению предложены гетеродимерные биспецифические антитела против PD-L1 человека и против PD-1 человека, которые обладают одним или большим количеством следующих признаков: блокируют все три взаимодействия оси PD (связывание PD-L1 с PD-1, связывание PD-L2 с PD-1, и связывание PD-L1 с CD80), блокируют сверхэкспрессирующие PD-L1 и PD-1 клетки, увеличивают активацию Т-лимфоцитов и уничтожение опухолевых клеток из-за близости связанных Т-лимфоцитов и опухолевых клеток, демонстрируют значительную противоопухолевую активность при неожиданно низких дозах в опухолевых клетках со средним или высоким уровнем экспрессии лиганда PD, и демонстрирует неожиданную физическую и химическую стабильность, включая, но не

ограничиваясь стабильностью *in vivo*, термическую стабильность, растворимость, низкое само-объединение и фармакокинетические характеристики.

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

5 2), содержащее:

а) первую тяжелую цепь (HC1), содержащую вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;

10 б) первую легкую цепь (LC1), содержащую вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

с) вторую тяжелую цепь (HC2), содержащую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и

д) вторую легкую цепь (LC2), содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

15 В данном изобретении предложено антитело, которое связывает человеческий PD-L1 (SEQ ID NO: 1) и человеческий PD-1 (SEQ ID NO: 2), содержащее HC1, LC1, HC2, LC2, причем:

20 а) указанная HC1 содержит CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 в HCVR;

25 б) указанная LC1 содержит CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 в LCVR;

с) указанная HC2 содержит CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 в HCVR;

30 д) указанная LC2 содержит CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 в LCVR;

е) домен CH1 HC1 содержит аминокислотную замену S183K;

- f) константная область LC1 представляет собой лямбда-вариант человека ,
содержащий аминокислотные замены S176E и Y178E;
- g) домен CH1 HC2 содержит аминокислотные замены L128E, K147T, и Q175E;
- h) константная область LC2 представляет собой каппа-вариант человека ,
5 содержащий аминокислотные замены S131R, V133G, и S176R; и
- i) домен CH3 HC1 содержит аминокислотные замены T350V, L351Y, F405A и
Y407V и домен CH3 HC2 содержит аминокислотные замены T350V, T366L,
K392L, и T394W; или домен CH3 HC1 содержит аминокислотные замены
T350V, T366L, K392L, и T394W и домен CH3 HC2 содержит аминокислотные
10 замены T350V, L351Y, F405A и Y407V; и,
- j) причем HC1 и HC2 представляют собой нуль варианты Fc IgG1 человека с
иммунной эффекторной функцией, при этом нумерация соответствует индексу
ЕС. Предпочтительно, HC1 и HC2 содержат аминокислотные замены L234A,
L235A и D265S.
- 15 В данном изобретении предложено антитело, которое связывает
человеческий PD-L1 (SEQ ID NO: 1) и человеческий PD-1 (SEQ ID NO: 2),
содержащее:
- a) HC1, содержащую, в порядке от N-конца к С-концу, HCVR, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, аминокислотную
20 последовательность SEQ ID NO: 9 в домене CH1, аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 10 в домене CH2, и аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 в домене CH3;
- b) LC1, содержащую, в порядке от N-конца к С-концу, LCVR, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и аминокислотную
25 последовательность SEQ ID NO: 14 в константной области;
- c) HC2, содержащую, в порядке от N-конца к С-концу, HCVR, содержащую
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 13 в домене CH1, аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 10 в домене CH2 и аминокислотную
30 последовательность SEQ ID NO: 12 или аминокислотную последовательность
SEQ ID NO: 11 в домене CH3; и
- d) LC2, содержащую, в порядке от N-конца, LCVR, содержащую аминокислотную
последовательность SEQ ID NO: 8 и аминокислотную последовательность SEQ
ID NO: 15 в константной области, при условии, что когда аминокислотная

последовательность SEQ ID NO: 11 присутствует в домене CH3 указанной HC1, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 12 присутствует в домене CH3 указанной HC2; или когда аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 12 присутствует в домене CH3 указанной HC1, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 11 присутствует в домене CH3 указанной HC2.

Согласно данному изобретению дополнительно предложено антитело, содержащее HC1, LC1, HC2 и LC2, причем:

- a) указанная HC1 содержит, в порядке от N-конца до C-конца, HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 в домене CH1, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 в домене CH2 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 в домене CH3;
- b) указанная LC1, содержит, в порядке от N-конца к C-концу, LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 в константной области; и
- c) указанная HC2 содержит, в порядке от N-конца до C-конца, HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 в домене CH1, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 в области домена CH2, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 в домене CH3; и
- d) указанная LC2 содержит, в порядке от N-конца, LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 в константной области.

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

- a) HC1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49;
- b) LC1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;
- c) HC2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; и
- d) LC2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

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

- a) HC1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49;

- b) LC1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;
- c) HC2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и
- d) LC2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

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

- a) HC1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29;
- b) LC1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30;
- c) HC2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и
- 10 d) LC2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

Согласно данному изобретению предложена клетка млекопитающего,
содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность,
кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ
ID NO: 49, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 34, при этом клетка
15 способна экспрессировать антитело согласно данному изобретению.

Согласно данному изобретению предложена клетка млекопитающего,
содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность,
кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ
ID NO: 49, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, при этом клетка
20 способна экспрессировать антитело согласно данному изобретению.

Согласно данному изобретению предложена клетка млекопитающего,
содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность,
кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ
ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, при этом клетка
25 способна экспрессировать антитело согласно данному изобретению.

В данном изобретении предложен способ получения антитела согласно
данному изобретению, включающий в себя культивирование клетки
млекопитающего согласно данному изобретению в условиях, в которых
экспрессируется антитело, и выделение экспрессированного антитела.

30 В данном изобретении предложено антитело, полученное способом согласно
данному изобретению.

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

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий в себя введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, причем указанный способ включает в себя введение
5 нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела согласно данному изобретению, при этом указанный рак представляет собой Ходжкинскую или не-Ходжкинскую лимфомы, меланому, почечно-клеточный рак, рак почки, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак желудка и пищевода, колоректальный рак, рак печени, гепатоцеллюлярный рак, холангиокарциному, рак поджелудочной железы,
10 рак молочной железы, трижды отрицательный рак молочной железы, рак яичников, рак эндометрия, рак предстательной железы, мелкоклеточный рак легкого (МКРЛ), немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ), мезотелиому, плоскоклеточный рак головы и шеи (ПКРГШ), саркому мягких тканей или мультиформную глиобластому.

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 рака, при этом рак легкого представляет собой НМКРЛ (плоскоклеточный или неплоскоклеточный),
20 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 собой рак печени. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, при этом рак представляет собой
25 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 представляет собой рак желудка. В данном изобретении дополнительно предложен способ лечения рака, при этом рак представляет собой рак почки. В данном
30 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 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 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 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 в себя введение эффективного количества антитела согласно данному изобретению одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с одним или большим количеством анти-опухолевых агентов, выбранных 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, цетуксимаба, ниволумаба, ипилимумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, тремелиумаба, урелиумаба, лирилумаба, атезолизумаба, епикедостата и дурвалумаба.

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

В данном изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в терапии. В данном изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении рака. В данном изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении рака, при этом указанный рак представляет собой Ходжкинскую или не-Ходжкинскую лимфому, меланому, почечно-клеточный рак, рак почки, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак желудка и пищевода, колоректальный рак, рак печени, гепатоцеллюлярный рак, холангиокарциному, рак поджелудочной железы,

рак молочной железы, трижды отрицательный рак молочной железы, рак яичников, рак эндометрия, рак предстательной железы, мелкоклеточный рак легкого (МКРЛ), немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ), мезотелиому, плоскоклеточный рак головы и шеи (ПКРГШ), саркому мягких тканей или мультиформную
5 глиобластому.

В данном изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении меланомы. В данном изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении рака легкого. В данном изобретении дополнительно предложено антитело согласно данному изобретению,
10 при этом рак легкого представляет собой НМКРЛ (плоскоклеточный или неплоскоклеточный), мелкоклеточный рак легкого или мезотелиому. В данном изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении рака головы и шеи. В данном изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении рака печени. В данном
15 изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении колоректального рака. В данном изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении рака поджелудочной железы. В данном изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении рака желудка. В данном изобретении
20 предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении рака почки. В данном изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении рака мочевого пузыря. В данном изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении рака предстательной железы. В данном изобретении предложено
25 антитело согласно данному изобретению для применения в лечении рака молочной железы. В данном изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении рака яичника. В данном изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении рака эндометрия. В данном изобретении предложено антитело согласно данному
30 изобретению для применения в лечении рака пищевода. В данном изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении саркомы мягких тканей. В данном изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении холангиокарциномы. В данном

изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения в лечении гепатоцеллюлярной карциномы.

В данном изобретении предложено антитело согласно данному изобретению для применения одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с одним или большим количеством анти-опухолевых агентов, выбранных из группы, состоящей из цисплатина, карбоплатина, дакарбазина, липосомального доксорубицина, доцетаксела, циклофосфида 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 цетуксимаба, ниволумаба, ипилимумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, тремелиумаба, урелиумаба, лирилумаба, атезолизумаба, епикедостата и дурвалумаба, в лечение рака.

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

В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению, при этом указанный рак представляет собой Ходжкинскую или не-Ходжкинскую лимфомы, меланому, почечно-клеточный рак, рак почки, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак желудка и пищевода, колоректальный рак, рак печени, гепатоцеллюлярный рак, холангиокарциному, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, трижды отрицательный рак молочной железы, рак яичников, рак эндометрия, рак предстательной железы, мелкоклеточный рак легкого (МКРЛ), немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ), мезотелиому, плоскоклеточный рак головы и шеи (ПКРГШ), саркому мягких тканей или мультиформную глиобластому. В данном изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению, при этом рак легкого представляет собой НМРЛ (плоскоклеточный и неплоскоклеточный), мелкоклеточный рак легкого или мезотелиому.

