

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090901 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.10(22) Дата подачи заявки
2018.10.09(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО

(31) 17195779.8; 18150465.5; 18167093.6;
18180814.8(32) 2017.10.10; 2018.01.05; 2018.04.12;
2018.06.29

(33) EP

(86) PCT/EP2018/077509

(87) WO 2019/072868 2019.04.18

(71) Заявитель:
НУМАБ ТЕРАПЕУТИКС АГ (CH)

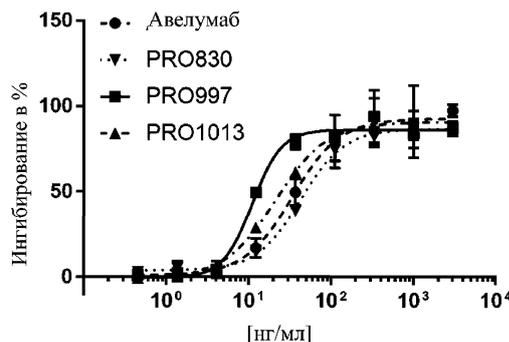
(72) Изобретатель:

Урех Давид, Гунде Теа, Майер
Себастиан, Брок Маттиас, Хесс
Кристиан (CH), Симонин Александр
(FR), Вармут Штефан (CH)

(74) Представитель:

Микуцкая Т.Ю., Файбисович А.С.
(RU)

(57) Настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, включающему в себя по меньшей мере один CD137 связывающий домен и по меньшей мере один PDL1 связывающий домен, и к фармацевтическим композициям и способам их применения. Дополнительно настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей указанное мультиспецифическое антитело, к вектору, содержащему указанную нуклеиновую кислоту, к клетке-хозяину, содержащей указанную нуклеиновую кислоту или указанный вектор, и к способу получения указанного мультиспецифического антитела.



A1

202090901

202090901

A1

Описание изобретения

МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, включающему в себя по меньшей мере один CD137 связывающий домен и по меньшей мере один PDL1 связывающий домен, и к фармацевтическим композициям и способам их применения. Дополнительно настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей указанное мультиспецифическое антитело, к вектору, содержащему указанную нуклеиновую кислоту, к клетке-хозяину, содержащей указанную нуклеиновую кислоту или указанный вектор, и к способу получения указанного мультиспецифического антитела.

Предшествующий уровень техники

Суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей (TNFRSF) представляет собой суперсемейство белков рецепторов, характеризующихся способностью связывать факторы некроза опухолей (TNF) с помощью цистеин-богатых псевдоповторов во внеклеточном домене (Locksley et al., 2001, Cell. 104: 487-501). В настоящее время идентифицировано 27 членов семейства TNF. Члены TNFRSF и их лиганды экспрессируются в основном на иммунных клетках, где они играют роль иммуномодуляторов в опосредованных Т-клетками иммунных ответах. Члены TNFRSF играют роль в повышении выживаемости дендритических клеток и способности Т-клеток к праймированию, оптимальной генерации эффекторных Т-клеток, оптимального образования антител и усиления воспалительных реакций.

CD137 (4-1BB, надсемейство 9 TNF-рецепторов, TNFRSF9) представляет собой поверхностный гликопротеин надсемейства TNFR. Он представляет собой индуцируемый ко-стимулирующий рецептор Т-клеток. Экспрессия CD137 индуцируется активацией и охватывает широкий поднабор иммунных клеток, включая активированные клетки NK и NKT, регуляторные Т-клетки, дендритные клетки (ДК), включая фолликулярные ДК, стимулированные макрофаги, дифференцирующие миелоидные клетки, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы (Wang et al., Immunol Rev. 229(1): 192-215 (2009)), и активированные В-клетки (Zhang et al, J Immunol. 184(2):787-795 (2010)). Кроме того, экспрессия CD137 была также продемонстрирована на сосудистой системе опухоли (Broil K et al., Am J Clin Pathol. 115(4):543-549 (2001); Seaman et al, Cancer Cell 11(6):539-554 (2007)) и атеросклеротическом эндотелии (Olofsson et al, Circulation 117(10): 1292-1301 (2008)).

Лиганд CD137 (CD137L, 4-1BBL или tnfsf9), молекула семейства TNF, представляет

собой межклеточный природный лиганд, известный по CD137 (Alderson, M. R., et al., *Eur. J. Immunol.* 24:2219–2227 (1994); Pollok K., et al., *Eur. J. Immunol.* 24:367-374 (1994); Goodwin, R. G., et al., *Eur. J. Immunol.* 23: 2631–2641 (1993)). Лиганд для CD137 образует гомотример, и передача сигналов через CD137 происходит от лигированных молекул на клеточной поверхности, которые сшиты тримеризованным лигандом (Won, E. Y., et al., *J. Biol. Chem.* 285: 9202–9210 (2010)). Таким образом, было высказано предположение, что для опосредования передачи сигналов необходима кластеризация CD137 более высокого порядка. CD137 связывается с адаптерами TRAF-2 и TRAF-1 в его цитоплазматическом концевом сегменте, что приводит к ко-иммунопреципитации, которая усиливается при активации CD137 в Т-клетках (Saoulli, K., et al., *J. Exp. Med.* 187: 1849–1862 (1998); Sabbagh, L., et al., *J. Immunol.* 180: 8093–8101 (2008)). Рекрутинг TRAF-1 и TRAF-2 в CD137 приводит к последующей активации NFκB и каскаду митоген-активируемой протеинкиназы (MAP), включая киназы ERK, JNK и p38 MAP. Активация NFκB приводит к повышению уровня экспрессии Bcl-1 и Bcl-XL, способствующих выживанию членов семейства Bcl-2. Количество проапоптотического белка Bim снижается зависимым от TRAF-1 и ERK образом (Sabbagh et al., *J Immunol.* 180(12):8093-8101 (2008)). Было высказано предположение, что основным действием CD137 является размещение двух или более молекул TRAF-2 в непосредственной близости друг к другу в молекуле (Sanchez-Paulete, A. R., et al., *Eur. J. Immunology* 46(3): 513-522 (2016)). На основании этого было выдвинуто предположение, что основным фактором, обеспечивающим передачу сигналов CD137, является относительная плотность фрагментов CD137, собранных на TRAF-2, в микропатчах цитоплазматической мембраны (Sanchez-Paulete, A. R., et al., *Eur. J. Immunology* 46(3): 513-522 (2016)). В целом, мультимеризация стимулирует передачу сигналов CD137, и было высказано предположение, что сшивание молекул CD137 является ключевым фактором ко-стимулирующей активности CD137.

CD137 ко-стимулирует Т-клетки выполнять эффекторные функции, такие как уничтожение развившихся опухолей, расширение первичных ответов Т-клеток CD8⁻ и увеличение пула памяти антиген-специфических Т-клеток CD8⁺, индукция синтеза интерферон-гамма (IFN-γ). Критическую роль стимуляции CD137 в функционировании и выживании Т-клеток CD8⁻ можно потенциально использовать для лечения опухолей при помощи использования функции CD137/CD137L. Фактически, исследования эффективности *in vivo* на мышах показали, что лечение антителами к CD137 приводило к обратному развитию опухоли на моделях множественных опухолей. Например, было показано, что агонистическое анти-мышинное антитело к CD137 индуцирует иммунный ответ против опухолей мастоцитомы P815 и низкоиммуногенной опухолевой модели

Ag104 (I. Melero et al., *Nat. Med.*, 3(6):682-5 (1997)). В нескольких исследованиях было указано об эффективности mAbs моноклональных антител-агонистов CD137 в профилактических и терапевтических условиях как для монотерапии, так и для комбинированной терапии, а также о противоопухолевых защитных ответах памяти Т-клеток (Lynch et al., *Immunol Rev.* 222:277-286 (2008)). Агонисты CD137 также ингибируют аутоиммунные реакции в различных моделях аутоиммунитета (Vinay et al., *J Mol Med* 84(9):726-736 (2006)).

Два антитела к CD137, которые в настоящее время используют в клинике: урелумаб (Bristol-Myers Squibb), моноклональное антитело к полностью гуманизированному IgG4, и утомилумаб (PF-05082566, Pfizer), моноклональное антитело к полностью человеческому IgG2 mAb (Chester C., et al., *Cancer Immunol Immunother* Oct;65(10):1243-8 (2016)). Хотя использование терапевтических антител – агонистов CD137 является очень многообещающей стратегией лечения, оно сопряжено с такими трудностями, как низкая эффективность антител-агонистов CD137, высокая токсичность и побочные действия.

Было показано, что использование антител-агонистов CD137 приводит к изменениям в иммунной системе и функционировании органов, что увеличивает риск токсичности. Было указано, что высокие дозы антител-агонистов к CD137 у мышей, не подвергшихся воздействию, и мышей с опухолями индуцируют инфильтрацию Т-клеток в печень и увеличение уровня аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы, что соответствует воспалению печени (Niu L., et al. *J Immunol* 178(7):4194–4213 (2007); Dubrot J., et al., *Int J Cancer* 128(1):105–118 (2011)). Первоначальные клинические исследования использования антитела-агониста к CD137 у человека в терапевтических целях также показали увеличение уровня ферментов печени и увеличение частоты гепатитов (Sznol M., et al., *J Clin Oncol* 26(11S):3007 (2008); Ascierto PA, et al., *Semin Oncol* 37(5):508–516 (2010); Chester C., et al., *Cancer Immunol Immunother* Oct;65(10):1243-8 (2016)). Потенциально смертельный гепатит наблюдался в исследовании фазы II против CD137 компании Bristol-Myers Squibb (BMS) в отношении ранее леченной меланомы III/IV стадии, Национальное клиническое исследование (NCT) 00612664. Это исследование и некоторые другие (NCT00803374, NCT00309023, NCT00461110, NCT00351325) были прекращены вследствие побочных действий (Chester C., et al., *Cancer Immunol Immunother* Oct;65(10):1243-8 (2016)). Такие побочные действия наиболее вероятны вследствие системной чрезмерной стимуляции Т-клеток.

В дополнение к вышесказанному *in vitro* было показано, что способность двухвалентных антител к CD137 индуцировать передачу сигналов в целом невелика при отсутствии экзогенной кластеризации. Для иллюстрации: антитело к CD137 – утомилумаб

способно активировать передачу сигналов CD137 только в том случае, если оно перекрестно сшито с вторичным антителом к F(ab')₂ человека или иммобилизовано на пластике для тканевых культур (Fisher et al., *Cancer Immunol Immunother* 61:1721-1733 (2012)). Исследования антител-агонистов грызунов к CD40 (TNFRSF5), еще одному члену TNFRSF, показали, что экзогенная кластеризация может быть достигнута частично посредством взаимодействия с Fcγ-рецептором (Li F, Ravetch JV, *Science* 333(6045):1030–10 (2011); White AL, et al., *J Immunol* 187(4):1754–1763 (2011)). Однако взаимодействие с Fcγ-рецептором может элиминировать экспрессирующие CD137 клетки вследствие действия эффекторных механизмов. Существующие в настоящее время двухвалентные антитела, нацеленные на CD137, имеют ограничения: а) они имеют ограниченную способность к стимуляции CD137 при отсутствии взаимодействия с Fcγ-рецептором, б) такое взаимодействие с Fcγ-рецептором может индуцировать элиминацию экспрессирующих CD137 клеток, что, по всей вероятности, влияет на активность, и в) их активность не ограничена тканями-мишенями, что, таким образом, вызывает системные побочные действия.

Для обеспечения дополнительной функции поперечной сшивки и достижения определенных уровней активации TNRSF, в частности CD137, недавно было предложено использовать мультивалентные и мультиспецифичные слитые полипептиды, которые связываются с членами PDL1 и TNRSF, или альфа-рецептором фолата (FRα) и членами TNRSF, при этом связывание с PDL1 или FRα может обеспечивать дополнительную функцию сшивания (WO 2017/123650). Eckelman et al. показали, что двухвалентная связь CD137, как и в случае INBRX-105, мультиспецифического и мультивалентного полипептида с двумя доменами связывания (связывающими доменами) PDL1, двумя доменами связывания (связывающими доменами) CD137 и областью Fc, недостаточна для эффективной кластеризации и опосредования эффективной передачи сигналов CD137 при отсутствии события экзогенной кластеризации при помощи анализа, выделяющего воздействие молекулы на линию репортерных Т-клеток. Наоборот, связь со вторым антигеном PDL1 клеточной поверхности в присутствии PDL1-положительных клеток обеспечивает дальнейшую кластеризацию CD137 и эффективную передачу сигналов (WO 2017/123650).