В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении меланомы, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака легкого, включая, но не ограничиваясь НМРЛ (плоскоклеточный и неплоскоклеточный), мелкоклеточным раком легкого или мезотелиомой, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака головы и шеи, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака печени, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении колоректального рака, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака поджелудочной железы, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака желудка, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака почки, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака мочевого пузыря, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака предстательной железы, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака молочной железы, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака яичника, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака эндометрия, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении

предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака пищевода, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении саркомы мягких тканей, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении холангиокарциномы, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению. В данном изобретении предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении гепатоцеллюлярной карциномы, содержащая эффективное количество антитела согласно данному изобретению.

В данном изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция для применения в лечении рака, причем указанную фармацевтическую композицию вводят одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с одним или большим количеством анти-опухолевых агентов, выбранных 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, цетуксимаба, ниволумаба, ипилимумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, тремелиумаба, урелиумаба, лирилумаба, атезолизумаба, епикедостата и дурвалумаба.

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

В данном изобретении предложено применение антитела согласно данному изобретению для производства лекарственного средства для лечения рака. В данном изобретении дополнительно предложено антитело согласно данному изобретению для производства лекарственного средства для лечения рака, причем указанный рак представляет собой Ходжкинскую или не-Ходжкинскую лимфомы, меланому, почечно-клеточный рак, рак почки, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак желудка и пищевода, колоректальный рак, рак печени, гепатоцеллюлярный рак,

холангиокарциному, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, трижды отрицательный рак молочной железы, рак яичников, рак эндометрия, рак предстательной железы, мелкоклеточный рак легкого (МКРЛ), немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ), мезотелиому, плоскоклеточный рак головы и шеи (ПКРГШ), саркому мягких тканей или мультиформную глиобластому. В данном изобретении дополнительно предложено применение антитела согласно данному изобретению для производства лекарственного средства для лечения рака, при этом рак легкого представляет собой НМРЛ (плоскоклеточный и не плоскоклеточный), мелкоклеточный рак легкого или мезотелиому.

10 В данном изобретении дополнительно предложено применение антитела согласно данному изобретению в производстве лекарственного средства для лечения рака, при этом указанное лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с одним или большим количеством анти-опухолевых агентов, выбранных из группы, состоящей из

15 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,

20 топотекана, липосомального иринотекана, пеметрекседа, цетуксимаба, ниволумаба, ипилимумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, тремелиумаба, урелиумаба, лирилумаба, атезолизумаба, епикедостата и дурвалумаба.

В данном изобретении предложено применение антитела согласно данному изобретению в производстве лекарственного средства для лечения рака, при этом

25 указанное лекарственное средство следует вводить одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с ионизирующим излучением.

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

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

Антитело согласно 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 N-концевой 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 согласно 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 PD-1 (SEQ ID NO: 2). Домены CH2 и/или CH3 таких полипептидных цепей не обязательно должны быть идентичными по последовательности, и преимущественно их модифицируют, чтобы способствовать комплексообразованию между двумя полипептидными цепями. Например, в домен CH2 или CH3 может быть внесена аминокислотная замена (предпочтительно аминокислотная замена, содержащей объемную боковую группу, образующую «выступ», например, триптофан), таким образом что стерическая помеха будет предотвращать взаимодействие с аналогично мутированным доменом и будет вынуждать мутированный домен спариваться с доменом, в который была внесена комплементарная или вмещающая мутация, то есть «отверстие» (например, замена на глицин). Такие наборы мутаций могут быть внесены в любую пару полипептидов, содержащих домены CH2-CH3, которые образуют область Fc. Способы белковой инженерии, способствующие гетеродимеризации по сравнению с гомодимеризацией, хорошо известны в данной области техники, в частности, в отношении конструирования иммуноглобулино-подобных молекул (смотрите, например, WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO

2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291, EP 1 870 459A1, а также Ridgway et al. (1996) " 'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization, " Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library, " J. Mol. Biol. 270: 26-35, и Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis, " J. Immunol. Methods 296:95-101). Как правило, в подходах, известных в данной области техники, домен CH3 первой тяжелой цепи и домен CH3 второй тяжелой цепи оба конструируют взаимодополняющим образом, так что тяжелая цепь, содержащая один сконструированный домен CH3, больше не может гомодимеризоваться с другой тяжелой цепью той же структуры (например, CH3-сконструированная первая тяжелая цепь, не может больше гомодимеризоваться с другой CH3-сконструированной первой тяжелой цепью; и CH3-сконструированная вторая тяжелая цепь, не может больше гомодимеризоваться с другой CH3-сконструированной второй тяжелой цепью). Таким образом, тяжелая цепь, содержащая один сконструированный домен CH3, вынуждена гетеродимеризоваться с другой тяжелой цепью, содержащей домен CH3, который сконструирован быть комплементарным. Для этого варианта осуществления изобретения домен CH3 первой тяжелой цепи и домен CH3 второй тяжелой цепи конструируют с целью быть комплементарными, посредством аминокислотных замен, так что первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь вынуждены гетеродимеризоваться, и в тоже время первая тяжелая цепь и вторая тяжелая цепь больше не могут гомодимеризоваться (например, по стерическим причинам).

Различные подходы к обеспечению гетеродимеризации тяжелых цепей, известные в данной области техники, рассматриваются как различные альтернативы, используемые в биспецифическом антителе согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, в последовательность тяжелых цепей в пределах областей CH1 и CH3 и в последовательность легких цепей в пределах константной области легкой цепи вносят мутации. Мутации CH1 и LC вносят для того, чтобы стимулировать нативное спаривание соответствующих пар легких цепей и тяжелых цепей, и препятствовать ошибочному спариванию легких цепей. Мутации CH3 вносят для того, чтобы стимулировать

гетеродимерное спаривание двух различных тяжелых цепей и препятствовать формированию гомодимеров.

Предпочтительно, когда мутации в области CH3 части анти-PD-L1 антитела включают в себя позиции 350, 351, 405 и 407 по нумерации ЕС, мутации в области CH3 части анти-PD-1 антитела включают в себя позиции 350, 366, 392 и 394 по нумерации ЕС; когда мутации в области CH3 части анти-PD-L1 антитела включают в себя позиции 350, 366, 392 и 394 по нумерации EU, мутации в области CH3 части анти-PD-1 антитела включают в себя позиции 350, 351, 356, 405 и 407 по нумерации ЕС (как показано в выравнивании последовательностей, приведенном непосредственно ниже).

Выравнивание аминокислотных последовательностей человеческого IgG1 дикого типа и константных областей тяжелой цепи антител v3.2 и v13884 (предпочтительные модификации подчеркнуты):

15	IgG1-дт	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
	3.2PD-L1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
	844PD-1	ASTKGPSVFPE <u>AP</u> SSKSTSGGTAALGCLVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
	3.2PD-1	ASTKGPSVFPE <u>AP</u> SSKSTSGGTAALGCLVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
	844PD-L1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
20	IgG1-дт	HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
	3.2PD-L1	HTFPAVLQSSGLYSL <u>K</u> SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP
	844PD-1	HTFPAVL <u>ESS</u> GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP
	3.2PD-1	HTFPAVL <u>ESS</u> GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP
25	844PD-L1	HTFPAVLQSSGLYSL <u>K</u> SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP
	IgG1-дт	KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
	3.2PD-L1	KSCDKTHTCPPCPAPE <u>AAG</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV <u>S</u> VS
	844PD-1	KSCDKTHTCPPCPAPE <u>AAG</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV <u>S</u> VS
30	3.2PD-1	KSCDKTHTCPPCPAPE <u>AAG</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV <u>S</u> VS
	844PD-L1	KSCDKTHTCPPCPAPE <u>AAG</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV <u>S</u> VS
	IgG1-дт	HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
	3.2PD-L1	HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
35	844PD-1	HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
	3.2PD-1	HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
	844PD-L1	HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
	IgG1-дт	EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
40	3.2PD-L1	EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY <u>VY</u> PPSRDELTKNQVSLT
	844PD-1	EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY <u>VY</u> PPSRDELTKNQVSLT
	3.2PD-1	EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY <u>V</u> LPPSRDELTKNQVSL <u>C</u>
	844PD-L1	EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY <u>V</u> LPPSRDELTKNQVSL <u>C</u>
45	IgG1-дт	LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
	3.2PD-L1	LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF <u>ALY</u> SKLTVDKSRW
	844PD-1	LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF <u>ALY</u> SKLTVDKSRW
	3.2PD-1	LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY <u>L</u> TWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW

844PD-L1 LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW

- 5 IgG1-дт QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)
3.2PD-L1 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)
844PD-1 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42)
3.2PD-1 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 43)
844PD-L1 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 44)

10 Предпочтительно, как показано подчеркиванием в приведенном выше выравнивании, мутации в области CH1 части анти-PD-L1 антитела предпочтительно включают в себя позицию 183 по нумерации ЕС, тогда как мутации в области CH1 части анти-PD-1 антитела предпочтительно включает в себя позиции 128, 147 и 175 по нумерации ЕС.

15 Область CL части анти-PD-L1 антитела предпочтительно представляет собой подтип лямбда человека. Более предпочтительно, область CL части анти-PD-L1 антитела представляет собой лямбда вариант человека, содержащий аминокислотные замены в позициях 176 и 178 по нумерации ЕС (смотрите выравнивания ниже).

20 **Выравнивание аминокислотной последовательности человеческой лямбда дикого типа с константной областью легкой цепи PD-L1 антител v3.2, v3.0 и v13844 или PD-1 (предпочтительные модификации подчеркнуты).**

25 Лямбда-дт QPKANPTVTLPSPSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK
PD-L1 QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK

Лямбда-дт AGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV
PD-L1 AGVETTTTPSKQSNNKYAAESELSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV

30 Лямбда APTECS (SEQ ID NO: 45)
PD-L1 APAECS (SEQ ID NO: 46)

Область CL части анти-PD-L1 антитела предпочтительно представляет собой подтип каппа человека. Область CL части анти-PD-1 антител, согласно данному изобретению, представляет собой каппа вариант человека, содержащий аминокислотные замены в позициях 131, 133 и 176 по нумерации ЕС.

40 **Выравнивание аминокислотных последовательностей человеческого каппа дикого типа и константных областей легкой цепи антител к PD-1 (предпочтительные модификации подчеркнуты).**

Каппа-дт RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
PD-1 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTARVGCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG

Каппа-дт NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
PD-1 NSQESVTEQDSKDYSLRSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK

5 Каппа-дт SFNRGEC (SEQ ID NO: 47)
PD-1 SFNRGEC (SEQ ID NO: 48)

В некоторых антителах, согласно данному изобретению, мутации гетеродимерного спаривания тяжелых цепей дают термостабильность CH3 более 78
10 °C.

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.
15 Антитела могут быть гликозилированы и в других позициях.

Предпочтительно, антитела согласно данному изобретению содержат вариант Fc-части, который получен из IgG1 человека. Хорошо известно, что IgG1 связывается с семейством рецепторов Fc-гамма (FcγR), также как и с C1q. Взаимодействие с этими рецепторами может индуцировать антителозависимую
20 клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ). Следовательно, вносят определенные аминокислотные замены в человеческую область Fc IgG1 антител согласно данному изобретению для устранения иммунной эффекторной функции. Мутации в области CH2 тяжелых цепей антитела могут включать в себя позиции 234, 235 и 265 в нумерации ЕС для
25 снижения или устранения иммунных эффекторных функций, как показано на Фиг. 1.

Выделенную ДНК, кодирующую область HCVR, можно преобразовать в полноразмерный ген тяжелой цепи путем функционального связывания кодирующей HCVR ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константную
30 область тяжелой цепи или ее вариант. 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. Предпочтительно для антител согласно данному изобретению константные области
35 тяжелой цепи тяжелых цепей представляют собой варианты IgG1 человека.

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 или ее вариант. 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 согласно данному изобретению, константная область легкой цепи анти-PD-L1 части антитела представляет собой вариант лямбда легкой цепи, а константная область легкой цепи анти-PD-1 части антитела представляет собой вариант каппа легкой цепи.

Полинуклеотиды согласно данному изобретению могут быть экспрессированы в клетке-хозяине после функционального связывания последовательностей с последовательностью контроля экспрессии. Векторы экспрессии обычно являются реплицируемыми в организме хозяина, либо как эписомы, либо как неотъемлемая часть хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии содержат селективные маркеры, например тетрациклина, неомицина, глутамин синтетазы и дигидрофолатредуктазы, чтобы обеспечить возможность обнаружения тех клеток, которые трансформированы необходимыми последовательностями ДНК.

Антитело согласно данному изобретению легко можно получать в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO, NS0, HEK293 или COS. Клетки-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), могут быть перенесены в клетку-хозяина хорошо известными способами, которые изменяются в зависимости от типа клетки-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).

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 существу не содержат
5 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%.

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

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

Как применяется в данном документе, термин «связывать» в отношении аффинности антитела к PD-L1 человека (SEQ ID NO: 1), PD-1 человека (SEQ ID NO: 2) или к ним обоим обозначает, если не указано иное, K_d меньше чем около 1×10^{-6} М, предпочтительно, меньше чем около 1×10^{-9} М, согласно определению
обычными способами, известными в данной области техники, включая применение
30 биосенсора для поверхностного плазмонного резонанса (ППР) при 37 °C в целом, как описано в данном документе.

«Эффективное количество» означает количество антитела согласно данному изобретению или фармацевтической композиции, содержащей антитело согласно данному изобретению, которое вызывает биологический или клинический 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.

Данное изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими неограничивающими Примерами.

Пример 1: Экспрессия и очистка антител

Полипептиды переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, полные аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи Антител v3.2, v3.0 и v13844, и кодирующие их нуклеотидные последовательности, перечислены ниже в разделе, озаглавленном «Аминокислотные и нуклеотидные последовательности». Кроме того, SEQ ID NO аминокислотных последовательностей легкой цепи, тяжелой цепи, переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи Антител v3.2, v3.0 и v13844 приведены в Таблице 1(a) ниже. Кроме того, SEQ ID NO для аминокислотных последовательностей CDR связывающих PD-L1 и PD-1 переменных областей антител v3.2, v3.0 и v13844 приведены в Таблице 1(b) и в Таблице 1(c), соответственно.

Антитела согласно данному изобретению, включая, но не ограничиваясь антителами v3.2, v3.0 и v13844, могут быть получены и очищены в целом следующим образом. Соответствующая клетка-хозяин, такая как CHO, может быть либо временно, либо стабильно трансфицирована системой экспрессии для секретирования антител с использованием четверного вектора (то есть одного вектора, кодирующего последовательность для экспрессии двух легких цепей и двух тяжелых цепей), двойных векторов (т. е. двух векторов, которые вместе кодируют две разные легкие цепи и две разные тяжелые цепи), или четырех отдельных векторов (два из которых кодируют различную легкую цепь и два из которых кодируют различную тяжелую цепь). Среда, в которую секретировалось антитело, может быть очищена с использованием любой из многих обычно

применяемых методик. Например, в случае фрагмента Fab среда может быть нанесена на колонку MabSelect (GE Healthcare) или колонку KappaSelect (GE Healthcare), уравновешенную совместимым буфером, таким как фосфатно-солевой буфер (pH 7,4). Колонка может быть промыта для удаления неспецифических связывающих компонентов. Связанное антитело может быть элюировано, например, градиентом pH (например, 20 mM Трис-буфера, от pH 7, 10 mM цитратного натриевого буфера, до pH 3,0, или фосфатно-солевым буфером, от pH 7,4, 100 mM глицинового буфера, до pH 3,0). Обнаружение фракций антител можно проводить, например, с помощью ДСН-ПААГ электрофореза, а затем проводить их объединение. Растворимые агрегаты и мультимеры могут быть эффективно удалены обычными способами, включая эксклюзионную, с гидрофобным взаимодействием, ионообменную, мультимодальную или гидроксиапатитную хроматографию. Антитело может быть сконцентрировано и/или стерильно отфильтровано, используя обычные методики. Продукт может быть незамедлительно заморожен при -70 °C или может быть лиофилизирован.

Таблицы 1(а)-(с): SEQ ID NO для последовательностей биспецифического антитела (BsAb) ингибитора контрольной точки

1(а)

	Антитело v3.2	Антитело v3.0	Антитело v13844
HCVR - анти-PD-L1	3	3	3
HCVR - анти-PD-1	6	7	7
LCVR - анти-PD-L1	4	4	4
LCVR - анти-PD-1	8	8	8
Тяжелая цепь 1 – анти-PD-L1	49	49	29
Тяжелая цепь 2 - анти-PD-1	31	32	33
Легкая цепь 1 – анти-PD-L1	30	30	30
Легкая цепь 2 - анти-PD-1	34	34	34

1(b)

Анти-PD-L1	CDR1	CDR2	CDR3
HC	KASGGTFSSYAIS (SEQ ID NO: 16)	GIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 17)	ARSPDYSPYYYYGMDV (SEQ ID NO: 18)
LC	SGSSSNIGSNTVN (SEQ ID NO: 19)	YGNSNRPS (SEQ ID NO: 20)	QSYDSSLSGSV (SEQ ID NO: 21)

1(c)

Анти-PD1	CDR1	CDR2	CDR3
HC	KASGGTFSSYAIS (SEQ ID NO: 22)	LIIPSFDTAGYAQKFQG (SEQ ID NO: 23) or LIIPMFDTAGYAQKFQG (SEQ ID NO: 24)	ARAEHSSTGTFDY (SEQ ID NO: 25)
LC	RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 26)	SAASSLQS (SEQ ID NO: 27)	QQANHLPFT (SEQ ID NO: 28)

5 Пример 2. Связывание с обеими PD-L1 и PD-1 человека, измеренное с помощью ИФА.

Способность антител согласно данному изобретению связывать оба PD-L1 и PD-1 может быть определена в анализом сэндвич-ИФА. Для анализа связывания PD-1, 96-луночная плашка (Nunc) может быть покрыта PD-1-Fc человека (R&D Systems, кат. № 1086-PD) в течение ночи при 4 °C. Лунки могут быть заблокированы в течение 2 часов с помощью блокирующего буфера (ФСБ, содержащий 5% обезжиренного сухого молока). Лунки могут быть трижды промыть ФСБ, содержащим 0,1% Твин-20. Затем может быть добавлено анти-PD-1 антитело или контрольный IgG (100 мкл), и затем планшет можно инкубировать при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывки плашку можно инкубировать с 100 мкл конъюгата козьего анти-человеческий IgG F(ab')₂-HRP (Jackson Immuno Resaerch, кат. № 109-035-097) при комнатной температуре в течение 1 часа. Плашка может быть промыта и затем инкубирована с 100 мкл 3,3',5,5'-тетра-метилбензидина. Поглощение при 450 нм может быть считано на считывающем устройстве для микроплашек. Полумаксимальная эффективная концентрация (EC₅₀) может быть рассчитана с использованием программного обеспечения GraphPad prism 6.