PDL1 (CD274, B7-H1) представляет собой трансмембранный белок типа I длиной 40 кДа. PDL1 – поверхностный гликопротеиновый лиганд для PD-1, ключевого рецептора иммунной контрольной точки, экспрессируемого активированными Т- и В-клетками, он опосредует иммуносупрессию. PDL1 участвует в подавлении ответов иммунной системы при хронических инфекциях, беременности, установке аллотрансплантатов тканей,

аутоиммунных заболеваниях и раке. PDL1 обнаруживают как в антиген-представляющих клетках, так и в клетках рака человека, такого как плоскоклеточная карцинома головы и шеи, меланома и опухоль головного мозга, рак щитовидной железы, тимуса, пищевода, легких, молочной железы, желудочно-кишечного тракта, ободочной и прямой кишки, печени, поджелудочной железы, почек, коры надпочечников, мочевого пузыря, уротелия, яичников и кожи (Katsuya Y, et al., *Lung Cancer*.88(2):154–159 (2015); Nakanishi J, et al., *Cancer Immunol Immunother*. 56(8):1173–1182 (2007); Nomi T, et al., *Clin Cancer Res*. 13(7):2151–2157 (2007); Fay AP, et al., *J Immunother Cancer*. 3:3 (2015); Strome SE, et al., *Cancer Res*. 63(19):6501–6505 (2003); Jacobs JF, et al. *Neuro Oncol*.11(4):394–402 (2009); Wilmotte R, et al. *Neuroreport*. 16(10):1081–1085 (2005)). PDL1 редко экспрессируется на нормальных тканях, но индуцибельно экспрессируется на участке опухоли (Dong H, et al., *Nat Med*. 8(8):793–800 (2002); Wang et al., *Onco Targets Ther*. 9: 5023–5039 (2016)). PDL1 подавляет активацию Т-клеток и секрецию цитокинов посредством связывания с PD-1 (Freeman et al., 2000; Latchman et al, 2001). PD-1, активированный PDL1, потенциально обеспечивает иммунно-толерантную среду для развития и роста опухоли. PDL1 также отрицательно регулирует функцию Т-клеток посредством взаимодействия с другим рецептором, B7.1 (B7-1, CD80).

Ингибирование взаимодействия PDL1/PD-1 обеспечивает высокую противоопухолевую активность. В клинические исследования включили ряд антител, которые прерывают передачу сигналов PD-1. Эти антитела относятся к следующим двум основным категориям: те, которые нацелены на PD-1 (ниволумаб, Bristol-Myers Squibb; пембролизумаб, Merck, Whitehouse Station, NJ; пидилизумаб, CureTech, Yavne, Израиль), и те, которые нацелены на PDL1 (MPDL3280A, Genentech, South San Francisco, CA; MEDI4736, MedImmune/AstraZeneca; BMS-936559, Bristol-Myers Squibb; MSB0010718C, EMD Serono, Rockland, MA) (обзор указан в Postow MA et al., *J Clin Oncol*. Jun 10;33(17):1974-82 (2015)). Нацеливание на PDL1 вместо нацеливания на PD-1 может привести к различным биологическим эффектам. Антитела к PD-1 предотвращают взаимодействие PD-1 с обоими его лигандами, PDL1 и PDL2. Антитела к PDL1 не препятствуют взаимодействию PD-1 с PDL2, хотя эффект этого взаимодействия остается неизвестным. Однако антитела к PDL1 предотвращают взаимодействие PDL1 не только с PD-1, но и с B7-1 (Butte MJ, et al., *Immunity* 27: 111-122, (2007)), который, как полагают, направляет отрицательные сигналы на Т-клетки. Блокирование PDL1 показало многообещающие ранние данные, и в настоящее время проводят испытания четырех клинических mAb к PDL1: атезолизумаба и MEDI4736 (оба являются нулевыми вариантами Fc человеческого IgG1), MSB001078C (IgG1) и BMS-936559 (IgG4) (Chester C.,

et al., *Cancer Immunol Immunother* Oct;65(10):1243-8 (2016)).

Комбинирование антител к PDL1 и к CD137 повышало общую выживаемость и усиливало эффекторную функцию Т-клеток в модели аденокарциномы яичника ID-8 (Duraishwamy J. et al., *Cancer Res* 73: 6900–6912 (2013)). Комбинирование урелумаба (к CD137) с ниволумабом (к PD-1) в солидных опухолях и В-клеточной неходжкинской лимфоме проходит испытания в рамках исследования с фазами I/II (NCT02253992), при этом PF-05082566 (к CD137) проходит испытания в рамках исследования с фазой Ib с применением пембролизумаба (к PD-1) у пациентов с солидными опухолями (NCT02179918) (Chester C., et al., *Cancer Immunol Immunother* Oct;65(10):1243-8 (2016)).

Недавно выполнили оценку *in vitro* влияния мультивалентных и мультиспецифических гибридных полипептидов, которые связываются с PDL1 и CD137, на активацию и пролиферацию Т-клеток. При помощи аутологичной системы совместного культивирования *in vitro*, выращивающей незрелые ДК и донорские Т-клетки, было показано, что INBRX-105, мультиспецифический и мультивалентный полипептид, имеющий два домена связывания PDL1, два домена связывания CD137 и область Fc, в плане стимуляции выработки интерферона-гамма превосходит моноспецифический гибридный белок PDL1 sd-Ab-Fc, гибридный белок CD137 sdAb-Fc, их комбинацию, антитело атезолизумаб к PDL1, антитело утомилумаб к CD137 (PF-05082566) или антитело пембролизумаб к PDL1 и их комбинацию при индукции INF γ или опосредовании пролиферации и активации CD8⁺ Т-клеток (WO 2017/123650). Кроме того, в WO 2016/149201 описаны некоторые антитела, действие которых направлено против PDL1, и предлагается создание конструкторов биспецифических антител, дополнительно содержащих антитело, связывающееся с Т-клетками, при этом CD137 входит в неисключительный список из более чем 20 потенциальных мишеней для Т-клеток.

Несмотря на многочисленные варианты лечения пациентов, страдающих от рака, по-прежнему необходимы эффективные и безопасные терапевтические средства, и необходимо их предпочтительное применение более нацеленным образом. Иммуномодулирующие биопрепараты предлагают перспективные подходы к лечению рака, обусловленные их механизмами действия, однако, глобальная иммуностимуляция и отсутствие какого-либо ограничения такой иммуномодуляции на клетки и сайты с соответствующей патологией вызывают многочисленные побочные эффекты и значительную токсичность, которые потенциально могут привести к увеличению осложнений и смертности пациентов. Таким образом, целью настоящего изобретения является предоставление лекарственного средства для улучшения лечения пролиферативного заболевания, в частности рака.

Сущность изобретения

Целью настоящего изобретения является предоставление лекарственного средства для улучшения лечения пролиферативного заболевания, в частности рака. Настоящее изобретение направлено на необходимость в точных терапевтических средствах для иммуноонкологии, которые нацелены только на ко-локализованные вследствие заболевания Т-клетки для апрегуляции.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему по меньшей мере один домен связывания CD137 и по меньшей мере один домен связывания PDL1. Кроме того, настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему по меньшей мере один домен связывания CD137, по меньшей мере один домен связывания PDL1 и по меньшей мере один домен связывания (связывающий домен) сывороточного альбумина человека.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предложено мультиспецифическое антитело по изобретению или фармацевтическая композиция по изобретению для применения в качестве лекарственного средства.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предложено мультиспецифическое антитело по изобретению или фармацевтическая композиция по изобретению для применения при лечении рака у пациента, нуждающегося в таком лечении.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложено мультиспецифическое антитело по изобретению или фармацевтическая композиция по изобретению для лечения рака у пациента, нуждающегося в таком лечении.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложено применение мультиспецифического антитела по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения рака у пациента, нуждающегося в таком лечении.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения рака у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению.

В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую

мультиспецифическое антитело по изобретению. В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий указанную нуклеиновую кислоту. В дополнительном аспекте в настоящем изобретении предложена клетка-хозяин, содержащая указанную нуклеиновую кислоту или указанный вектор.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ получения мультиспецифического антитела по изобретению или его связывающего домена или его фрагмента, при этом способ включает этап культивирования клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту или вектор, кодирующий мультиспецифическое антитело по изобретению или его связывающий домен, или его фрагмент.

Аспекты, полезные признаки и предпочтительные варианты настоящего изобретения, обобщенные в следующих пунктах, соответственно, по отдельности или в комбинации, дополнительно способствуют достижению цели изобретения:

1. Мультиспецифическое антитело, включающее в себя:
 - a) по меньшей мере один домен связывания CD137 (CD137-BD); и
 - b) по меньшей мере один домен связывания PDL1 (PDL1-BD).
2. Мультиспецифическое антитело по п.1, в котором указанное антитело является одновалентным, двухвалентным или мультивалентным для специфичности к CD137, предпочтительно одновалентным.
3. Мультиспецифическое антитело по п.1 или 2, в котором указанное антитело является одновалентным, двухвалентным или мультивалентным для специфичности к PDL1, предпочтительно одновалентным.
4. Мультиспецифическое антитело по п.1, в котором указанное антитело содержит один CD137-BD и один PDL1-BD.
5. Мультиспецифическое антитело по п.1, в котором указанное антитело состоит из одного CD137-BD и одного PDL1-BD.
6. Мультиспецифическое антитело по любому из пунктов 1-4, в котором указанное антитело является триспецифическим.
7. Мультиспецифическое антитело по любому из пп.1-4, в котором указанное антитело дополнительно содержит по меньшей мере один домен, связывающий человеческий сывороточный альбумин (HSA-BD), предпочтительно один домен, связывающий человеческий сывороточный альбумин.
8. Мультиспецифическое антитело по п.7, в котором указанное антитело содержит один CD137-BD, один PDL1-BD и один HSA-BD.

9. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором указанное антитело не содержит полипептид области Fc иммуноглобулина.
10. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором указанные домены связывания способны связываться с их соответствующим антигеном или рецептором одновременно.
11. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором каждый из указанных доменов связывания, например, PDL1-BD, CD137-BD или HSA-BD, независимо выбран из группы, состоящей из Fab, Fv, scFv, dsFv, scAb, STAB, однодоменного антитела (sdAb или dAb), однодоменного антитела с тяжелой цепью и однодоменного антитела с легкой цепью, VHH, VNAR, однодоменных антител на основе структуры VNAR акулы и доменов связывания, основанных на альтернативных каркасах, включая, помимо прочего, домены на основе анкирина, финомеры, авимеры, антикалины, фибронектины и сайты связывания, встроенные в константные области антител (например, технология f-star (технология модульных антител F-star™).
12. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором указанный PDL1-BD и/или указанный CD137-BD и/или указанный HSA-BD независимо выбран(ы) из Fv и scFv.
13. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором CD137-BD может агонизировать CD137 при кластеризации.
14. Мультиспецифическое антитело по п. 13, в котором указанный CD137-BD:
- связывается с человеческим CD137 с константой диссоциации (KD) менее 50 нМ, в частности менее 10 нМ, в частности менее 5 нМ, в частности менее 1 нМ, в частности менее 500 пМ, более конкретно менее 100 пМ, более конкретно менее 50 пМ, в частности при измерении с помощью SPR), в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv (одновалентную аффинность);
 - связывается с CD137 человека со скоростью K_{on} 10^{-3} c^{-1} или менее или 10^{-4} c^{-1} или менее, или 10^{-5} c^{-1} или менее при измерении с помощью SPR, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv;
 - связывается с CD137 человека со скоростью K_{on} не менее $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или более, не менее $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или более, не менее $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ или более при измерении с помощью SPR, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv;
 - необязательно не конкурирует перекрестно с урелумабом;

- e) необязательно не конкурирует перекрестно с утомилумабом; и/или
- f) является перекрестно-реактивным с CD137 яванского макака (*Macaca fascicularis* (*Cynomolgus*)); и/или
- g) в случае формата scFv имеет температуру плавления (T_m), определенную с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии, по меньшей мере 50 °C, предпочтительно, по меньшей мере 55 °C, более предпочтительно по меньшей мере 60 °C, в частности в котором указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают в фосфатно-цитратном буфере при pH 6,4, 150 mM NaCl, в частности в котором указанное антитело получают в 50 mM фосфатно-цитратном буфере с 150 mM NaCl при pH 6,4;
- h) в случае формата scFv после хранения в течение по меньшей мере двух недель, в частности в течение по меньшей мере четырех недель, при 4°C имеет потерю содержания мономера менее 7%, например, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2%, предпочтительно менее 1%, когда антитело по изобретению находится в начальной концентрации 10 мг/мл, и в частности в котором антитело по изобретению получают в 50 mM фосфатно-цитратного буфера с 150 mM NaCl при pH 6,4; и/или
- i) в случае формата scFv после хранения в течение по меньшей мере двух недель, в частности в течение по меньшей мере четырех недель, при 40°C имеет потерю содержания мономера менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2%, предпочтительно менее 1%, когда антитело по изобретению находится в начальной концентрации 10 мг/мл, и в частности в котором антитело по изобретению получают в 50 mM фосфатно-цитратного буфера с 150 mM NaCl при pH 6,4.

15. Мультиспецифическое антитело по п.13 или п.14, в котором указанный CD137-BD содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1 для HCDR1, SEQ ID NO: 2 для HCDR2, и SEQ ID NO: 3 для HCDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 18 для LCDR1, SEQ ID NO: 19 для LCDR2, и SEQ ID NO: 20 для LCDR3.

16. Мультиспецифическое антитело по п.15, в котором указанный CD137-BD содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 15, 16 и 17, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 процентов

совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28, 29 и 30.

17. Мультиспецифическое антитело по п.16, в котором указанный CD137-BD содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 14, 15, 16 и 17, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 27, 28, 29 и 30.

18. Мультиспецифическое антитело по п.16, в котором указанный CD137-BD включает в себя (а) последовательность VH SEQ ID NO: 14 и последовательность VL SEQ ID NO: 27; (b) последовательность VH SEQ ID NO: 15 и последовательность VL SEQ ID NO: 28; (c) последовательность VH SEQ ID NO: 16 и последовательность VL SEQ ID NO: 29; или (d) последовательность VH SEQ ID NO: 17 и последовательность VL SEQ ID NO: 30.

19. Мультиспецифическое антитело по п.15, в котором указанный CD137-BD содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30, в котором указанная переменная область тяжелой цепи содержит мутацию G51C (нумерация АНо) и указанная переменная область легкой цепи содержит мутацию T141C (нумерация АНо).