Для анализа связывания PD-L1 может быть применена аналогичная процедура, за исключением того, что 96-луночная плашка (Nunc) может быть покрыта PD-L1-Fc человека (R&D Systems, кат. № 156-B7) в течение ночи при 4 °C.

В экспериментах проводимых, по существу, как описано выше в этом Примере 2, антитело v3.2 связывается с PD-1 человека с EC50 0,0802 нМ. Для сравнения, аффинность связывания исходного антитела PD-1 (в виде гомодимера IgG4-РАА) составляет 0,1318 нМ. Антитело v3.2 связывается с PD-L1 человека с EC50 0,4554 нМ. Для сравнения, аффинность связывания исходного антитела PD-L1 (в виде гомодимера IgG1-EN) составляет 0,4702 нМ.

Пример 3: Связывание вместе клеток, экспрессирующих PD-1, с клетками, экспрессирующими PD-L1

Способность антител согласно изобретению связывать вместе экспрессирующие PD-1 и PD-L1 клетки определяли с помощью проточной цитометрии с использованием трансфицированных клеток CHO, экспрессирующих либо PD-1, либо PD-L1. Вкратце, клетки с сверхэкспрессией CHO-PD1 и CHOK1-PDL1 могут быть дифференциально помечены CFSE (сукцинимидиловый сложный эфир диацетата карбоксифлуоресцеина) (BD Horizon) или Cell Tracker Deep Red (CTDR/Thermo). Клетки CHO-PD1 и CHOK1-PDL1 раздельно инкубируют в течение 2 часов с исследуемым антителом, таким как антитело v3.2 (на льду в ФСБ + 1% БСА + 0,09% азида натрия). Несвязанные антитела могут быть удалены путем промывания (2 раза, используя 200 мкл ФСБ + 1% БСА + 0,09% азида натрия). Клетки CHOK1-PDL1 инкубируют в течение 2 часов с 45 мкг/мл исходного антитела к PD-L1 или контрольным hIgG1 на льду в ФСБ + 1% БСА + 0,09% азида натрия. Клетки CHO-PD1 инкубируют в течение 2 часов с 45 мкг/мл исходного антитела PD-1 или huIgG4-РАА на льду в ФСБ + 1% БСА + 0,09% азида натрия. Клетки CHO-PD1/антитело v3.2 смешивают с CHOK1-PDL1+ исходное антитело PD-L1 или hIgG1 в конечной концентрации 22,5 мкг/мл. Клетки CHOK1-PDL1/антитело v3.2 могут быть смешаны с CHO-PD1 + исходное антитело PD-1 или huIgG4-РАА в конечной концентрации 22,5 мкг/мл. После примерно 72-часовой инкубации клеток (при 4 °C) проводят измерение на Fortessa X20 (с пробоотборником HTS) в каналах, подходящих для CFSE и CTDR. Используя программное обеспечение FLOWJO® (FlowJo, LLC, Ashland, OR), может быть проведен гейтинг дважды положительных событий (CFSE+/CTDR+) и рассчитан и

сообщен % от общего числа событий (для 2 лунок в повторе). Аппроксимацию и статистику получают с помощью Graphpad Prism, используя нелинейную регрессию (переменный угловой коэффициент, 4 параметра).

- В экспериментах, проводимых в целом, как описано выше в этом Примере 3,
- 5 PD-1/PD-L1 биспецифические антитела опосредуют соединение вместе клеток, которое может быть детектировано проточной цитометрией как дважды положительные события. Связывание антитела v3.2 с клетками CHO-PD1 или CHOK1-PDL1 (с последующим удалением несвязанных) и последующее смешивание с клетками CHOK1-PDL1 или CHO-PD1, соответственно, вызывало
- 10 дозозависимое повышение количества дважды положительных событий по сравнению с фоном (вплоть до 4-кратного повышения по сравнению с только буфером). Это повышение количества дважды положительных событий блокировалось добавлением избытка конкурирующих mAb к PD-L1 и/или PD-1 в высокой концентрации, но не соответствующим неспецифическим контрольным
- 15 IgG, демонстрируя специфичность и зависимость от экспрессии антигена-мишени.

Пример 4. Блокирование взаимодействий PD-L1 с PD-L2, PD-L1 с CD80 и PD-L2 с PD-1.

- А анализ блокирования PD-L1/PD-1 может быть выполнен путем
- 20 смешивания различных количеств анти-PD-1 антитела или контрольного IgG с фиксированным количеством биотинилированного гибридного белка PD-1-Fc (100 нг/мл), и инкубирования при комнатной температуре в течение около 1 часа. После этого смесь может быть перенесена в 96-луночные плашки, предварительно-
- покрытые PD-L1-Fc (100 нг/лунка) или PD-L2-Fc (100 нг/лунка) и затем
- 25 проинкубирована при комнатной температуре еще около 1 часа. После промывки может быть добавлен конъюгат стрептавидина HRP, и может быть измерено поглощение при 450 нм. IC50 представляет концентрацию антитела, необходимую для 50% ингибирования связывания PD-1 с PD-L1 или связывания с PD-L2.

- Аналогичным образом, анализ блокирования PD-L1/B7-1 может быть
- 30 выполнен с использованием плашек, покрытых 1 мкг/мл B7-1-Fc (R&D Systems, кат. № 140-B1-100). Концентрацию антитела, необходимую для 50% ингибирования связывания PD-L1 с B7-1 (IC50) рассчитывают с использованием программного обеспечения GraphPad prism 6.

В экспериментах, проводимых в основном так, как описано выше в этом Примере 4, антитело v3.2, по-видимому, блокирует взаимодействие между рецептором PD-1 и лигандом PD-L1 в промежуточной и более высокой концентрации и, по-видимому, связывает вместе рецептор и лиганд с двойным связыванием при более низкой и промежуточной концентрации, с более сильными аффинностями, чем естественное взаимодействие лиганд-рецептор. Кроме того, антитело v3.2, по-видимому, блокирует взаимодействие PD-L1 с B7-1 с IC50 0,75 нМ и взаимодействие PD-L2 с PD-1 с IC50 2,27 нМ.

10 **Пример 5: Функциональный анализ *in vitro* антител в смешанной лейкоцитарной реакции (MLR)**

Моноциты CD14⁺ могут быть выделены из замороженных МКПК человека, полученных от здорового донора (AllCells кат. № PB005F) с помощью гранул MACS (Miltenyi, кат. № 130-091-153). Незрелые дендритные клетки (ДК) могут быть получены путем культивирования этих моноцитов в 12 мл полной среды RPMI-1640 в присутствии 1000 МЕ/мл hGM-CSF и 500 МЕ/мл hIL-4 в течение 4 дней. CD4⁺ Т-лимфоциты могут быть очищены из свежих МКПК человека от другого здорового донора (AllCells кат. № PB002) с помощью отрицательного отбора (Miltenyi 130-096-533). Затем два типа клеток могут быть смешаны в отдельных лунках 96-луночной плашки с 100 мкл полной среды AIM-V, содержащей 5×10^4 CD4⁺ Т-лимфоцитов и 4×10^3 незрелых ДК в лунке (Е:Т = 12,5:1). Может быть добавлено 100 мкл полной среды AIM-V, содержащей IgG1-EN человека, исходное анти-PD-1 антитело, исходное анти-PD-1 антитело, комбинации исходных антител, или антитело v3.2 в 8 повторностях (серийно разбавляется 3:1 начиная с 32 нМ, соответственно). После инкубации в течение 72 часов при 37 °C и 5% CO₂ супернатанты могут быть собраны и затем могут быть измерены ИФН-γ и ИЛ-2 человека с помощью наборов ИФА (R&D кат. № SIF50) и (R&D кат. № S2050).

В экспериментах, проводимых в основном так, как описано выше в этом Примере 5, добавление антител v3.2 к ко-культурам аллогенных CD4⁺ Т-лимфоцитов и ДК приводило к увеличению продуцирования ИФН-γ соответствующими CD4 Т-лимфоцитами с EC50 0,005 нМ, по сравнению с 0,026 нМ, 0,029 нМ и 0,115 нМ для исходного PD-L1 Ат, исходного PD-1 Ат и их комбинации, соответственно. Точно так же, антитело v3.2 также увеличивало

5 продуцирование ИЛ-2 в ко-культуре с EC50 0,011 нМ, по сравнению с PD-L1 Ат, PD-1 Ат и комбинацией PD-L1 Ат + PD-1 Ат (0,034 нМ, 0,023 нМ и 0,046 нМ, соответственно). Результаты показывают, что антитело v3.2 превосходит по своей способности усиливать активацию Т-лимфоцитов *in vitro* исходное PD-L1 Ат в отдельности, исходное PD-1 Ат в отдельности, или их комбинацию.

Пример 6: Восстановление Т-лимфоцитов

10 PD-L1 положительные человеческие Т-активирующие клетки CHOK1 (Promega part кат. № CS187108), и PD-L1 негативные человеческие Т-активирующие клетки CHOK1 (Promega part кат. № CS187110) могут быть получены в Promega. PD-L1/PD-L2, дважды положительные человеческие Т-активирующие клетки CHOK1 могут быть созданы путем трансфекции PD-L1 положительных человеческих Т-активирующих клеток CHOK1 вектором, кодирующим полноразмерный PD-L2. Эти клетки могут быть помещены в 96-луночную белую непрозрачную плашку для культивирования тканей из расчета 40000 клеток/лунка в 100 мкл среды (10% ФБС F-12, 0,2 мг/мл гигромицина-В и 0,2 мг/мл G418) и проинкубированы в течение ночи при 37 °С с 5% CO₂. Среда может быть удалена из аналитических плашек на следующий день и серийно разведенные тестируемые и контрольные антитела в буфере для анализа (2% ФБС RPMI) могут 20 быть добавлены в количестве 40 мкл/лунка. Клетки GloResponse NFAT-luc2/PD1 Jurkat (Promega part кат. № CS187102) могут быть повторно ресуспендированы в буфере для анализа в концентрации $1,25 \times 10^6$ /мл и добавлены в плашку в количестве 40 мкл/лунка. После 6 часов индукции аналитические плашки можно извлечь из инкубатора и уравновесить при комнатной температуре в течение 5-10 минут. Реагент Био-Glo™ (Promega G7941) может быть приготовлен в соответствии с инструкциями изготовителя и добавлен в количестве 80 мкл/лунка. Затем плашки могут быть проинкубированы от 5 до 10 минут при комнатной температуре. Люминесценция может быть измерена в считывающем устройстве для плашек, а данные могут быть проанализированы с помощью GraphPad Prism 7.