20. Мультиспецифическое антитело по п.13 или п.14, в котором указанный CD137-BD содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR, имеющую последовательность SEQ ID NO: 59 для HCDR1, SEQ ID NO: 60 для HCDR2, и SEQ ID NO: 61 для HCDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR, имеющий последовательность SEQ ID NO: 74 для LCDR1, SEQ ID NO: 75 для LCDR2 и SEQ ID NO: 76 для LCDR3.

21. Мультиспецифическое антитело по п.20, в котором указанный CD137-BD содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71, 72 и 73, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 процентов

совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83, 84 и 85.

22. Мультиспецифическое антитело по п.21, в котором указанный CD137-BD содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 71, 72 и 73 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 83, 84 и 85.

23. Мультиспецифическое антитело по п.21, в котором указанный CD137-BD содержит (а) последовательность VH SEQ ID NO: 71 и последовательность VL SEQ ID NO: 83; (б) последовательность VH SEQ ID NO: 72 и последовательность VL SEQ ID NO: 84 или (в) последовательность VH SEQ ID NO: 73 и последовательность VL SEQ ID NO: 85.

24. Мультиспецифическое антитело по п.21, в котором указанный CD137-BD содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 73, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 85, в котором указанная переменная область тяжелой цепи содержит мутацию G51C (нумерация AHo) и указанная переменная область легкой цепи содержит мутацию T141C (нумерация AHo).

25. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором PDL1-BD является блокатором PDL1.

26. Мультиспецифическое антитело по п.25, в котором указанный PDL1-BD:

а) связывается с человеческим PDL1 с константой диссоциации (KD) менее 50 нМ, в частности менее 10 нМ, в частности менее 5 нМ, в частности менее 1 нМ, в частности менее 500 пМ, более конкретно менее 100 пМ, предпочтительно менее 10 пМ, более предпочтительно 5 пМ, в частности при измерении с помощью SPR, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv (одновалентную аффинность);

б) связывается с человеческим PDL1 со скоростью K_{off} 10^{-3} s^{-1} или менее или 10^{-4} s^{-1} или менее, или 10^{-5} s^{-1} или менее при измерении с помощью SPR, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv;

в) связывается с человеческим PDL1 со скоростью K_{on} по меньшей мере $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или более, по меньшей мере $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или более, по меньшей мере 10^5

$M^{-1}s^{-1}$ или более, по меньшей мере $10^6 M^{-1}s^{-1}$ или более при измерении с помощью SPR, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv;

d) является перекрестно-реактивным с PDL1 яванского макака (*Macaca fascicularis* (*Synomolgus*)) и/или

e) не является перекрестно реагирующим на PDL1 *Mus musculus* (домовой мыши) и/или

f) в случае формата scFv имеет температуру плавления (T_m), определенную с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии по меньшей мере $55^\circ C$, например, по меньшей мере $60^\circ C$, предпочтительно по меньшей мере $65^\circ C$, более предпочтительно по меньшей мере $70^\circ C$, в частности в котором указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают в фосфатно-цитратном буфере при pH 6,4, 150 mM NaCl, в частности в котором указанное антитело получают в 50 mM фосфатно-цитратного буфера с 150 mM NaCl при pH 6,4;

g) в случае формата scFv после пяти последовательных циклов замораживания-размораживания имеет потерю содержания мономера менее 5%, предпочтительно менее 3%, более предпочтительно менее 1%, когда антитело по изобретению находится в начальной концентрации 10 мг/мл, и в частности в котором антитело по изобретению получают в 50 mM фосфатно-цитратного буфера с 150 mM NaCl при pH 6,4 и/или

h) в случае формата scFv после хранения в течение по меньшей мере двух недель, в частности в течение по меньшей мере четырех недель, при $4^\circ C$ имеет потерю содержания мономера менее чем 15%, например, менее 12%, менее 10%, менее 7%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2%, предпочтительно менее 1%, когда антитело по изобретению находится в начальной концентрации 10 мг/мл, и в частности в котором антитело по изобретению получают в 50 mM фосфатно-цитратного буфера с 150 mM NaCl при pH 6,4.

27. Мультиспецифическое антитело по п.25 или п.26, в котором указанный PDL1-BD включает в себя: (a) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; (b) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; (c) HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; (d) LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105; (e) LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106; и (f) LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107.

28. Мультиспецифическое антитело по п.25 или п.26, в котором указанный PDL1-BD включает в себя: (a) HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119; (b) HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120; (c) HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 121; (d) LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135; (e) LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136; и (f) LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137.

29. Мультиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов 25-28, в котором указанный PDL1-BD содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 102, 103, 104, 132, 133 и 134, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114, 115, 144 и 145.

30. Мультиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов 25-28, в котором указанный PDL1-BD содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 102, 103, 104, 132, 133 и 134, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 114, 115, 144 и 145.

31. Мультиспецифическое антитело по любому из пунктов 25-28, в котором указанный PDL1-BD содержит: (a) последовательность VH SEQ ID NO: 102 и последовательность VL SEQ ID NO: 114; (b) последовательность VH SEQ ID NO: 103 и последовательность VL SEQ ID NO: 114; (c) последовательность VH SEQ ID NO: 104 и последовательность VL SEQ ID NO: 115; или (d) последовательность VH SEQ ID NO: 132 и последовательность VL SEQ ID NO: 144; (e) последовательность VH SEQ ID NO: 133 и последовательность VL SEQ ID NO: 145 или (f) последовательность VH SEQ ID NO: 134 и последовательность VL SEQ ID NO: 144.

32. Мультиспецифическое антитело по п.27, в котором указанный PDL1-BD содержит: (a) последовательность VH SEQ ID NO: 102 и последовательность VL

SEQ ID NO: 114 или (b) последовательность VH SEQ ID NO: 104 и последовательность VL SEQ ID NO: 115.

33. Мультиспецифическое антитело по п.28, в котором указанный PDL1-BD содержит: (a) последовательность VH SEQ ID NO: 133 и последовательность VL SEQ ID NO: 145 или (b) последовательность VH SEQ ID NO: 134 и последовательность VL SEQ ID NO: 144.

34. Мультиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный CD137-BD связывается с человеческим CD137 с константой диссоциации (КД), которая по меньшей мере в 5 раз, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз, например, по меньшей мере в 50, по меньшей мере в 100, по меньшей мере в 200, по меньшей мере в 300, по меньшей мере в 400, более предпочтительно по меньшей мере в 500 раз, например, по меньшей мере в 600, по меньшей мере в 700, по меньшей мере в 800, по меньшей мере в 900, по меньшей мере в 1000 раз выше константы диссоциации (КД) связывания с человеческим PDL1 указанного PDL1-BD.

35. Мультиспецифическое антитело по п.34, в котором указанный CD137-BD связывается с CD137 человека с константой диссоциации (KD) от 10 нМ до 10 пМ, например, от 10 нМ до 0,1 нМ, предпочтительно от 5 нМ до 0,1 нМ, более предпочтительно от 5 нМ и 1 нМ.

36. Мультиспецифическое антитело по любому из пунктов 7-35, в котором указанный HSA-BD содержит: (a) переменную область тяжелой цепи CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 149 и 173; (b) переменную область тяжелой цепи CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 150 и 174; (c) переменную область тяжелой цепи CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 151 и 175; (d) переменную область легкой цепи CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 162 и 186; (e) переменную область легкой цепи CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 163 и 187; (f) переменную область легкой цепи CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 164 и 188.

37. Мультиспецифическое антитело по п.36, в котором указанный HSA-BD содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 процентов совпадает с

аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 161 и 185, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 171 и 195.

38. Мультиспецифическое антитело по п.36, в котором указанный HSA-BD содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 161 и 185, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 171 и 195.

39. Мультиспецифическое антитело по п.36, в котором указанный HSA-BD включает в себя: (a) последовательность VH SEQ ID NO: 161 и последовательность VL SEQ ID NO: 171 или (b) последовательность VH SEQ ID NO: 185 и последовательность VL SEQ ID NO: 195.

40. Мультиспецифическое антитело по п.36, в котором указанный HSA-BD включает в себя: (a) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 149, 150, и 151, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 162, 163 и 164, соответственно, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 161, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 171 или (b) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 173, 174 и 175, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 186, 187 и 188, соответственно, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 185, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 195.

41. Мультиспецифическое антитело по п.1, в котором указанное антитело имеет формат, выбранный из группы, состоящей из одноцепочечного диатела (scDb), tandemного scDb (Tandab), линейного димерного scDb (LD-scDb), кольцевого димерного scDb (CD-scDb), биспецифического рекрутера Т-клеток (BiTE;

тандемный di-scFv), тандемного tri-scFv, триотела (Fab- (scFv) 2) или битела (Fab- (scFv) 1), Fab, Fab-Fv2, IgG CL-scFv Моррисона (гибридного IgG CH3-scFv (Моррисон L) или гибридного IgG CL-scFv (Моррисон H)), триотела, scDb-scFv, биспецифичного Fab2, ди-миниантитела, тетратела, гибридного scFv-Fc-scFv, гибридного scFv-HSA-scFv, ди-диатела, DVD-Ig, COVD, IgG-scFab, scFab-dsscFv, Fv2-Fc, гибридного IgG-scFv, например, bsAb (scFv, связанного с C-концом легкой цепи), Bs1Ab (scFv, связанного с N-концом легкой цепи), Bs2Ab (scFv, связанного с N-концом тяжелой цепи), Bs3Ab (scFv, связанного с C-концом тяжелой цепи), Ts1Ab (scFv, связанного с N-концом как тяжелой цепи, так и легкой цепи), Ts2Ab (dsscFv, связанного с C-концом тяжелой цепи), биспецифичных антител на основе гетеродимерных Fc-доменов, таких как антитела типа «выступы во впадину» (KiHs); Fv, scFv, scDb, тандемных ди-scFv, тандемных три-scFv, Fab-(scFv) 2, Fab-(scFv)1, Fab, Fab-Fv2, COVD, слитых с N- и/или C- концами любой цепи гетеродимерного Fc-домена или любого другого домена гетеродимеризации, MATCH и DuoBodies.

42. Мультиспецифическое антитело по п.1, в котором указанное антитело является scDb, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 209, 210, 211, 212, 213, 214 и 215.

43. Мультиспецифическое антитело по п.1, в котором указанное антитело является scDb-scFv, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230 и 231, предпочтительно в которой указанное антитело представляет собой scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 229 или SEQ ID NO: 231, более предпочтительно в которой указанное антитело представляет собой scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 231.

44. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель.

45. Мультиспецифическое антитело по любому из пп.1-43 или фармацевтическая композиция по п.44 для применения в качестве лекарственного средства.

46. Мультиспецифическое антитело по любому из пп.1-43 или фармацевтическая композиция по п.44 для применения при лечении рака у пациента, нуждающегося в таком лечении.

47. Применение мультиспецифического антитела по любому из пп.1-43 или фармацевтической композиции по п.44 для лечения рака у пациента, нуждающегося в таком лечении.
48. Применение мультиспецифического антитела по любому из пп.1-43 или фармацевтической композиции по п.44 при изготовлении лекарственного средства для лечения рака у пациента, нуждающегося в таком лечении.
49. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в таком лечении, включающий в себя введение пациенту терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела по любому из пп.1-43 или фармацевтической композиции по п. 44.
50. Мультиспецифическое антитело по любому из п.45-46 или применение по любому из п.47-48 или способ по п.49, в котором указанным раком является PDL1-позитивный рак, предпочтительно в котором указанный рак экспрессирует высокие уровни PDL1 по сравнению со здоровой тканью.
51. Нуклеиновая кислота, кодирующая мультиспецифическое антитело по любому из пунктов 1-43 или его домен связывания, или его фрагмент.
52. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.51.
53. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.51 или вектор по п.52.
54. Способ получения мультиспецифического антитела по любому из пунктов 1-43, при этом способ включает в себя этап культивирования клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту по п.51 или вектор по п.52.
55. Комплект, содержащий мультиспецифическое антитело по любому из пунктов 1-43 или композицию по п.44.

Перечень фигур чертежей

ФИГ. 1 Перекрестное связывание ко-стимуляторных рецепторов Т-клеток, например, полноразмерным двухвалентным IgG поддерживает глобальную стимуляцию Т-клеток, что приводит к дозолимитирующей токсичности (А). Стабильные би-/триспецифические одновалентные молекулы по настоящему изобретению не могут выполнять поперечную сшивку (или, как следствие, агонизировать) ко-стимулирующих рецепторов на Т-клетках в отсутствие типа клеток, которые должны быть элиминированы (В). Стабильные би-/триспецифические одновалентные молекулы по настоящему изобретению выполняют поперечную сшивку/сшивают (или, как следствие, агонизируют) ко-стимулирующих рецепторов на Т-клетках в присутствии типа клеток, которые должны быть элиминированы (С).

ФИГ. 2 Одновременное связывание с PDL1 и CD137 запускает селективную активацию опухолево-реактивных Т-клеток и одновременно блокирует передачу сигналов PD-1.

ФИГ. 3 Влияние набора CDR и выбора каркаса на нейтрализацию взаимодействия PDL1/PD-1 в анализе репортерного гена NFAT-люциферазы. Процент % ингибирования, пропорциональный люминесцентному сигналу, полученному в анализе, представлен в зависимости от концентрации молекул в нг/мл. В качестве эталона использовали авелумаб.