30 В анализе PD-1/репортер NFAT Jurkat Т-лимфоцитов, проводимом, по существу, как описано выше в этом Примере 6, наблюдали, что PD-L1-положительные, активирующие Т-лимфоциты, клетки CHO человека подавляют активацию Т-лимфоцитов. PD-1 Ат или PD-L1 Ат ре-активировали Т-лимфоциты путем отмены подавления, опосредованного PD-L1 - PD-1. Однако антитело v3.2

оказалось лучше (EC50 0,12 нМ) по сравнению либо с исходным PD-L1 Ат отдельно (1,92 нМ), либо с исходным PD-1 Ат отдельно (1,01 нМ), либо с комбинацией исходного PD-1 Ат и исходного PD-L1 Ат (0,796 нМ), в его способности восстанавливать Т-лимфоциты. Когда в этой системе применяли PD-L1/PD-L2 дважды положительные, активирующие Т-лимфоциты, клетки CHO, также подавлялась активация PD-1-положительных репортерных Т-лимфоцитов. Исходное PD-1 Ат, но не исходное PD-L1 Ат, было способно ре-активировать Т-лимфоциты. Однако антитело v3.2 лучше чем (EC50 0,181 нМ) исходное PD-1 Ат отдельно (0,946 нМ), или чем комбинация исходного PD-1 Ат и исходного PD-L1 Ат (1,251 нМ), в своей способности восстанавливать Т-лимфоциты.

Пример 7. Анализ эффективности *in vivo*

Эффективность антител согласно данному изобретению может быть испытана в моделях ксенотрансплантата в иммунодефицитных мышах, которым вводили иммунные клетки человека, для оценки способности ограничивать или разрушать развившиеся опухоли в модели, посредством усиления Т-клеточного ответа на алло-антигены. Все животные в исследованиях одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных, и использовались в соответствии с действующими нормами и стандартами Министерства сельского хозяйства США и Национального института здравоохранения.

Часть А: Модель ксенотрансплантата NCI-H292 НМКРЛ человека

Мышам NOD scid gamma (NSG) из Jackson Laboratories (возраст - 7 недель, самки, в группах по 7-8 мышей) подкожно имплантируют в бок либо 2×10^6 клеток NCI-H292, либо смесь 2×10^6 клеток NCI-H292 и 1×10^6 свежевыделенных МКПК человека в HBSS (общий объем 0,2 мл). Начиная с Дня 1, мышей обрабатывают внутрибрюшинной инъекцией либо IgG1-EN человека (контроль), исходного антитела-PD-L1 антитела (0,25 мг/кг), либо исходного анти-PD-1 антитела (0,25 мг/кг), либо комбинацией исходных антител (0,25 мг/кг каждое), либо антителом v3.0, v3.2 или v13844 (0,5 мг/кг) один раз в неделю в трех дозах. Состояние и поведение животных, включая уход за собой и способность к передвижению, отслеживали, по меньшей мере, два раза в неделю. Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю.

В экспериментах, проводимых, по существу, как описано выше в Части А Примера 7, антитела v3.0, v3.2 и v13844, вводимые в дозе 10 мг/кг, хорошо переносились и были безопасными, что контролировали по массе тела и клиническим наблюдениям. Мышей, которым имплантировали смесь опухолевых клеток NCI-H292 и МКПК, обрабатывали анти-PD-L1 или анти-PD-1 антителом, или комбинацией анти-PD-L1 и анти-PD-1 антител в дозе 10 мг/кг каждое, все задерживали рост опухоли по сравнению с лечением контрольной молекулой - IgG1-EN человека. Для мышей, которым имплантировали смесь опухолевых клеток NCI-H292 и МКПК, обработка биспецифичным Ат PD-1/PD-L1 (v13844, v3.0 или v3.2) в количестве 10 мг/кг раз в неделю была для всех более эффективной с полной регрессией (ПР) с 7/8, 5/8 и 5/8 соответственно, чем комбинированная терапия (исходное антитело к PD-L1 + исходное антитело к PD-1) (ПР в 2/8).

Часть Б: модель ксенотрансплантата HSC827 НМРЛ человека

Мышам NSG из Jackson Laboratories (возраст - 7 недель, самки, в группах по 8 мышей) подкожно имплантировали в бок 10×10^6 клеток HSC827 в HBSS (общий объем 0,2 мл). Все Т-лимфоциты 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-лимфоциты размораживали, промывали, подсчитывали и внутривенно инфузировали ($3,5 \times 10^6$ Т-лимфоцитов в 0,2 мл ФСБ/мышь) мышам, несущим опухоль HSC827, на спустя 44 дня после имплантации. Начиная с следующего дня мышей обрабатывают внутрибрюшинной инъекцией IgG1-EN человека (контроль), исходным анти-PD-L1 антителом, исходным анти-PD-1 антителом, или комбинацией исходного анти-PD-L1 антитела и исходного анти-PD-1 антитела, в дозе 2 мг/кг каждое, или антителом v3.2 с тремя уровнями дозы (0,02, 0,2 или 2 мг/кг), один раз в неделю в течение 4 недель. Мышам дают вторую инфузию размноженных Т-лимфоцитов ($2,5 \times 10^6$ Т-лимфоцитов в 0,2 мл ФСБ/мышь) в День 56. Состояние и поведение животных, включая уход за собой и способность к передвижению, отслеживали, по меньшей мере, два раза в неделю. Массу тела и объем опухоли измеряли два раза в неделю. Объемы опухолей измеряют один раз в неделю с использованием электронных штангенциркулей, как описано в типовой инструкции под названием «Измерение роста опухоли IM». Объем опухоли рассчитывают по формуле: объем опухоли (мм^3) = $\pi/6$ * длина * ширина².

В экспериментах, выполненных, по существу, как описано выше в части В Примера 7, антитело v3.2 при всех трех уровнях дозы (0,02, 0,2 или 2 мг/кг) показывало похожий противоопухолевый ответ в модели сформированной опухоли НСС827 в присутствии размноженных Т-лимфоцитов. Кроме того, антитело v3.2 при 0,02 мг/кг задерживало рост опухоли более значительно, чем анти-PD-L1 антитело (2 мг/кг, $p=0,05$), анти-PD-1 антитело (2 мг/кг, $p<0,001$) и комбинация обоих агентов (2 мг/кг каждый, $p<0,001$) в День 69 после имплантации опухолевых клеток (смотрите Таблицу 2).

10

Таблица 2: Ингибирование опухоли на День 69 в модели опухоли НСС827 НМКРЛ человека

Группа обработки	Объем опухоли (в мм ³) на День 69 (Среднее $\pm$ СОС)	значение p (в сравнение с 0,02 мг/кг BsAb v3.2/Т- лимфоцитов)
2 мг/кг IgG1-EN человека	1572,4 $\pm$ 87,8	<0,001
2 мг/кг IgG1-EN человека/Т- лимфоциты	1062,2 $\pm$ 81,7	<0,001
2 мг/кг анти-PD-L1 mAt/Т- лимфоциты	968,7 $\pm$ 58,7	0,005
2 мг/кг анти-PD-1 mAt/Т- лимфоциты	1275,0 $\pm$ 67,2	<0,001
2 мг/кг анти-PD-L1 mAt + 2 мг/кг анти-PD-1 mAt/Т- лимфоциты	1021,0 $\pm$ 58,9	<0,001
0,02 мг/кг антитела v3.2/Т- лимфоциты	761,8 $\pm$ 33,3	НД
0,2 мг/кг антитела v3.2/Т- лимфоциты	759,8 $\pm$ 43,3	0,975
2 мг/кг антитела v3.2/Т- лимфоциты	721,3 $\pm$ 49,2	0,516

СОС: стандартная ошибка среднего

15

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности

SEQ ID NO: 1 (PD-L1 человека)
 MRIFAVFIFMTYWHLNFAFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIV
 YWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDA
 GVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKA
 EVIWTSSDHQVLGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEEN
 HTAELVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQ
 DTNSKKQSDTHLEET

- SEQ ID NO: 2 (PD-1 человека)
 MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFT
 CSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFH
 5 MSVVRARRNDSTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRP
 AGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAV
 PVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPGMGTSSPARRGSADGP
 RSAQPLRPEDGHCSWPL
- 10 SEQ ID NO: 3 (HCVR PD-L1 Ат)
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
 GTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSPDYSPYYYG
 MDVWGQGTTTVTVSS
- 15 SEQ ID NO: 4 (LCVR PD-L1 Ат)
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRP
 SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGGIKLTVLG
- 20 SEQ ID NO: 5 (HCVR PD-1 Ат-Xaa)
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGLIIPX
 aaFDTAGYAQKFQGRVAITVDESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARAEHSSTGTF
 DYWGQGTLTVTVSS
 Xaa: М или S.
- 25 SEQ ID NO: 6 (HCVR PD-1 Xaa-S)
 QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS SYAISWVRQA PGQGLEWMGL
 IIPSFDTAGY AQKFQGRVAI TVDESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARAE
 HSSTGTFDYW GQGTLTVTVSS
- 30 SEQ ID NO: 7 (HCVR PD-1 Xaa-M)
 QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS SYAISWVRQA PGQGLEWMGL
 IIPMFDTAGY AQKFQGRVAI TVDESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARAE
 HSSTGTFDYW GQGTLTVTVSS
- 35 SEQ ID NO: 8 (LCVR PD-1 Ат)
 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLISAASSLQS
 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANHLPTFGGGTKVEIK
- 40 SEQ ID NO: 9 (область из домена CH1 PD-L1 Ат v3.2 и v13844 HC)
 SLKSV
- SEQ ID NO: 10 (область из домена CH2 PD-L1 Ат HC)
 AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVS
- 45 SEQ ID NO: 11 (область из домена CH3 HC для PD-1 v13844 и PD-L1 v3.2)

VYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
ALV

SEQ ID NO: 12 (область CH3 домена HC PD-1 v3.2 и PD-L1 v13844)

5 REPQVYVLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVL
DSDGSF

SEQ ID NO: 13 (область из домена CH1 PD-1 Ат v3.2 и PD-1 v13844 HC)

10 EAPSSKSTSGGTAALGCLVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSL
WSVVTGPS

SEQ ID NO: 14 (область из константной области LC PD-L1 Ат v3.2 и v13844)
AAESEL

15 SEQ ID NO: 15 (область из константной области LC PD-1 Ат v3.2 и v13844)
RVGCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLR

SEQ ID NO: 16 (HCDR1 PD-L1 Ат)
KASGGTFSSYAS

20 SEQ ID NO: 17 (HCDR2 PD-L1 Ат)
GIPIFGTANYAQKFQG

25 SEQ ID NO: 18 (HCDR3 PD-L1 Ат)
ARSPDYSPYYYYGMDV

SEQ ID NO: 19 (LCDR1 PD-L1 Ат)
SGSSSNIGSNTVN

30 SEQ ID NO: 20 (LCDR2 PD-L1 Ат)
YGNSNRPS

SEQ ID NO: 21 (LCDR3 PD-L1 Ат)
QSYDSSLGSGV

35 SEQ ID NO: 22 (HCDR1 PD-1 Ат)
KASGGTFSSYAS

40 SEQ ID NO: 23 (HCDR2 PD-1 Ат; v3.2)
LIIPSFDTAGYAQKFQG

SEQ ID NO: 24 (HCDR2 PD-1 Ат; v3.0)
LIIPMFDTAGYAQKFQG

45 SEQ ID NO: 25 (HCDR3 PD-1 Ат)
ARAEHSSTGTFDY

SEQ ID NO: 26 (LCDR1 PD-1 Ат)

RASQGISSWLA

SEQ ID NO: 27 (LC DR2 PD-1 A_T)
SAASSLQS

5

SEQ ID NO: 28 (LC DR3 PD-1 A_T)
QQANHLPFT

SEQ ID NO: 29 (HC PD-L1 A_T v13844)

10 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIF
GTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSPDYSPYYYYG
MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
15 KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVSVS
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPSRDELTKNQVSLCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

20 SEQ ID NO: 30 (LC PD-L1 A_T v3.2, v3.0 и v13844)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCQSYDSSLSGSVFGGGIKLTVLGQ
PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT
PSKQSNNKYAAESELSTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC

25

SEQ ID NO: 31 (HC PD-1 A_T v3.2)
QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS SYAISWVRQA PGQGLEWMGL
IIPSFDTAGY AQKFQGRVAI TVDESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARAE
HSSTGTFDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP EAPSSKSTSG GTAALGCLVT
30 DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLESS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVSVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
VYVLPSPSRDE LTKNQVSLLC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYLTWPPV
35 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 32 (HC PD-1 v3.0)
QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS SYAISWVRQA PGQGLEWMGL
40 IIPMFDTAGY AQKFQGRVAI TVDESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARAE
HSSTGTFDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP EAPSSKSTSG GTAALGCLVT
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLESS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVSVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
45 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
VYVLPSPSRDE LTKNQVSLLC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYLTWPPV
LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 33 (HC PD-1 At v13844)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGGTFS SYAISWVRQA PGQGLEWMGL
IIPMFDTAGY AQKFQGRVAI TVDESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARAE
HSSTGTFDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP EAPSSKSTSG GTAALGCLVT
5 DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLESS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAAGG PSVFLFPPKP
KDTLMIS RTP EVTCVVVSVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
VYVYPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
10 LDSDGSFALV SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 34 (LC PD-1 At v3.2, v3.0 и v13844)

DIQMTQSPSS VSASVGDRVIT ICRASQGIS SWLAWYQQKP GKAPKLLISA
ASSLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ ANHLPFTFGG
15 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA RVGCLLNIFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLRSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC

SEQ ID NO: 35 Последовательность ДНК LC PD-L1

20 CAGTCCGTCC TGA CT CAGCC ACCTTCCGCT AGCGGTACCC CCGGCCAGAG
AGTGACAATC TCATGCTCCG GTTCCAGCTC TAACATTGGC TCTAACACTG
TCAATTGGTA CCAGCAGCTG CCAGGAACCG CACCAAAGCT GCTGATCTAT
GGAAACTCAA ATAGGCCTAG CGGGGTGCCA GACCGGTTTA GCGGATCTAA
AAGTGGGACT TCAGCTTCCC TGGCAATTTC TGGACTGCAG AGTGAGGACG
25 AAGCTGATTA CTATTGCCAG TCCTACGATA GTTCACTGAG CGGTTCCGTG
TTCGGCGGAG GGATCAAGCT GACAGTCCTG GGCCAGCCCA AGGTGAGTTC
TAGAGGATCC ATCTGGGATA AGCATGCTGT TTTCTGTCTG TCCCTAACAT
GCCCTGTGAT TATCCGCAA CAACACACCC AAGGGCAGAA CTTTGTTACT
TAAACACCAT CCTGTTTGCT TCTTTCCTCA GGCCGCTCCT TCCGTGACTC
30 TGTTTCCCC TTCCAGCGAG GAACTGCAGG CCAATAAGGC CACCCTGGTG
TGCTGATTA GCGACTTCTA TCCTGGAGCT GTGACAGTCG CATGGAAGGC
CGATTCTAGT CCAGTGAAAG CAGGGGTCGA GACCACAACT CCCTCCAAGC
AGAGCAACAA CAAGTACGCA GCCGAGTCTG AACTGAGTCT GACCCCAGAA
CAGTGGAAGT CCCACAGGAG TTATTCATGC CAGGTGACCC ATGAGGGCTC
35 CACAGTGGAG AAGACCGTGG CCCCTGCTGA GTGTAGC

SEQ ID NO: 36 Последовательность ДНК PD-1 LC

GACATTCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCGTGAGCGCCAGCGTCGGGGA
CCGAGTGACCATCACATGCAGGGCCAGCCAGGGTATTTCTAGTTGGCTGG
40 CTTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAGCTGCTGATCTCCGCC
GCTTCAAGCCTGCAGTCCGGAGTGCCCTCTCGATTCTCTGGTAGTGGCTC
AGGAACAGACTTTACTCTGACCATTTCCCTCTCTGCAGCCTGAGGATTTCTG
CTACTTACTATTGCCAGCAGGCAAACCACCTGCCATTCACCTTTGGCGGA
GGGACAAAAGTGGAGATCAAGAGAACCGTCGCGGCGCCAGTGTCTTCAT
45 TTTTCCCCCTAGCGACGAACAGCTGAAGTCTGGGACAGCCAGAGTGGGCT
GTCTGCTGAACAACTTCTACCCTAGAGAGGCTAAAGTGCAGTGGAAGGTC
GATAACGCACTGCAGTCCGGAATTCTCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGA
CTCAAAAGATAGCACCTATTCCCTGAGAAGCACACTGACTCTGAGCAAGG
CCGACTACGAGAAGCATAAAGTGTATGCTTGTGAAGTCACCCACCAGGGG

CTGAGTTCACCAGTCACAAAATCATTCAACAGAGGGGAGTGC

SEQ ID NO: 37 Последовательность ДНК HC PD-L1

5 CAGGTCCAGC TGGTGCAGAG CGGAGCCGAA GTGAAGAAAC CCGGTAGCAG
CGTCAAAGTG TCATGTAAAG CCTCAGGGGG AACATTCTCC AGCTACGCCA
TCTCCTGGGT GAGACAGGCT CCAGGACAGG GACTGGAGTG GATGGGAGGA
ATCATCCCTA TCTTCGGCAC CGCCAACTAC GCTCAGAAGT TTCAGGGCCG
CGTGACCATC ACAGCCGACA AGAGCACCTC TACAGCTTAT ATGGAGCTGT
10 CTTCCCTGAG AAGCGAGGAT ACAGCCGTGT ACTATTGCGC TCGTCCCCC
GACTACAGCC CTTACTATTA CTATGGCATG GACGTGTGGG GCCAGGGCAC
CACAGTGACC GTGAGCTCTG CTAGCACAAA GGGCCCATCC GTGTTCCAC
TGGCTCCATC CAGCAAGTCC ACCAGCGGAG GAACAGCCGC TCTGGGCTGT
CTGGTGAAGG ACTATTTCCC AGAGCCAGTG ACCGTGTCCT GGAACAGCGG
CGCCCTGACC TCTGGAGTGC ACACATTTCC CGCTGTGCTG CAGTCTTCCG
15 GCCTGTACTC TCTGAAGTCC GTGGTGACCG TGCCTAGCTC TTCCCTGGGC
ACCCAGACAT ATATCTGCAA CGTGAATCAC AAGCCTTCCA ATACAAAGGT
GGACAAGAGG GTGGAGCCAA AGAGCTGTGA TAAGACCCAT ACATGCCCCC
CTTGTCTGC TCCAGAGGCT GCTGGAGGAC CAAGCGTGTT CCTGTTTCCA
CCCAAGCCCA AGGACACCCT GATGATCTCT AGGACCCCTG AGGTGACATG
20 CGTGGTGGTG TCCGTGTCCC ACGAGGACCC AGAGGTGAAG TTAACTGGT
ACGTGGATGG CGTGGAGGTG CATAATGCTA AGACCAAGCC TAGGGAGGAG
CAGTACAACA GCACCTATCG GGTGGTGTCT GTGCTGACAG TGCTGCATCA
GGATTGGCTG AACGGCAAGG AGTATAAGTG CAAGGTGTCT AATAAGGCCC
TGCCCCTCC TATCGAGAAG ACCATCTCCA AGGCCAAGGG CCAGCCTAGG
25 GAGCCACAGG TGTACGTGCT GCCTCCAAGC CGGGACGAGC TGACAAAGAA
CCAGGTGTCT CTGCTGTGCC TGGTGAAGGG CTTCTATCCA TCTGATATCG
CTGTGGAGTG GGAGTCCAAT GGCCAGCCCG AGAACAATTA CCTGACCTGG
CCCCCTGTGC TGGACAGCGA TGGCTCTTTC TTTCTGTATT CCAAGCTGAC
AGTGGATAAG AGCCGGTGGC AGCAGGGCAA CGTGTTCTCC TGTCTGTGA
30 TGCACGAGGC ACTGCACAAT CATTACACCC AGAAATCCCT GTCAGTACG
CCCGGCAAG

SEQ ID NO: 38 Последовательность ДНК PD-1 HC (v3.2)

35 CAGGTCCAGCTGGTGCAGAGCGGGGCAGAGGTCAAGAAACCCGGTAGCTC
CGTGAAGGTCAGCTGCAAGGCTTCCGGCGGAACCTTCTCTAGTTACGCCA
TCAGCTGGGTGAGACAGGCTCCTGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCCTG
ATCATTCCATCTTTTGATAACCGCTGGCTACGCACAGAAGTTTCAGGGACG
GGTGGCAATTACAGTCGATGAGTCAACCAGCACAGCCTATATGGAGCTGT
CAAGCCTGCGGTCCGAAGACACTGCCGTGTACTATTGCGCAAGGGCCGAA
40 CACTCCTCTACTGGAACCTTCGATTACTGGGGGCAGGGTACCCTGGTGAC
AGTCAGTTCAGCCAGCACTAAGGGACCCAGCGTGTTTCCAGAGGCCCCCT
CTAGTAAATCCACTTCTGGAGGCACCGCTGCACTGGGCTGTCTGGTGACC
GATTACTTCCCAGAGCCCGTACAGTGAGCTGGAACCTCCGGGGCCCTGAC
CAGCGGAGTCCATACATTTCTGCTGTGCTGGAGTCAAGCGGGCTGTACT
45 CCCTGTCTCTGTGGTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACTCAGACC
TATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCTTCAAATACAAAAGTTGACAAACG
TGTGGAACCCAAGAGTTGTGATAAAACCCATACATGCCCCCTTGTCCGG
CGCCAGAGGCTGCAGGAGGACCAAGCGTGTTCTGTTTCCACCCAAGCCT
AAAGACACACTGATGATTTCCCGAACCCCGAAGTCACATGCGTGGTCGT

GTCTGTGAGTCACGAGGACCCTGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATG
 GCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCTAGGGAGGAACAGTACAAC
 TCAACCTATCGCGTCGTGAGCGTCCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCT
 GAACGGCAAAGAATATAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCCCTGCCCGCTC
 5 CTATCGAGAAAACCATTTCCAAGGCTAAAGGGCAGCCTCGCGAACCACAG
 GTCTACGTGCTGCCTCCATCCCGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTCTC
 TCTGCTGTGCCTGGTGAAAGGCTTCTATCCATCAGATATTGCTGTGGAGT
 GGGAAAGCAATGGGCAGCCCGAGAACAATTACCTGACTTGGCCCCCTGTG
 CTGGACTCTGATGGGAGTTTCTTTCTGTATTCTAAGCTGACCGTGGATAA
 10 AAGTAGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTTAGTTGTTTCAGTGATGCATGAAG
 CCCTGCATAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGTCCCCCGGA

SEQ ID NO: 39 Последовательность ДНК PD-1 HC (v13844)
 CAGGTCCAGCTGGTGCAGAGCGGGGCAGAGGTCAAGAAACCCGGTAGCTC
 15 CGTGAAGGTCAGCTGCAAGGCTTCCGGCGGAACCTTCTCTAGTTACGCCA
 TCAGCTGGGTGAGACAGGCTCCTGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCCTG
 ATCATTCCAATGTTTCGACACCGCTGGCTACGCACAGAAGTTTCAGGGACG
 GGTGGCAATTACAGTCGATGAGTCAACCAGCACAGCCTATATGGAGCTGT
 CAAGCCTGCGGTCCGAAGACACTGCCGTGTACTATTGCGCAAGGGCCGAA
 20 CACTCCTCTACTGGAACCTTCGATTACTGGGGGCAGGGTACCCTGGTGAC
 AGTCAGTTCAGCCAGCACTAAGGGACCCAGCGTGTTTCCAGAGGCCCCCT
 CTAGTAAATCCACTTCTGGAGGCACCGCTGCACTGGGCTGTCTGGTGACC
 GATTACTTCCCAGAGCCCGTACAGTGAGCTGGAACCTCCGGGGGCCCTGAC
 CAGCGGAGTCCATACATTTCTGCTGTGCTGGAGTCAAGCGGGCTGTACT
 25 CCCTGTCCTCTGTGGTCAACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACCTCAGACC
 TATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCTTCAAATACAAAAGTTGACAAACG
 TGTGGAACCCAAGAGTTGTGATAAAACCCATACATGCCCCCCTTGTCCGG
 CGCCAGAGGCTGCAGGAGGACCAAGCGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAGCCT
 AAAGACACACTGATGATTTCCCGAACCCCCGAAGTCACATGCGTGGTCGT
 30 GTCTGTGAGTCACGAGGACCCTGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATG
 GCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCTAGGGAGGAACAGTACAAC
 TCAACCTATCGCGTCGTGAGCGTCCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCT
 GAACGGCAAAGAATATAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCCCTGCCCGCTC
 CTATCGAGAAAACCATTTCCAAGGCTAAAGGGCAGCCTCGCGAACCACAG
 35 GTCTACGTGTATCCTCCAAGCCGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTCTC
 CCTGACTTGTCTGGTGAAAGGGTTTTACCCTAGTGATATCGCTGTGGAGT
 GGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAATTATAAGACTACCCCCCCTGTG
 CTGGACAGTGATGGGTCATTCGCACTGGTCTCCAAGCTGACAGTGGACAA
 ATCTCGGTGGCAGCAGGGAAATGTCTTTTCATGTAGCGTGATGCATGAAG
 40 CACTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCACTGTCACTGTCAACCAGGAAAA

SEQ ID NO: 40 IgG1 CH дТ
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
 45 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
 LVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

50
 SEQ ID NO: 41 v3.2 PD-L1 CH

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP
KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVSVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
5 EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 42 v13844 PD-1 CH
10 ASTKGPSVFPEAPSSKSTSGGTAALGCLVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 43 v3.2 PD-1 CH
20 ASTKGPSVFPEAPSSKSTSGGTAALGCLVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLLCVVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 44 v13844 PD-L1 CH
30 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSPRDELTKNQVSLLCVVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

35 SEQ ID NO: 45 CL лямбда дикого типа
QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

40 SEQ ID NO: 46 CL PD-L1
QPKAAPSVTFLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAESELSTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC

SEQ ID NO: 47 CL каппа дикого типа
45 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 48 CL каппа-PD-1
50 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTARVGCCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSRSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 49 (HC PD-L1 Ат v3.2)
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGGGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSPDYSPYYYYG

MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLKSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIVSVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
5 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 50 Последовательность ДНК PD-L1 LC (кодоновый вариант 1)

CAGTCTGTGC TGACTCAGCC ACCTTCCGCC TCTGGAACCC CAGGACAGAG GGTCACAATC
AGTTGCTCAG GGAGCTCCTC TAACATTGGA AGCAAACTG TGAATTGGTA CCAGCAGCTG
5 CCTGGGACCG CTCCAAAGCT GCTGATCTAT GGCAACTCCA ATCGACCATC TGGAGTGCCT
GACCGGTTCA GCGGCTCCAA ATCTGGCACC AGTGCTTCAC TGGCAATTAG TGGCCTGCAG
TCCGAGGACG AAGCCGATTA CTATTGCCAG AGCTACGATA GTTCACTGAG CGGCTCCGTG
TTCGGCGGGG GAATCAAGCT GACAGTCTG GGACAGCCAA AAGCGGCGCC CAGCGTGACT
CTGTTTCCAC CCAGCTCCGA GGAAGTGCAG GCCAATAAGG CTACCCTGGT CTGTCTGATT
10 TCCGACTTCT ACCCCGGGGC TGTGACAGTC GCATGGAAGG CCGATTCTAG TCCTGTGAAA
GCAGGAGTCG AGACCACAAC TCCATCAAAG CAGAGCAACA ACAAGTACGC AGCCGAGAGC
GAGCTGTCTC TGACACCTGA ACAGTGGAAG AGCCACCGGT CTTATAGTTG TCAGGTGACT
CACGAGGGCT CAACAGTGGA AAAGACAGTC GCACCCGCAG AATGCTCA