ФИГ. 4 Влияние оптимизации домена на активность нейтрализации взаимодействия PDL1/PD-1 в анализе репортерного гена NFAT-люциферазы. Процент % ингибирования, пропорциональный люминесцентному сигналу, полученному в анализе, представлен в зависимости от концентрации scFvs в нг/мл. В качестве эталона использовали авелумаб.

ФИГ. 5 Активность нейтрализации взаимодействия PDL1/PD-1 в анализе репортерного гена при помощи scDb-scFvs PRO963 и PRO1057 (A), PRO1186 and PRO1430 (B), PRO1431 и PRO1432 (C), PRO1473 (D), PRO1476 (E), PRO1479 (F), PRO1482 (G), PRO1480 и PRO1481 (H) в присутствии рекомбинантного человеческого сывороточного альбумина. Процент % ингибирования, пропорциональный люминесцентному сигналу, полученному в анализе, представлен в зависимости от концентрации scFvs в нг/мл. В качестве эталона использовали авелумаб.

ФИГ. 6 Активность двухвалентной молекулы и влияние слияния LC или HC scFv в форматах Моррисона на активность нейтрализации взаимодействия PDL1/PD-1 в анализе репортерного гена NFAT-люциферазы. Процент % ингибирования, пропорциональный люминесцентному сигналу, полученному в анализе, представлен в зависимости от концентрации молекул в нг/мл. В качестве эталона использовали авелумаб.

ФИГ. 7 Иммуносорбентный ферментный анализ (ELISA) конкуренции PD-1/PDL1. Все молекулы сильно блокировали взаимодействие между PD-1 и PDL1 с аналогичными или меньшими значениями IC50, чем у эталонного авелумаба IgG.

ФИГ. 8 Иммуносорбентный ферментный анализ конкуренции B7.1/PDL1. Аналогично авелумабу все молекулы сильно блокировали взаимодействие между B7.1 и PDL1.

ФИГ. 9 В иммуносорбентном ферментном анализе конкуренции не установлено ингибирование связывания CD137 с CD137L. Поглощение, измеренное в иммуносорбентном ферментном анализе конкуренции, в котором оценивали связывание CD137L с CD137, представлено в зависимости от возрастающих концентраций PRO885 (A), PRO951 (B), PRO1359 и PRO1360 (C). В качестве эталона использовали CD137 ингибирующего антитела козы к IgG человека.

ФИГ. 10 Тепловая карта результатов эпитоп-специфической сортировки PRO885, PRO951, IgG кролика, полученных из клона 38-27-A11, и урелумаба и утомилумаба. Уровень связывания, нормализованный до теоретического R_{max} в процентах (%) молекул анализита (столбец) к иммобилизованным молекулам (строка). Отсутствие связывания (темно-серый цвет) означает тот же самый эпитоп, ярко-серый цвет означает, что вторичная молекула (аналит) может связываться и имеет эпитоп, отличный от эпитопа иммобилизованной молекулы.

ФИГ. 11 Сенсограмма эпитоп-специфической сортировки PRO885. PRO885 был иммобилизован на сенсорном чипе, и CD137 был захвачен PRO885 на первом этапе (левая сторона) с последующими введениями 4 различных антител (правая сторона). PRO951, а также конкуренты смогли связываться с захваченным CD137, при этом при введении PRO885 связывание не было выявлено.

ФИГ. 12 Сенсограмма эпитоп-специфической сортировки PRO951. PRO951 был иммобилизован на сенсорном чипе, и CD137 был захвачен PRO951 на первом этапе (левая сторона) с последующими введениями 4 различных антител (правая сторона). PRO885, а также урелумаб смогли связываться с захваченным CD137, при этом при введении утомилумаба и PRO951 дальнейшее связывание не было выявлено.

ФИГ. 13 Активация CD137 вследствие воздействия PRO885 и PRO951, оцененная в анализе репортерного гена NFkB-люциферазы. В присутствии клеток, экспрессирующих PDL1, PRO885 и PRO951, активировали передачу сигналов CD137 в клетках Юркат, при этом при тестировании клеток CHO WT активация не наблюдалась. Урелумаб активировал передачу сигналов CD137 независимо от экспрессии PDL1. Люминесценцию считывали через 6 часов после добавления репортерных клеток Юркат, и данные аппроксимировали при помощи сигмоидальной аппроксимации 4PL (GraphPad Prism).

ФИГ. 14 Активация CD137 в анализе репортерного гена NFkB-люциферазы с помощью scDb с различной аффинностью к PDL1 и CD137. В присутствии клеток CHO, экспрессирующих PDL1, все scDb активировали передачу сигналов CD137 в клетках Юркат, при этом при тестировании клеток CHO WT активация не наблюдалась. Урелумаб активировал передачу сигналов CD137 независимо от экспрессии PDL1. Люминесценцию считывали через 6 часов после добавления репортерных клеток Юркат, и данные аппроксимировали при помощи сигмоидальной аппроксимации 4PL (GraphPad Prism).

ФИГ. 15 Активация CD137 в анализе репортерного гена NFkB-люциферазы с помощью scDb с различной аффинностью к PDL1 и CD137. В присутствии клеток HCC827, экспрессирующих PDL1, все scDb активировали передачу сигналов CD137 в клетках Юркат. В качестве эталонной молекулы для оценки относительной активации передачи

сигналов CD137 использовали урелумаб. Активность немного увеличилась с увеличением аффинности к CD137 и PDL1. Уменьшение сигнала при высоких концентрациях (кривая нормального распределения) было более явным при увеличении аффинности к CD137, при этом увеличение аффинности к PDL1 не способствовало этому эффекту. Люминесценцию считывали через 6 часов после добавления репортерных клеток Юркат, и данные аппроксимировали при помощи сигмоидальной аппроксимации 4PL (GraphPad Prism).

ФИГ. 16 Активация CD137 в анализе репортерного гена NFκB-люциферазы с помощью scDb с различной аффинностью к PDL1 и CD137. В присутствии клеток HCC827, экспрессирующих PDL1, стимулированных IFNγ в течение 24 ч при 10 нг/мл, scDb с привитым STR активировали передачу сигналов CD137 в клетках Юркат. В качестве эталонной молекулы для оценки относительной активации передачи сигналов CD137 использовали урелумаб. Активность немного увеличилась с увеличением аффинности к CD137 и PDL1. Уменьшение сигнала при высоких концентрациях (кривая нормального распределения) было более явным при увеличении аффинности к CD137, при этом увеличение аффинности к PDL1 не способствовало этому эффекту. Люминесценцию считывали через 6 часов после добавления репортерных клеток Юркат, и данные аппроксимировали при помощи сигмоидальной аппроксимации 4PL (GraphPad Prism).

ФИГ. 17 Активация CD137 молекулами с пролонгированным (длительным) временем полужизни в сыворотке крови в анализе репортерного гена NFκB-люциферазы через 6 часов. В присутствии клеток CHO, экспрессирующих PDL1, молекулы с длительным периодом полужизни активировали передачу сигналов CD137 в клетках Юркат, при этом при тестировании клеток CHO WT активация не наблюдалась. Урелумаб активировал передачу сигналов CD137 независимо от экспрессии PDL1. Интересно, что несмотря на аналогичную аффинность к обоим мишеням, PRO1057 показал значительно более высокий максимальный сигнал, чем PRO1058. Кроме того, одновалентный PRO1057 scDb-scFv показал более сильную активацию, чем соответствующий двухвалентный PRO1060 в формате Моррисона. Люминесценцию считывали через 6 часов после добавления репортерных клеток Юркат, и данные аппроксимировали при помощи сигмоидальной аппроксимации 4PL (GraphPad Prism).

ФИГ. 18 Активация CD137 молекулами с пролонгированным (длительным) временем полужизни в сыворотке крови в анализе репортерного гена NFκB-люциферазы через 24 часа. В присутствии клеток CHO, экспрессирующих PDL1, молекулы с длительным периодом полужизни активировали передачу сигналов CD137 в клетках Юркат, при этом при тестировании клеток CHO WT активация не наблюдалась. Урелумаб активировал

передачу сигналов CD137 независимо от экспрессии PDL1. Что интересно, несмотря на аналогичную аффинность к обеим мишеням, PRO1057 показал гораздо более высокий максимальный сигнал, чем PRO1058, который через 24 часа превысил даже активность scDb Pro885. Кроме того, одновалентный PRO1057 scDb-scFv показал гораздо более сильную активацию, чем соответствующий двухвалентный PRO1060 в формате Моррисона. Люминесценцию считывали через 24 часа после добавления репортерных клеток Юркат, и данные аппроксимировали при помощи сигмоидальной аппроксимации 4PL (GraphPad Prism).

ФИГ. 19 (А) Активация CD137 молекулами с пролонгированным (длительным) временем полужизни через 24 часа. В присутствии клеток HCC827, не стимулированных или стимулированных IFN γ в течение 24 ч при 10 нг/мл, молекулы с длительным временем полужизни активировали передачу сигналов CD137 в клетках Юркат. В качестве эталонной молекулы для оценки относительной активации передачи сигналов CD137 использовали урелумаб. Одновалентный PRO1057 scDb-scFv показал более сильную максимальную активацию, чем соответствующий двухвалентный PRO1060 в формате Моррисона. Люминесценцию считывали через 24 часов после добавления репортерных клеток Юркат, и данные аппроксимировали при помощи сигмоидальной аппроксимации 4PL (GraphPad Prism). **(В)** Триспецифические молекулы scDb-scFv PRO1430, PRO1431, PRO1432, PRO1473, PRO1476, PRO1479, PRO1480, PRO1481 и PRO1482 протестировали в анализе активности CD137 в присутствии IFN γ (10 нг/мл), стимулированного под воздействием HCC827 в течение 6 часов и 24 часов. В этом эксперименте в качестве эталонной молекулы для оценки относительной активации передачи сигналов CD137 использовали PRO885. Также на каждый планшет брали триспецифическую молекулу scDb-scFv PRO1186 для сравнения ее активности с другими молекулами scDb-scFv. Люминесценцию считывали через 6 часов или 24 часа после добавления репортерных клеток Юркат, и концентрации испытываемых молекул с увеличением значений относительных световых единиц аппроксимировали только при помощи сигмоидальной аппроксимации 4PL (GraphPad Prism).

ФИГ. 20 Активация Т-клеток *ex vivo*. Показано ко-стимуляторное взаимодействие PDL1 и CD137 с помощью PRO885, которое приводит к выработке IL-2, явно превышающей фоновые уровни IL-2. Клетки CHO-A2 являются трансгенными клетками CHO, экспрессирующими PDL1.

ФИГ. 21 Анализ активации Т-клеток *ex vivo*. PBMC стимулировали 10 нг/мл SEA и обрабатывали серийными разведениями эталонной молекулы авелумаб, коктейлем эталонных молекул авелумаб и урелумаб или PRO997 scFv, PRO885 scDb или scDb-

PRO1430, PRO1479 и PRO1480 scFvs в течение 96 часов. Активацию Т-клеток оценивали путем количественного определения IL-2 в собранных надосадочных жидкостях с помощью иммуносорбентного ферментного анализа. Обработка с PRO885, PRO997, PRO1430, PRO1479 и PRO1480 привела к выраженной секреции

IL-2. PRO997 показал более высокую активность, чем авелумаб. PRO885 показал значительное увеличение объема эффекта по сравнению с авелумабом. Обработка с scDb-scFvs приводила к выраженной секреции IL-2 по сравнению с коктейлем эталонных молекул. PRO1480 показал значительное увеличение объема эффекта по сравнению с другими scDb-scFv. Данные аппроксимировали при помощи сигмоидальной аппроксимации 4PL (GraphPad Prism).

ФИГ. 22 Схематическое представление типичных форматов мультиспецифических антител по изобретению: одноцепочечные диатела (scDb) (A), scDb-scFvs (B), молекулы IgG-scFv (C и D).

ФИГ. 23 Анализ активации Т-клеток *ex vivo*. (A)-(D) PMBC стимулировали 10 нг/мл SEA (стафилококковым энтеротоксином А) и обрабатывали серийными разведениями авелумаба, урелумаба, комбинацией авелумаба и урелумаба, PRO885 scDb и PRO1175 или PRO1186 scDb-scFv в течение 96 часов. Активацию Т-клеток оценивали путем количественного определения IL-2 в собранных надосадочных жидкостях с помощью иммуносорбентного ферментного анализа. PRO1175 и PRO1186 показали превосходную активность в плане стимуляции выработки IL-2 в PMBC (моноклеарных клетках периферической крови) по сравнению с комбинацией авелумаба и урелумаба. Данные аппроксимировали при помощи сигмоидальной аппроксимации 4PL (GraphPad Prism). (E)-(I) PMBC, стимулированные 10 нг/мл SEA, обрабатывали серийными разведениями молекул scDb-scFv PRO1430, PRO1431, PRO1476, PRO1479, PRO1482 в течение 96 часов. В качестве эталонной молекулы для оценки относительной выработки IL-2 в PMBC на каждой планшете использовали триспецифическую молекулу scDb-scFv PRO1186. PRO1430, PRO1479 и PRO1482 показали превосходную активность в плане стимуляции выработки IL-2 в PMBC моноклеарных клетках периферической крови по сравнению с другими молекулами scDb-scFv. Концентрации испытываемых молекул с увеличением только значений IL-2 аппроксимировали при помощи сигмоидальной аппроксимации 4PL (GraphPad Prism). (J)-(K) Моноклеарные клетки периферической крови PMBC от здоровых доноров инкубировали в течение 3 дней в присутствии антитела к CD3. К культуре добавляли человеческие клетки CHO, экспрессирующие PDL1, и серийные разведения авелумаба, урелумаба, комбинации авелумаба/урелумаба или PRO1186 к PDL1xCD137 (scDb-scFv2). Секрецию IFN γ оценивали с помощью иммуносорбентного

ферментного анализа. PRO1186 был более активен в плане стимулирования выработки IL-2 (J) и IFN γ (K), чем авелумаб или урелумаб или их комбинация. В отсутствие антител к CD3 уровни IL-2 и IFN γ были сопоставимы с секрецией базальных цитокинов при всех испытанных концентрациях, что свидетельствует о необходимости передачи сигналов TCR или вовлечения CD3 для эффективной передачи сигналов CD137. (L) Стимуляция T-клеток *ex vivo* в анализе мононуклеарных клеток периферической крови SEA молекулой scDb-scFv PRO1186 и комбинациями антител к CD137 человека и антител к PDL1 человека. Измеренные RLU, нормализованные по урелумабу, представлены в зависимости от концентрации молекул в нг/мл. (M) Максимальная секреция IL-2 T-клеток *ex vivo* в анализе мононуклеарных клеток периферической крови SEA молекулой scDb-scFv PRO1186 и комбинациями антител к CD137 человека и антител к PDL1 человека. Рассчитали и сравнили средние уровни IL-2 при высоких концентрациях испытанных молекул (8000, 1600, 320 нг/мл). PRO1186 показал статистически значимые более высокие уровни IL-2, чем комбинации IgG ($p < 0,0001$). Статистический анализ с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и критерия множественных сравнений Тьюки.

ФИГ. 24 Противоопухолевая активность мультиспецифических антител PRO1057 (scDb-scFv к PDL1xCD137xHSA) и PRO1060 (антитела к PDL1xCD137 формата Моррисона) по сравнению с терапией при помощи антител к PDL1 (PRO1037) и к CD137 (PRO1038 или урелумаб) в ксенотрансплантатах HCC827 NSCLC человека с использованием иммунодефицитных мышей линии NOG и аллогенных мононуклеарных клеток периферической крови человека (hPBMC). Мыши получали терапию мультиспецифическими антителами (PRO1057 и PRO1060), антителами к PDL1 (PRO1037), антителами к CD137 (PRO1038 или урелумаб) или плацебо интраперитонеально в дни 0, 3, 7 и 10. Относительная активность по сравнению с дозой авелумаба 0,1 мг указана в скобках в относительных единицах (r.U). Объемы опухолей измеряли два раза в неделю до тех пор, пока мышей не умертвили в день 17 и 18. Объемы опухолей нормализовали по объему опухоли в начале лечения (относительный объем опухоли). (A) Средние относительные объемы опухолей ($n = 8$ мышей на группу) мышей повторно растворили с мононуклеарными клетками периферической крови от двух доноров. Пунктирная линия указывает время терапии. (B) Средние относительные объемы опухолей мышей повторно растворили с мононуклеарными клетками периферической крови от донора B ($n = 4$ мыши на группу). (C) Отдельные относительные объемы опухолей мышей повторно растворили с мононуклеарными клетками периферической крови от двух доноров. Каждый символ представляет отдельное животное в одной группе

терапии. **(D)** Отдельные относительные объемы опухолей мышей повторно растворили с моноклеарными клетками периферической крови от донора В. Каждый символ представляет отдельное животное в одной группе терапии.

ФИГ. 25 Ксенотрансплантат HCC827 у мышей NOG, замещенных hPBMC. Масса тела мышей NOG, экспериментально зараженных NOG827, при лечении мультиспецифическими антителами PRO1057 (scDb-scFv к PDL1xCD137xHSA) и PRO1060 (к PDL1xCD137 формата Моррисона) по сравнению с терапией антителами к PDL1 (PRO1137) и к CD137 (PRO1138 или урелумаб). Массу тела измеряли два раза в неделю до тех пор, пока мышей не умертвили в день 17 и 18.

ФИГ. 26 Ксенотрансплантат HCC827 у мышей NOG, замещенных hPBMC. Методом проточной цитометрии исследовали инфильтрирующие опухоль лимфоциты мышей NOG, экспериментально зараженных NOG827, при лечении мультиспецифическими антителами PRO1057 (scDb-scFv к PDL1xCD137xHSA) и PRO1060 (антитела к PDL1xCD137 формата Моррисона) и к PDL1 (PRO1137) или антителами к CD137 (PRO1138 или урелумаб). **(A)** Частота регуляторных Т-клеток человека (CD4+, FoxP3+) показана в процентах от количества клеток CD45+. **(B)**. Показано отношение частоты человеческих Т-клеток CD8+ и частоты человеческих регуляторных Т-клеток (Treg) в микроокружении опухоли (TME). Каждый символ представляет отдельное животное в одной группе терапии.

ФИГ. 27 Ксенотрансплантат HCC827 у мышей NOG, замещенных hPBMC. Методом проточной цитометрии исследовали инфильтрирующие опухоль лимфоциты мышей NOG, экспериментально зараженных NOG827, при лечении мультиспецифическими антителами PRO1057 (scDb-scFv к PDL1xCD137xHSA) и PRO1060 (антитела к PDL1xCD137 формата Моррисона) и к PDL1 (PRO1137) или антителами к CD137 (PRO1138 или урелумаб). **(A)** Частота регуляторных Т-клеток человека (CD4+, PD-1+) показана в процентах от количества клеток CD45+. **(B)**. Частота активированных Т-клеток CD8+ человека (CD8+, PD-1+) показана в процентах от количества клеток CD45+. Каждый символ представляет отдельное животное в одной группе терапии.

ФИГ. 28 Оценка противоопухолевой эффективности блокады PDL1 и одновременной локализованной стимуляции CD137 у мышей NOG, которым имплантировали гематопозитические стволовые клетки CD34+, полученные из пуповинной крови человека (HSC UCB). Противоопухолевую активность мультиспецифического антитела PRO1186 (scDb-scFv к PDL1xCD137xHSA) сравнили с терапией при помощи IgG1 к PDL1 (PRO1196 или авелумаб) и терапией при помощи IgG4 к CD137 (урелумаб) или комбинацией IgG1 к PDL1 (PRO1196) с IgG4 против CD137 (PRO1138). Мышей лечили паливизумабом (0,1 мг), IgG1 к PDL1 (0,1 мг PRO1196 или 0,1 мг авелумаба), IgG4 к

CD137 (0,1 мг урелумаба), PRO1186 с 3 различными уровнями дозы (0,02 мг, 0,1 мг и 0,5 мг) или комбинацией IgG1 к PDL1 (PRO1196) и IgG4 к CD137 (PRO1138) (0,1 мг каждый) в день 0, 5, 10, 15 и 20 (пунктирные вертикальные линии). Рост опухоли и массу тела регистрировали два раза в неделю.

ФИГ. 29 Оценка противоопухолевой эффективности блокады PDL1 и одновременной локализованной стимуляции CD137 у мышей NOG, которым имплантировали гематопозитические стволовые клетки CD34+, полученные из пуповинной крови человека (HSC UCB). Противоопухолевую активность мультиспецифического антитела PRO1186 (scDb-scFv к PDL1xCD137xHSA, все уровни дозы вместе) сравнили с лечением при помощи IgG1 к PDL1 (PRO1196 и авелумаб вместе) и терапией при помощи IgG4 к CD137 (урелумаб) или комбинацией IgG1 к PDL1 (PRO1196) с IgG4 к CD137 (PRO1138). Все статистические данные рассчитывали при помощи GraphPad Prism, версия 6. Статистическую значимость определяли при помощи однофакторного дисперсионного анализа с применением поправки Бонферрони. Графики показывают среднее значение с ДИ (доверительным интервалом) 95%. Рост опухоли и массу тела регистрировали два раза в неделю.

ФИГ. 30 Оценка противоопухолевой эффективности у мышей NOG, которым имплантировали гематопозитические стволовые клетки CD34+, полученные из пуповинной крови человека (HSC UCB). Масса тела и относительный объем опухоли после лечения мультиспецифическим антителом PRO1186 (scDb-scFv к PDL1xCD137xHSA) сравнили с лечением при помощи IgG1 к PDL1 (PRO1196 или авелумаб) и терапией при помощи IgG4 к CD137 (урелумаб) или комбинацией IgG1 к PDL1 (PRO1196) с IgG4 к CD137 (PRO1138).

ФИГ. 31 Инфильтрирующие опухоль лимфоциты мышей NOG, экспериментально зараженных HCC827, которым имплантировали гематопозитические стволовые клетки CD34+, полученные из пуповинной крови человека (UCB HSC), анализировали после лечения мультиспецифическим антителом PRO1186 (scDb-scFv к PDL1xCD137xHSA) или IgG1 к PDL1 (PRO1196 или авелумаб) или IgG4 к CD137 (урелумаб) по отдельности или комбинацией IgG1 к PDL1 (PRO1196) с IgG4 к CD137 (PRO1138). Терапия антителами к PDL1xCD137 привела к увеличению частоты цитотоксических Т-клеток (CD8+, GrB+) и увеличению соотношения CD8+/CD4+ и CD8+, GrB+/Treg в опухоли.

ФИГ. 32 Проанализировали инфильтрирующие опухоль лимфоциты мышей NOG, экспериментально зараженных HCC827, которым имплантировали гематопозитические стволовые клетки CD34+, полученные из пуповинной крови человека (HSC UCB) и получивших терапию мультиспецифическим антителом PRO1186 (scDb-scFv к PDL1xCD137xHSA). Лечение мультиспецифическим антителом PRO1186 (scDb-scFv к

PDL1xCD137xHSA, все уровни дозы вместе) сравнили с лечением при помощи IgG1 к PDL1 (PRO1196 и авелумаб вместе, IgG4 к CD137 отдельно (урелумаб)) или комбинацией IgG1 к PDL1 (PRO1196) с IgG4 к CD137 (PRO1138). Все статистические данные рассчитывали при помощи GraphPad Prism, версия 6. Статистическую значимость определяли при помощи однофакторного дисперсионного анализа с применением поправки Бонферрони. Графики показывают среднее значение с ДИ (доверительным интервалом) 95%. Терапия антителами к PDL1xCD137 привела к увеличению частоты цитотоксических Т-клеток (CD8+) в опухоли.

ФИГ. 33 Фармакокинетический анализ для количественного определения мультиспецифического антитела PRO1186 (scDb-scFv к PDL1xCD137xHSA) в образцах сыворотки животных в исследовании ксенотрансплантата HCC827 с использованием мышей NOG с замещением стволовыми клетками CD34+ человека. Концентрации PRO1186 (scDb-scFv к PDL1xCD137xHSA) в разведенных образцах сыворотки интерполировали по калибровочной кривой. Фармакокинетические параметры оценивали с помощью программы-надстройки PK solver с использованием некомпартментального подхода.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Хотя использование терапевтических антител – агонистов CD137 является очень многообещающей стратегией лечения, оно сопряжено с такими трудностями, как низкая эффективность антител-агонистов CD137, их высокая токсичность и побочные действия. Перекрестное связывание ко-стимуляторных рецепторов Т-клеток, например, полноразмерным двухвалентным IgG, как в случае урелумаба, поддерживает глобальную стимуляцию Т-клеток, что приводит к дозолимитирующей токсичности (Фиг. 1А). Таким образом, в области медицины существует потребность в новых агонистических антителах к CD137, которые способны активно стимулировать передачу сигналов CD137 без системной чрезмерной стимуляции Т-клеток и которые, таким образом, имеют более низкую степень дозолимитирующей токсичности и побочных действий, чем существующие в настоящее время антитела.

В настоящем изобретении предложено мультиспецифическое антитело, включающее в себя: (а) по меньшей мере один домен связывания CD137 (CD137-BD) и (b) по меньшей мере один домен связывания PDL1 (PDL1-BD). Мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению способно целенаправленно агонизировать передачу сигналов CD137, например, в исследуемом сайте, а именно, в PDL1-положительном микроокружении опухоли. Мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению способно опосредовать, например, агонизировать, активную передачу сигналов CD137 без

какой-либо необходимости поперечной сшивки вторичным антителом к F(ab')₂ человека или иммобилизации на пластике для тканевой культуры, как в случае PF-05082566 (Fisher et al., *Cancer Immunol Immunother* 61: 1721-1733 (2012)), или взаимодействия с Fcγ-рецептором. Таким образом, мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению вследствие своей способности опосредовать, например, агонизировать, активную передачу сигналов CD137 без взаимодействия с Fcγ-рецептором, не приводит к элиминации клеток, экспрессирующих CD137. Кроме того, неожиданно было обнаружено, что мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению, даже когда оно одновалентно по отношению к CD137, в частности когда содержит новый домен связывания CD137 по настоящему изобретению, может кластеризовать и агонизировать CD137, однако, исключительно в присутствии PDL1-положительных клеток, что позволяет избежать системной активации CD137. Одновалентное связывание CD137 и не содержащая Fc структура мультиспецифического антитела обеспечивает возможность возникновения агонизма CD137 на эффекторных клетках только тогда, когда антитело одновременно связывается с PDL1 на поверхности клеток-мишеней.

Кроме того, неожиданно было обнаружено, что мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению, содержащее (a) по меньшей мере один домен связывания CD137 (CD137-BD), (b) по меньшей мере один домен связывания PDL1 (PDL1-BD) и (c) по меньшей мере один домен связывания человеческого сывороточного альбумина (HSA-BD), показало дополнительные полезные свойства, такие как (i) усиление кластеризации CD137 по сравнению с несшитыми двухвалентными антителами, (ii) увеличение периода полужизни антител при сохранении способности блокировать PDL1 и агонизировать CD137 и (iii) эффективная кинетика (например, более высокие уровни активации CD137). Кроме того, добавление увеличивающего период полужизни анти-HSA домена не только обеспечивает удобное дозирование, но также должно способствовать доставке молекулы в микроокружение опухоли.