SEQ ID NO: 51 Последовательность ДНК PD-L1 HC (кодоновый вариант 1)

15 CAGGTCCAGC TGGTGCAGAG CGGAGCCGAA GTGAAGAAAC CAGGCAGCTC CGTCAAGGTG
TCATGCAAAG CCAGCGGCGG GACTTTCTCT AGTTACGCTA TCTCCTGGGT GAGACAGCA
CCAGGACAGG GACTGGAGTG GATGGGAGGA ATCATTCCTA TCTTCGGGAC AGCTAACTAC
GCACAGAAGT TTCAGGGAAG GGTGACTATT ACCGCCGACA AATCTACAAG TACTGCTTAT
ATGGAGCTGT CAAGCCTGAG GAGCGAAGAT ACCGCAGTGT ACTATTGCGC CCGTCCCCC
20 GACTACTCTC CTTACTATTA CTATGGCATG GACGTGTGGG GGCAGGGAAC CACAGTCACA
GTGTCCTCTG CCAGCACTAA GGGGCCTTCA GTGTTTCCAC TGGCACCCAG TTCAAAATCA
ACAAGCGGAG GAACTGCCGC TCTGGGATGT CTGGTGAAGG ACTATTTCCC AGAGCCAGTC
ACCGTGAGCT GGAAGTCCGG CGCACTGACT TCCGAGTCC ACACCTTTCC AGCCGTGCTG
CAGAGCTCCG GACTGTACTC TCTGAAGAGT GTGGTCACAG TGCCTTCAAG CTCCCTGGGC
25 ACCCAGACAT ATATCTGCAA CGTGAATCAC AAGCCTAGTA ATACTAAGGT TGACAAACGT
GTGGAACCAA AGAGCTGTGA TAAAACTCAT ACCTGCCCCC CTTGTCCGGC GCCAGAGGCA
GCAGGAGGAC CAAGCGTGTT CCTGTTTCCA CCAAGCCCA AAGACACCCT GATGATTAGC
CGAACCCCTG AAGTCACATG CGTGGTCGTG TCCGTGTCTC ACGAGGACCC AGAAGTCAAG
TTCAACTGGT ACGTGGATGG CGTCGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAACC CCGGGAGGAA
30 CAGTACAACA GCACCTATAG AGTCGTGTCC GTCCTGACAG TGCTGCACCA GGATTGGCTG
AACGGCAAGG AATATAAGTG CAAAGTGTCC AATAAGGCCC TGCCCGCTCC TATCGAGAAA
ACCATTTCTA AGGCAAAAGG CCAGCCTCGC GAACCACAGG TCTACGTGTA TCCTCCAAGC
CGGGACGAGC TGACAAAGAA CCAGGTCTCC CTGACTTGTC TGGTGAAAGG GTTTTACCCT
AGTGATATCG CTGTGGAGTG GGAATCAAAT GGACAGCCAG AGAACAATTA TAAGACTACC
35 CCCCCTGTGC TGGACAGTGA TGGGTCATTC GCACTGGTCT CCAAGCTGAC AGTGGACAAA
TCTCGGTGGC AGCAGGGAAA TGTCTTTTCA TGTAGCGTGA TGCATGAAGC ACTGCACAAC
CATTACACCC AGAAGTCACT GTCAGTGTCA CCAGGAAAA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывает PD-L1 человека (SEQ ID NO: 1) и PD-1 человека (SEQ ID NO: 2), содержащее:
 - 5 е) первую тяжелую цепь (HC1), содержащую вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;
 - ф) первую легкую цепь (LC1), содержащую вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;
 - 10 г) вторую тяжелую цепь (HC2), содержащую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и
 - h) вторую легкую цепь (LC2), содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.
2. Антитело по п. 1, содержащее:
 - 15 а) HC1, содержащую, в порядке от N-конца к С-концу, HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 в домене CH1, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 в домене CH2, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 в домене CH3;
 - 20 б) LC1, содержащую, в порядке от N-конца к С-концу, LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 в константной области;
 - в) HC2, содержащую, в порядке от N-конца к С-концу, HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, аминокислотную
 - 25 последовательность SEQ ID NO: 13 в домене CH1, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 в домене CH2 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 в домене CH3; и
 - д) LC2, содержащую, в порядке от N-конца, LCVR, содержащую
 - 30 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 в константной области, при условии, что когда аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 11 присутствует в домене CH3 указанной HC1, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 12 присутствует в домене CH3 указанной HC2; или когда

аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 12 присутствует в домене CH3 указанной HC1, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 11 присутствует в домене CH3 указанной HC2.

3. Антитело по п. 2, отличающееся тем, что указанная HC1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 в домене CH3, и при этом указанная HC2 содержит HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и указанная HC2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 в домене CH3.
4. Антитело по п. 3, отличающееся тем, что указанные HC1, LC1, HC2 и LC2 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO 31 и SEQ ID NO: 34 соответственно.
5. Антитело по п. 3, отличающееся тем, что указанные HC1, LC1, HC2 и LC2 содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO 33 и SEQ ID NO: 34 соответственно.
6. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 34, при этом клетка способна экспрессировать антитело по п. 4.
7. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34, при этом клетка способна экспрессировать антитело по п. 5.
8. Способ получения антитела, включающий в себя культивирование клетки млекопитающего по п. 6 или 7 в условиях, в которых происходит экспрессия антитела, и выделение экспрессированного антитела.
9. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-5 и приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель.
10. Способ лечения рака, включающий в себя введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела по любому из пп. 1-5.
11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой Ходжкинскую или не-Ходжкинскую лимфомы, меланому, почечно-клеточный рак, рак почки, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак желудка и

- пищевода, колоректальный рак, рак печени, гепатоцеллюлярный рак, холангиокарциному, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, трижды отрицательный рак молочной железы, рак яичников, рак эндометрия, рак предстательной железы, мелкоклеточный рак легкого (МКРЛ), немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ), мезотелиому, плоскоклеточный рак головы и шеи (ПКРГШ), саркому мягких тканей или мультиформную глиобластому.
- 5
12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что рак легких представляет собой НМКРЛ, мелкоклеточный рак легкого или мезотелиому.
- 10 13. Способ по любому из пп. 10-12, дополнительно включающий в себя одновременное, раздельное или последовательное введение одного или большего количества анти-опухолевых агентов, выбранных из группы, состоящей из цисплатина, карбоплатина, дакарбазина, липосомального доксорубицина, доцетаксела, циклофосфида 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, цетуксимаба, ниволумаба, ипилимумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, тремелизумаба, урелизумаба, лирилумаба, атезолизумаба, епикедостата и дурвалумаба.
- 15
14. Антитело по любому из пп. 1-5 для применения в терапии.
15. Антитело по любому из пп. 1-5 для применения в лечении рака.
16. Антитело для применения по п. 15, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой Ходжкинскую или не-Ходжкинскую лимфому, меланому, почечно-клеточный рак, рак почки, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак желудка и пищевода, колоректальный рак, рак печени, гепатоцеллюлярный рак, холангиокарциному, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, трижды отрицательный рак молочной железы, рак яичников, рак эндометрия, рак предстательной железы, мелкоклеточный рак легкого (МКРЛ), немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ), мезотелиому, плоскоклеточный рак головы и шеи (ПКРГШ), саркому мягких тканей или мультиформную глиобластому.
- 20
- 25
- 30

17. Антитело по п. 16, отличающееся тем, что рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого или мезотелиому.
- 5 18. Антитело по любому из пп. 1-5 для применения одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с одним или большим количеством анти-опухолевых агентов, выбранных из группы, состоящей из цисплатина, карбоплатина, дакарбазина, липосомального доксорубина, доцетаксела, циклофосфида и доксорубина, навелбина, эрибулина, паклитаксела, связанных с белками частиц паклитаксела для инъекционной суспензии,
- 10 иксабепилона, капецитабина, FOLFOX (лейковорин, фторурацил и оксалиплатин), FOLFIRI (лейковорин, фторурацил и иринотекан), гемцитабина, топотекана, липосомального иринотекана, пеметрекседа, цетуксимаба, ниволумаба, ипилимумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, тремелизумаба, урелизумаба, лирилизумаба, атезолизумаба, епикедостата и
- 15 дурвалумаба, в лечение рака.
19. Фармацевтическая композиция для применения в лечении рака, содержащая эффективное количество антитела по любому из пп. 1-5.
20. Композиция для применения по п. 19, отличающаяся тем, что указанный рак представляет собой Ходжкинскую или не-Ходжкинскую лимфому, меланому, почечно-клеточный рак, рак почки, рак легкого, рак мочевого
- 20 пузыря, рак желудка и пищевода, колоректальный рак, рак печени, гепатоцеллюлярный рак, холангиокарциному, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, трижды отрицательный рак молочной железы, рак яичников, рак эндометрия, рак предстательной железы, мелкоклеточный рак
- 25 легкого (МКРЛ), немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ), мезотелиому, плоскоклеточный рак головы и шеи (ПКРГШ), саркому мягких тканей или мультиформную глиобластому.
21. Композиция по п. 20, отличающаяся тем, что рак легких представляет собой НМКРЛ, мелкоклеточный рак легкого или мезотелиому.
- 30 22. Композиция по любому из пп. 19-22, которую вводят одновременно, отдельно или последовательно в комбинации с одним или большим количеством анти-опухолевых агентов, выбранных из группы, состоящей из цисплатина, карбоплатина, дакарбазина, липосомального доксорубина, доцетаксела, циклофосфида и доксорубина, навелбина, эрибулина,

5 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, цетуксимаба, ниволумаба, ипилимумаба, пидилизумаба, пембролизумаба, тремелиумаба, урелиумаба, лирилумаба, атезолизумаба, епикедостата и дурвалумаба, в лечение рака.