Таким образом, мультиспецифические антитела по настоящему изобретению обеспечивают явные терапевтические преимущества по сравнению с обычными композициями и терапиями.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем патенте, имеют значение, обычно понимаемое специалистом с обычной квалификацией в данной области технологии, к которой относится данное изобретение.

Термины «содержащий» и «включающий в себя» используются в настоящем документе в их неограниченном смысле, если не указано иное. Таким образом, в таких

последних вариантах термин «содержащий» включает в себя более узкий термин «состоящий из».

Определенный и неопределенный артикли и аналогичные указания в контексте описания изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) следует истолковывать как включающие в себя как единственное, так и множественное число, если здесь не указано иное или явно противоречит контексту. Например, термин «клетка» включает в себя множество клеток, включая их смеси. Если форма множественного числа используется для соединений, солей и тому подобного, это также означает одно соединение, соль или тому подобное.

В первом аспекте настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, включающему в себя: (а) по меньшей мере один домен связывания CD137 (CD137-BD) и (b) по меньшей мере один домен связывания PDL1 (PDL1-BD).

Используемый в настоящем описании термин «антитело» и тому подобное включает в себя целые антитела или их отдельные цепи и любой антигенсвязывающий фрагмент (т.е., «антигенсвязывающая часть») или его отдельные цепи, и молекулы, содержащие CDR антител, области VH или области VL (включая, помимо прочего, мультиспецифические антитела). Природное «полное антитело» представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем описании как VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем описании как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена: CL. Области VH и VL можно далее подразделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

При использовании в настоящем описании термины «домен связывания», «его антигенсвязывающий фрагмент», «антигенсвязывающая часть» антитела и тому подобное относятся к одному или нескольким фрагментам интактного антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с данным антигеном (например, CD137, PDL1, HSA). Выполнение антигенсвязывающих функций антитела могут осуществлять фрагменты интактного антитела. В некоторых вариантах домен связывания мультиспецифического антитела по настоящему изобретению выбирают из группы, состоящей из фрагмента Fab – одновалентного фрагмента, состоящего из доменов VL, VH, CL и CH1; фрагмента F (ab)₂ – двухвалентного фрагмента, содержащего два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; фрагмента Fd, состоящего из доменов VH и CH1; фрагмента Fv, состоящего из доменов VL и VH одного плеча антитела; фрагмента однодоменного антитела (dAb) (Ward et al., 1989 Nature 341: 544-546), который состоит из домена VH; выделенной определяющей комплементарности области (CDR), dsFv, scAb, STAB, однодоменного антитела (sdAb или dAb), однодоменного антитела с тяжелой цепью и однодоменного антитела с легкой цепью, VHH, VNAR, однодоменных антител на основе структуры VNAR акулы и доменов связывания на основе альтернативных каркасов, включая, помимо прочего, домены на основе анкирина, финомеры, авимеры, антикалины, фибронектины и сайты связывания, встроенные в константные области антител (например, при помощи технологии f-star (технология модульных антител F-star^{IM})). В соответствии с целью изобретения домен связывания по настоящему изобретению представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv) или переменные домены одного антитела. В предпочтительном варианте домен связывания по настоящему изобретению представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv).

«Определяющие комплементарность области» («CDR») представляют собой аминокислотные последовательности с границами, определенными при помощи любой из ряда хорошо известных схем, в том числе описанных у Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD ("Kabat" numbering scheme), Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 ("Chothia" numbering scheme), ImMunoGenTics (IMGT) numbering (Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003) ("IMGT" numbering scheme) и схемы нумерации, описанной у Honegger & Plückthun, J. Mol. Biol. 309 (2001) 657-670 (нумерация "АНО"). Например, для классических форматов, согласно Kabat, аминокислотные остатки CDR в переменном домене тяжелой цепи (VH) пронумерованы 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные

остатки CDR в переменном домене легкой цепи (VL) пронумерованы 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). Согласно Chothia аминокислотные остатки CDR в VH пронумерованы 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки CDR в VL пронумерованы 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). Если скомбинировать определения CDR от Kabat и Chothia, то CDR состоят из аминокислотных остатков 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в человеческом VH и аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в человеческом VL. Согласно IMGT аминокислотные остатки CDR в VH пронумерованы приблизительно так: 26-35 (HCDR1), 51-57 (HCDR2) и 93-102 (HCDR3), аминокислотные остатки CDR в VL пронумерованы приблизительно так: 27-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) (нумерация по «Кабату»). Согласно IMGT CDR антитела можно определить с помощью программы IMGT/DomainGap Align.

В контексте настоящего изобретения используют систему нумерации, предложенную Honegger & Plückthun («АНО») (Honegger & Plückthun, *J. Mol. Biol.* 309 (2001) 657-670), если прямо не указано иное. Кроме того, как CDR определены следующие остатки согласно схеме нумерации АНО: LCDR1 (также именуемый CDR-L1): L24-L42; LCDR2 (также именуемый CDR-L2): L58-L72; LCDR3 (также именуемый CDR-L3): L107-L138; HCDR1 (также именуемый CDR-H1): H27-H42; HCDR2 (также именуемый CDR-H2): H57-H76; HCDR3 (также именуемый CDR-H3): H108-H138. Для ясности в системе нумерации по Honegger & Plückthun учитываются различные длины, которые наблюдаются в природных антителах, как в разных подсемействах VH и VL, так и, в частности, в CDR, вследствие чего возникают пропуски в последовательностях. Следовательно, в данном переменном домене антитела обычно не все положения с 1 по 149 будут заняты аминокислотным остатком.

При использовании в настоящем описании термин «специфичность связывания» относится к способности отдельного антитела реагировать с одной антигенной детерминантой, а не с другой антигенной детерминантой. При использовании в настоящем описании термин «специфически связывается» или «специфичен для» относится к измеримым и воспроизводимым взаимодействиям, таким как связывание между мишенью и антителом, что является определяющим для присутствия мишени в присутствии гетерогенной популяции молекул, включая биологические молекулы. Например, антитело, которое специфически связывается с мишенью (которой может быть эпитоп), представляет собой антитело, которое связывается с этой мишенью с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими мишенями. В своей наиболее общей форме (и без упоминания

ссылки, определение которой указано) «специфическое связывание» относится к способности антитела различать целевую мишень и не имеющую к ней отношения молекулу, в соответствии с определением, например, в соответствии с методами анализа специфичности, известными из уровня техники. Такие способы включают в себя, помимо прочего, вестерн-блоттинг, иммуносорбентный ферментный анализ ELISA, радиоиммунный анализ RIA, ECL, количественный радиоиммуноанализ IRMA, SPR (поверхностный плазмонный резонанс) и сканирование пептидов. Например, может быть проведен стандартный иммуносорбентный ферментный анализ. Оценка может быть выполнена путем стандартного проявления цвета (например, вторичного антитела при помощи пероксида хрена и тетраметилбензидина с пероксидом водорода). Реакцию в некоторых лунках оценивают по оптической плотности, например, при 450 нм. Типичный фон (= отрицательная реакция) может составлять около 0,1 оптической плотности, типичная положительная реакция может составлять около 1 оптической плотности OD. Это означает, что соотношение между положительным и отрицательным баллом может составлять 10 раз или больше. В дополнительном примере может быть проведен анализ путем поверхностного плазмонного резонанса (SPR), в котором разница между фоном и сигналом по меньшей мере в 10 раз, предпочтительно по меньшей мере в 100 раз указывает на специфическое связывание. Как правило, определение специфичности связывания выполняют при помощи не одной эталонной молекулы, а набора из приблизительно трех-пяти не имеющих отношения к мишени молекул, таких как сухое молоко, трансферрин или тому подобное.

В соответствии с целью изобретения антитело по изобретению представляет собой изолированное (выделенное) антитело. При использовании в настоящем описании термин «изолированное антитело» относится к антителу, которое, по существу, не содержит других антител, обладающих различной антигенной специфичностью (например, изолированное антитело, которое специфически связывается с CD137 и PDL1, по существу, не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от CD137 и PDL1, например, изолированное антитело, которое специфически связывается с CD137, PDL1 и человеческим сывороточным альбумином, по существу, не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от CD137, PDL1 и человеческого сывороточного альбумина). Кроме того, изолированное антитело может практически не содержать других клеточных материалов и/или химических соединений.

В соответствии с целью изобретения антитело по изобретению представляет собой моноклональное антитело. При использовании в настоящем описании термин

«моноклональное антитело» или «композиция моноклонального антитела» относится к антителам, которые, по существу, идентичны аминокислотной последовательности или получены из одного и того же генетического источника. Композиция моноклонального антитела показывает специфичность и аффинность связывания с определенным эпитопом или специфичность и аффинность связывания с конкретными эпитопами.

Антитела по изобретению включают, помимо прочего, химерные, человеческие и гуманизированные антитела.

Термин «химерное антитело» (или его антигенсвязывающий фрагмент) представляет собой молекулу антитела (или его антигенсвязывающий фрагмент), в которой (а) константная область или ее часть изменена, заменена или обменена таким образом, что сайт связывания антигена (вариабельная область) связан с константной областью другого или измененного класса, эффекторной функции и/или вида или с совершенно другой молекулой, которая придает новые свойства химерным антителам, например, ферментом, токсином, гормоном, фактором роста, лекарством и т.д., или (b) вариабельная область или ее часть изменена, обменена или заменена вариабельной областью, имеющей другую или измененную антигенную специфичность. Например, антитело мыши может быть модифицировано путем замены его константной области константной областью из человеческого иммуноглобулина. Вследствие замены на константную область человека химерное антитело может сохранять свою специфичность в распознавании антигена, при этом обладая пониженной антигенностью для человека по сравнению с исходным антителом мыши.

При использовании в настоящем описании термин «антитело человека» (или его антигенсвязывающий фрагмент), как предполагается, включает в себя антитела (и их антигенсвязывающие фрагменты), имеющие вариабельные области, в которых как каркасные области, так и области CDR получены из последовательностей человеческого происхождения. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также получена из таких последовательностей человека, например, последовательностей зародышевой линии человека или мутированных версий последовательностей зародышевой линии человека. Антитела человека и их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человека (например, мутации, введенные случайным образом или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Это определение антитела человека прямо не включает в себя гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки, не относящиеся к человеку. Антитела человека могут быть получены при помощи различных методов,

известных из уровня техники, включая фаг-дисплейные библиотеки (Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Также для получения человеческих моноклональных антител могут быть использованы способы, описанные у Cole et al, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss, p. 77 (1985); Voemer et al, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). См. также van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Антитела человека могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для выработки таких антител в ответ на антигенное заражение, но чьи эндогенные локусы были отключены, например, иммунизированным ксеномышам (см., например, US6,075,181 и US6,150,584, касающиеся технологии XENOMOUSE™). Также см., например, Li et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103:3557- 3562 (2006), касающиеся антител человека, генерируемых с помощью технологии гибридомы В-клеток человека.

При использовании в настоящем описании термин «гуманизированное» антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент) означает антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент), которое сохраняет реактивность антитела, не относящегося к человеку, но которое при этом менее иммуногенно для человека. Это может быть обеспечено, например, путем сохранения областей CDR, не относящихся к человеку, и замены оставшихся частей антитела их аналогами человека (т.е., константной областью, а также каркасными частями вариабельной области). Дополнительные модификации каркасной области могут быть выполнены в каркасных последовательностях человека, а также в последовательностях CDR, полученных из зародышевой линии других видов млекопитающих. Гуманизированные антитела по изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями человека (например, мутации, введенные случайным образом или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*, или консервативная замена для стимуляции стабильности или производства). См., например, Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81:6851-6855, 1984; Morrison и Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92, 1988; Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536, 1988; Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498, 1991; и Padlan, *Molec. Immun.*, 31: 169-217, 1994. Другие примеры технологии инженерии антител человека включают, помимо прочего, технологию Хома, описанную в US5,766,886.

При использовании в настоящем описании термин «рекомбинантное гуманизированное антитело» включает в себя все антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными средствами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии гуманизированного

антитела, например, из трансфектомы, и антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют любыми другими средствами, которые включают в себя сплайсинг всего или части гена человеческого иммуноглобулина, последовательностей к другим последовательностям ДНК.

В соответствии с целью изобретения антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным. В соответствии с целью изобретения антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным и содержит CDR кролика.

При использовании в настоящем описании термин «мультиспецифическое антитело» означает антитело, которое связывается с двумя или более различными эпитопами на по меньшей мере двух или более различных мишенях (например, CD137 и PDL1). Термин «мультиспецифическое антитело» включает в себя биспецифические, триспецифические, тетраспецифические, пентаспецифические и гексаспецифические антитела. При использовании в настоящем описании термин «биспецифическое антитело» означает антитело, которое связывается с двумя различными эпитопами на по меньшей мере двух различных мишенях (например, CD137 и PDL1). При использовании в настоящем описании термин «триспецифическое антитело» означает антитело, которое связывается с тремя различными эпитопами на по меньшей мере трех различных мишенях (например, CD137, PDL1 и HSA).

Термин «эпитоп» означает детерминанту белка, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как боковые цепи аминокислот или сахара, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. «Конформационные» и «линейные» эпитопы различаются тем, что в присутствии денатурирующих растворителей связывание с первым пропадает, а связывание с последним сохраняется.

При использовании в настоящем описании термин «конформационный эпитоп» относится к аминокислотным остаткам антигена, которые собираются вместе на поверхности при сложении полипептидной цепи с образованием нативного белка, и демонстрируют значительно уменьшенную скорость обмена HD из-за связывания Fab. Конформационный эпитоп содержит, помимо прочего, функциональный эпитоп.

Термин «линейный эпитоп» относится к эпитопу со всеми точками взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (такой как антитело), расположенной линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка (непрерывно).

При использовании в настоящем описании термин «распознавать» относится к антигенсвязывающему фрагменту антитела, который обнаруживает и взаимодействует (например, связывается) с его конформационным эпитопом.

В соответствии с целью изобретения мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению является одновалентным, двухвалентным или мультивалентным для специфичности к CD137. В одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению является двухвалентным для специфичности к CD137. В предпочтительном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению является одновалентным для специфичности к CD137.

В соответствии с целью изобретения мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению является одновалентным, двухвалентным или мультивалентным для специфичности к PDL1. В одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению является двухвалентным для специфичности к PDL1. В предпочтительном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению является одновалентным для специфичности к PDL1.

Термин «мультивалентное антитело» относится к одиночной связывающей молекуле с более чем одной валентностью, при этом «валентность» описывается как количество антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с эпитопами на идентичных молекулах-мишенях. В таком качестве одиночная связывающая молекула может связываться с более чем одним сайтом связывания на молекуле-мишени. Примеры мультивалентных антител включают в себя, помимо прочего, двухвалентные антитела, трехвалентные антитела, четырехвалентные антитела, пятивалентные антитела и тому подобное.

При использовании в настоящем описании термин «одновалентное антитело» относится к антителу, которое связывается с одним эпитопом на одной молекуле-мишени, такой как CD137. Также при использовании в настоящем описании термин «домен связывания» или «одновалентный домен связывания» относится к домену связывания, который связывается с одним эпитопом на одной молекуле-мишени, такой как CD137.

При использовании в настоящем описании термин «двухвалентное антитело» относится к антителу, которое связывается с двумя различными эпитопами на по меньшей мере двух различных мишенях, таких как молекулах-мишенях CD137.

Недавно для получения дополнительной функции сшивки и достижения определенных уровней активации CD137 предложили использовать мультивалентные и мультиспецифические гибридные полипептиды, которые связываются с PDL1 и CD137. Eckelman et al. показали, что двухвалентная связь CD137, как и в случае INBRX-105

(мультиспецифического и мультивалентного полипептида с двумя доменами связывания с PDL1, двумя доменами связывания с CD137 и областью Fc) недостаточна для эффективной кластеризации и опосредования эффективной передачи сигналов CD137, связь второго антигена клеточной поверхности PDL1 в присутствии PDL1-положительных клеток обеспечивает дополнительную кластеризацию CD137 и эффективную передачу сигналов (WO 2017/123650).

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что мультиспецифическое антитело, содержащее (a) только один домен связывания CD137 (CD137-BD) и (b) по меньшей мере один домен связывания PDL1 (PDL1-BD), способно эффективно активировать передачу сигналов CD137 целенаправленным образом. Показано, что стабильные мультиспецифические (например, би-/триспецифические) одновалентные к CD137 молекулы по настоящему изобретению не способны агонизировать CD137 на Т-клетках в отсутствие другого типа клеток, который распознается доменом связывания PDL1 (фиг. 1B). Эффективная активация CD137 происходит только в присутствии PDL1-положительных клеток вследствие связывания доменов к PDL1 мультиспецифических антител по изобретению с молекулами PDL1, расположенными на поверхности PDL1-положительных клеток (фиг. 1C и фиг. 2). Это приводит к увеличению плотности мультиспецифических антител по настоящему изобретению в конкретном месте и, таким образом, к увеличению плотности доменов связывания CD137. Таким образом, CD137-BD могут эффективно кластеризовать и агонизировать CD137. Это одновременное связывание с PDL1 и CD137 запускает селективную активацию опухолево-реактивных Т-клеток и одновременно блокирует передачу сигналов PD-1 (Фиг. 2). Вследствие высокой сверхэкспрессии PDL1 на опухолевых клетках передача сигналов CD137 активирована только локально в присутствии указанных опухолевых клеток, что приводит к снижению системной токсичности. Таким образом, ожидается, что антитело по изобретению будет иметь несколько положительных эффектов по сравнению с существующими в настоящее время вариантами лечения. Прогнозируется, что антитело по изобретению будет иметь (i) более низкую частоту побочных эффектов, связанных с иммунитетом, и (ii) более низкую степень дозолимитирующей токсичности.

В предпочтительном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению является одновалентным для специфичности к CD137. Важно, что одновалентный для специфичности к CD137 мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению не способно системно индуцировать передачу сигналов CD137 вследствие отсутствия активации CD137 в отсутствие кластеризации, что вызвано

связыванием PDL1-BD с его антигеном. В одном варианте настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу, содержащему (a) CD137-BD и (b) по меньшей мере один PDL1-BD, предпочтительно один или два PDL1-BD, более предпочтительно один PDL1-BD. Таким образом, мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению является одновалентным, двухвалентным или мультивалентным для специфичности к PDL1, предпочтительнее одновалентным для специфичности к PDL1. В одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит один CD137-BD и один PDL1-BD. В одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению состоит из одного CD137-BD и одного PDL1-BD.

Термин «CD137» относится, в частности, к CD137 человека с идентификационным номером базы данных UniProt Q07011, воспроизведенный здесь как SEQ ID NO: 197. В соответствии с целью изобретения мишенью CD137-BD по настоящему изобретению является CD137, в частности CD137 человека, указанный в базе данных UniProt под идентификационным номером Q07011, воспроизведенный здесь как SEQ ID NO: 197. В соответствии с целью изобретения мишенью мультиспецифического антитела по изобретению, содержащего CD137-BD, является CD137 человека и человекообразных обезьян (*Macaca fascicularis*). В предпочтительном случае мультиспецифическое антитело по изобретению, содержащее CD137-BD, не блокирует взаимодействие CD137/CD137L.

CD137-BD по изобретению специфически связывается с CD137. В соответствии с целью изобретения мультиспецифические антитела по изобретению содержат CD137-BD, при этом указанный CD137-BD специфически связывается с CD137. В частном варианте указанный CD137-BD обладает специфичностью связывания с CD137 человека и не связывается с CD40 человека и/или не связывается с OX40 человека, в частности, в соответствии с определением SPR.

В соответствии с целью изобретения CD137-BD по изобретению является агонистом CD137. «Активатор» или «активирующее антитело», или «агонист» или «агонистическое антитело», или «домены связывания с агонистом» или «активирующий домен связывания» представляют собой антитело или домен, которые усиливают или инициируют передачу сигналов антигеном, с которым они связываются. В контексте настоящего изобретения термин «агонист CD137» включает в себя домены связывания CD137 по изобретению, которые способны активировать передачу сигналов CD137 при их кластеризации, например, если связывание по меньшей мере двух из указанных CD137-BD позволяет мультимеризовать и активизировать связанные молекулы CD137. В некоторых вариантах агонистические антитела активируют передачу сигналов без присутствия природного лиганда.

В некоторых вариантах CD137-BD по изобретению получают из моноклонального антитела или фрагмента антитела

Подходящие CD137-BD для применения в мультиспецифических антителах по настоящему изобретению представляют собой новые домены связывания, представленные в настоящем описании. Новые CD137-BD по изобретению включают в себя, помимо прочего, гуманизированные моноклональные антитела, выделенные в порядке, описанном в настоящем описании, в том числе в Примерах. Примерами таких CD137-BD являются антитела или их домены связывания, последовательности которых перечислены в таблице 1. Дополнительные сведения о генерации и характеристиках антител и доменов связывания, описанных в настоящем описании, представлены в Примерах. Новые CD137-BD по настоящему изобретению особенно подходят для целей настоящего изобретения. Мультиспецифические антитела по настоящему изобретению, содержащие по меньшей мере один из указанных CD137-BD, например, одновалентные для специфичности связывания CD137, способны активировать CD137 в присутствии PDL1-положительных клеток.

В соответствии с целью изобретения CD137-BD специфически связывается с CD137 и имеет один или несколько из следующих параметров:

- (i) связывается с человеческим CD137 с константой диссоциации (КД) менее 50 нМ, в частности менее 10 нМ, в частности менее 5 нМ, в частности менее 1 нМ, в частности менее 500 пМ, более конкретно менее 100 пМ, более конкретно менее 50 пМ, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv (одновалентную аффинность);
- (ii) связывается с CD137 человека со скоростью K_{off} 10^{-3} с^{-1} или менее, или 10^{-4} с^{-1} или менее, или 10^{-5} с^{-1} или менее при измерении с помощью SPR, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv;
- (iii) связывается с CD137 человека со скоростью K_{on} по меньшей мере $10^4 \text{ M}^{-1}\text{с}^{-1}$ или более, по меньшей мере $10^5 \text{ M}^{-1}\text{с}^{-1}$ или более, по меньшей мере $10^6 \text{ M}^{-1}\text{с}^{-1}$ или более при измерении с помощью SPR, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv;
- (iv) необязательно не конкурирует перекрестно с урелумабом;
- (v) необязательно не конкурирует перекрестно с утомилумабом;
- (vi) необязательно является перекрестно-реактивным с CD137 яванского макака (*Cynomolgus*) и

- (vii) необязательно не ингибирует взаимодействие между CD137 и его лигандом CD137L, в частности как измерено иммуносорбентным ферментным анализа конкуренции ELISA.

Термин «авидность» относится к информативному показателю общей стабильности или прочности комплекса антитело-антиген. Она контролируется тремя основными факторами: аффинностью антител к эпитопу, валентностью как антигена, так и антитела и структурным расположением взаимодействующих частей. В конечном счете эти факторы определяют специфичность антитела, то есть вероятность того, что определенное антитело связывается с именно этим эпитопом антигена.

Используемый в настоящем описании термин «аффинность» относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном в отдельных антигенных сайтах. В пределах каждого антигенного сайта переменная область «плеча» антитела взаимодействует посредством слабых нековалентных сил с антигеном в многочисленных сайтах; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность.

«Аффинность связывания», как правило, относится к прочности общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, при использовании в настоящем описании «аффинность связывания», «связывание с», «связывается с» или «связывающийся с» относится к истинной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, фрагментом антитела и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно может быть в основном представлено константой диссоциации (K_d). Аффинность может быть измерена общепринятыми методами, известными из уровня техники, в том числе описанными в настоящем документе. Антитела с низкой аффинностью обычно связываются с антигеном медленно и имеют тенденцию легко диссоциировать, при этом антитела с высокой аффинностью обычно связываются с антигеном быстрее и имеют тенденцию оставаться связанными дольше. В данной области техники известно множество способов измерения аффинности связывания, любой из которых может быть использован для целей настоящего изобретения. Ниже описаны конкретные иллюстративные и примерные варианты для измерения аффинности связывания, т.е., прочности связывания.

При использовании в настоящем описании термин K_{assoc} , K_a или K_{on} использован для обозначения скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген, при этом при использовании в настоящем описании термин K_{dis} , K_d или K_{off} использован для обозначения скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. В

одном варианте термин КД, используемый в настоящем описании, использован для обозначения константы диссоциации, которая получена из отношения K_d к K_a (т.е., K_d/K_a) и выражена в виде молярной концентрации (М). «КД» или «значение КД», или «КД», или «значение КД» по настоящему изобретению измеряют в одном варианте при помощи анализов поверхностно-плазмонного резонанса с использованием прибора MASS-1 SPR (датчики Sierra). Для измерения аффинности антител, специфичное к области Fc IgG кролика (Bethyl Laboratories, кат. № A120-111A), иммобилизуют на сенсорном чипе (датчик аффинности -2 Affinity Sensor, High Capacity Amine, Sierra Sensors) с использованием стандартной процедуры иммобилизации по аминогруппе. Моноклональные антитела кролика в надосадочных жидкостях В-клеток захватываются иммобилизованным антителом к IgG кролика. Для обеспечения достаточного уровня захвата необходима минимальная концентрация IgG в надосадочных жидкостях В-клеток. После захвата моноклональных антител CD137 ECD человека (Peprotech, кат. 310-15-1MG) или, как в случае PDL1-BD, PDL1 человека (Peprotech) вводят в проточные ячейки на 3 минуты в концентрации 90 нМ, и проводили диссоциацию белка из IgG, захваченного на сенсорном чипе, в течение 5 мин. После каждого цикла ввода поверхности регенерируют двумя введениями 10 мМ глицина-HCl. Кажущиеся константы скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a) и кажущуюся константу равновесия диссоциации (KD) рассчитывают с помощью программного обеспечения для анализа MASS-1 (Analyzer, Sierra Sensors) при помощи модели связывания один к одному Ленгмюра, и качество подборов контролируют на основе относительного χ^2 (χ^2 , нормализованного к экстраполированному максимальному уровню связывания аналита), который является показателем качества подбора кривой. Чем меньше значение χ^2 , тем точнее подбор модели связывания один к одному Ленгмюра. Результаты считаются действительными, если единицы ответа (RU) для связывания лиганда составляют по меньшей мере 2% от RU для захвата антител. Считается, что образцы с RU связывания лиганда с менее чем 2% RU захвата антител не показывают специфического связывания CD137 или PDL1 с захваченным антителом. Равновесная константа диссоциации (K_D) рассчитывается как отношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen et al, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999).

В соответствии с целью изобретения аффинность мультиспецифического антитела по изобретению к CD137 может быть сопоставима или выше, чем аффинность CD137L к CD137. В соответствии с целью изобретения аффинность мультиспецифического антитела по изобретению к CD137 может быть сопоставима или выше, чем аффинность урелумаба к CD137. Следует иметь в виду, что более высокая аффинность домена связывания CD137 может особенно хорошо подходить для применения в мультиспецифическом антителе по

изобретению, когда указанное антитело является одновалентным для CD137. Аффинность связывания антитела или его связывающего фрагмента может быть определена, например, при помощи константы диссоциации (KD). Более сильная аффинность представлена более низким KD, при этом более слабая аффинность представлена более высоким KD.

Таким образом, в подходящем варианте мультиспецифическое антитело по изобретению или CD137-BD по изобретению связывается с человеческим CD137 с KD от 5 до 50 000 пМ, от 5 до 40 000 пМ, от 5 до 30 000 пМ, от 5 до 20 000 пМ, от 5 до 10 000 пМ, от 5 до 9 000 пМ, от 5 до 8 000 пМ, от 5 до 7 000 пМ, от 5 до 6 000 пМ, от 5 до 5 000 пМ, от 5 до 2 500 пМ, от 5 до 1 000 пМ, от 5 до 750 пМ, от 5 до 500 пМ, от 5 до 250 пМ, 5 до от 5 до 100 пМ, от 5 до 75 пМ, от 5 до 50 пМ, от 5 до 30 пМ, в частности, при измерении с помощью SPR. В дополнительном варианте мультиспецифическое антитело по изобретению или CD137-BD по изобретению связывается с CD137 человека с KD от 10 нМ до 10 пМ, предпочтительно от 10 нМ до 0,1 нМ, например, от 5 нМ до 0,1 нМ, более предпочтительно от 5 нМ и 1 нМ, в частности, при измерении с помощью SPR.

В подходящем варианте мультиспецифическое антитело по изобретению или CD137-BD по изобретению связывается с CD137 человека с KD менее чем приблизительно 50 нМ, менее чем приблизительно 45 нМ, менее чем приблизительно 40 нМ, менее чем приблизительно 35 нМ, менее чем приблизительно 30 нМ, менее чем приблизительно 25 нМ, менее чем 20 нМ, менее чем приблизительно 15 нМ, менее чем приблизительно 10 нМ, менее чем приблизительно 9 нМ, менее чем приблизительно 8 нМ, менее чем приблизительно 7 нМ, менее чем приблизительно 6 нМ, менее чем приблизительно 5 нМ, менее чем приблизительно 4 нМ, менее чем приблизительно 3 нМ, менее чем 2 нМ, менее чем 1 нМ, менее чем 0,5 нМ, менее чем 0,25 нМ или менее чем 0,1 нМ, менее чем 50 пМ, менее 40 пМ, менее 30 пМ, менее 20 пМ, в частности, при измерении с помощью SPR. В соответствии с целью изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению или CD137-BD по изобретению связывается с CD137 человека с KD менее 10 нМ, в частности, при измерении с помощью SPR. В предпочтительном случае мультиспецифическое антитело по изобретению или CD137-BD по изобретению связывается с CD137 человека с KD менее 5 нМ, в частности, при измерении с помощью SPR. В соответствии с целью изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению или CD137-BD по изобретению связывается с CD137 человека с KD менее 1 нМ, в частности, при измерении с помощью SPR. В соответствии с целью изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению или CD137-BD по изобретению связывается с CD137 человека с KD менее 50 пМ, в частности, при измерении с помощью SPR.

В соответствии с целью изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению или CD137-BD по изобретению связывается с CD137 человека со скоростью K_{on} по меньшей мере $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, по меньшей мере $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, по меньшей мере $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, по меньшей мере $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, по меньшей мере $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, по меньшей мере $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, по меньшей мере $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, по меньшей мере $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, по меньшей мере $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В соответствии с целью изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению или CD137-BD по изобретению связывается с CD137 человека со скоростью K_{on} по меньшей мере $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или более, в частности по меньшей мере $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или более при измерении с помощью SPR, в частности, в котором указанное антитело представляет собой scFv (одновалентную аффинность).

В соответствии с целью изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению или CD137-BD по изобретению связывается с CD137 человека со скоростью K_{off} 10^{-3} s^{-1} или менее, $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ или менее, $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ или менее, 10^{-4} s^{-1} или менее, $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ или менее, 10^{-5} s^{-1} или менее, $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ или менее, 10^{-6} s^{-1} или менее, или 10^{-7} s^{-1} или менее при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В соответствии с целью изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению или CD137-BD по изобретению связывается с CD137 человека со скоростью K_{off} 10^{-4} s^{-1} или менее, в частности 10^{-5} s^{-1} или менее при измерении с помощью SPR.

В соответствии с целью изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению или CD137-BD по изобретению имеет связывание с CD137 человека по меньшей мере 60% или более, по меньшей мере 70% или более, по меньшей мере 75% или более, по меньшей мере 80% или более, по меньшей мере 85% или более, по меньшей мере 90% или более, по меньшей мере 95% или более при измерении с помощью SPR и нормализовано к уровням связывания, полученным для урелумаба.

В одном варианте CD137-BD по настоящему изобретению не вступает в перекрестную конкуренцию за связывание с урелумабом. Таким образом, в настоящем изобретении предложен CD137-BD, который связывается с другим эпитопом, но не с урелумабом. Урелумаб, также называемый BMS-663513, является полностью гуманизированным mAb IgG4 от Bristol-Myers Squibb и описан в WO2004/010947, US6,887,673 и US7,214,493, которые полностью включены в настоящую заявку путем ссылки. В еще одном варианте CD137-BD по настоящему изобретению вступает в перекрестную конкуренцию за связывание с урелумабом.

В одном варианте CD137-BD по настоящему изобретению не вступает в перекрестную конкуренцию за связывание с утомилумабом. Таким образом, в настоящем изобретении предложен CD137-BD, который связывается с другим эпитопом, но не с утомилумабом. Утомилумаб, также называемый PF-05082566, является полностью человеческим mAb IgG2 от Pfizer и описан в WO2012/032433 и US8,821,867, которые полностью включены в настоящую заявку путем ссылки. В еще одном варианте CD137-BD по настоящему изобретению вступает в перекрестную конкуренцию за связывание с утомилумабом.

В дополнительном варианте CD137-BD по настоящему изобретению не вступает в перекрестную конкуренцию за связывание с ни с урелумабом, ни с утомилумабом. Таким образом, в настоящем изобретении предложен CD137-BD по изобретению, который связывается с другим эпитопом, но не с урелумабом и утомилумабом.

Термины «вступать в конкуренцию» или «вступать в перекрестную конкуренцию» и связанные термины используются в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения способности антитела или другого связывающего агента вмешиваться в связывание других антител или связывающих агентов с CD137 в стандартном анализе конкурентного связывания.

С помощью стандартных анализов конкурентного связывания можно определить способность или степень, в которой антитело или другой связывающий агент может влиять на связывание другого антитела или связывающей молекулы с исследуемой мишенью, например, CD137, PDL1, а также, следовательно, вступают ли они в перекрестную конкуренцию по изобретению. В подходящем количественном анализе перекрестной конкуренции используют подход, основанный на FACS или AlphaScreen, для измерения конкуренции между меченым (например, меченым гистидином, биотинилированным или радиоактивно меченым) антителом или его фрагментом и другим антителом или его фрагментом в плане их связывания с мишенью. Как правило, перекрестно конкурирующим антителом или его фрагментом является, например, антитело, которое будет связываться с мишенью в анализе перекрестной конкуренции, так что во время анализа и в присутствии второго антитела или его фрагмента фиксируемое замещение одного переменного домена или полипептида иммуноглобулина по изобретению составляет до 100% (например, в анализе конкуренции на основе FACS) от максимального теоретического замещения (например, замещения холодным (например, немеченым) антителом или его фрагментом, которые необходимо перекрестно блокировать) посредством испытываемого потенциально перекрестно блокирующего антитела или его фрагмента, которые присутствуют в заданном количестве. В

предпочтительном случае перекрестно конкурирующие антитела или их фрагменты имеют зафиксированное замещение, которое составляет от 10% до 100%, более предпочтительно от 50% до 100%. Для целей настоящего изобретения использовали иммуносорбентный ферментный анализ конкуренции, соответствующий протокол подробно описан в разделе «Примеры» настоящего описания. В одном варианте CD137-BD по изобретению не ингибирует связывание урелумаба и/или утомилумаба с белком CD137, что демонстрирует, что CD137-BD по изобретению не может конкурировать с урелумабом и/или утомилумабом, соответственно, за связывание с CD137; такой CD137-BD или антитело, содержащее указанный домен, может, в соответствии с неограничивающей теорией, связываться с другим (например, структурно отличным или пространственно удаленным) эпитопом на CD137, например, урелумабом или утомилумабом, соответственно. В одном варианте CD137-BD по изобретению ингибирует связывание урелумаба или утомилумаба с белком CD137, что демонстрирует, что CD137-BD по изобретению может конкурировать с урелумабом или утомилумабом, соответственно, за связывание с CD137; такой CD137-BD или антитело, содержащее указанный домен, может, в соответствии с неограничивающей теорией, связываться с тем же самым или перекрывающим (например, структурно аналогичным или пространственно близким) эпитопом на CD137, например, урелумабом или утомилумабом, соответственно.

В настоящем изобретении также предложены домены связывания, которые связываются с тем же эпитопом, с которым связываются CD137-BD, перечисленные в таблице 1. Следовательно, дополнительные домены связывания можно идентифицировать на основе их способности вступать в перекрестную конкуренцию (например, конкурентно статистически значимым образом ингибировать связывание) с другими антителами и их антигенсвязывающими фрагментами по изобретению в анализах связывания CD137.

Способность испытываемого домена связывания ингибировать связывание CD137-BD по изобретению с белком CD137 демонстрирует, что испытываемый домен связывания может конкурировать с таким CD137-BD за связывание с CD137; такой домен связывания может, в соответствии с неограничивающей теорией, связываться с тем же или связанным (например, структурно аналогичным или пространственно близким) эпитопом на CD137, как и CD137-BD, с которым он конкурирует. В частном варианте домен связывания, который связывается с тем же самым эпитопом на CD137, с которым связывается CD137-BD по настоящему изобретению, представляет собой моноклональное антитело человека или гуманизированное моноклональное антитело. Такие моноклональные антитела человека или гуманизированные моноклональные антитела могут быть получены и выделены в порядке, описанном в настоящем документе.

После определения желаемого эпитопа на антигене можно генерировать антитела к этому эпитопу, например, при помощи методик, описанных в настоящем изобретении. В ином случае во время процесса обнаружения в ходе генерации и определения характеристик антител можно уточнить информацию о желательных эпитопах. На основе этой информации затем можно выполнить скрининг конкуренции антител на связывание с тем же эпитопом. Для выполнения этого необходимо провести исследования перекрестной конкуренции для выявления антител, которые конкурентно связываются друг с другом, например, антитела конкурируют за связывание с антигеном. Высокопроизводительный процесс «эпитоп-специфической сортировки» антител на основе их перекрестной конкуренции описан в WO 2003/48731. Как будет понятно специалисту в данной области, практически все, с чем может специфически связываться антитело, может быть эпитопом. Эпитоп может содержать те остатки, с которыми связывается антитело.

Области данного полипептида, которые включают в себя эпитоп, могут быть идентифицированы при помощи любого количества методов картирования эпитопов, хорошо известных из уровня техники. См., например, Протоколы картирования эпитопов в *Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Нью-Джерси. Например, линейные эпитопы могут быть определены, например, путем одновременного синтеза большого количества пептидов на твердых подложках, соотношения пептидов участкам молекулы белка и взаимодействия пептидов с антителами, при этом пептиды все еще прикреплены к подложкам. Такие методы известны в данной области техники и описаны, например, в US4,708,871; Geysen et al., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:3998-4002; Geysen et al., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:78-182; Geysen et al., (1986) *Mol. Immunol.* 23:709-715. Аналогичным образом, конформационные эпитопы легко идентифицируют путем определения пространственной конформации CD137 аминокислот, например, путем водородно-дейтериевого обмена, рентгеновской кристаллографии и двумерного ядерного магнитного резонанса. См., например, Протоколы картирования эпитопов, выше. Антигенные участки белков также можно идентифицировать при помощи стандартных графиков антигенности и гидропатии, например, рассчитанных при помощи, например, программы Omega version 1.0, реализуемой Oxford Molecular Group. В этой компьютерной программе используется метод Хоппа/Вудса Hopp et al., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3824-3828; для определения профилей антигенности и техники, и техника Кайта-Дулиттла, Kyte et al., (1982) *J. Mol. Biol.* 157: 105-132; для графиков гидропатии.

В соответствии с целью изобретения CD137-VD специфически связывается с CD137 и имеет один или несколько из следующих параметров:

- a) в случае формата scFv имеет температуру плавления (T_m), определенную с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF), по меньшей мере 50°C , предпочтительно по меньшей мере 55°C , более предпочтительно по меньшей мере 60°C , в частности в котором указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают в фосфатно-цитратном буфере при pH 6,4, 150 mM NaCl, в частности в 50 mM фосфатно-цитратном буфере при pH 6,4 с 150 mM NaCl;
- b) в случае формата scFv после хранения в течение по меньшей мере двух недель, в частности в течение по меньшей мере четырех недель, при 4°C имеет потерю содержания мономера менее чем 7%, например, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2%, предпочтительно менее 1%, когда антитело по изобретению находится в начальной концентрации 10 мг/мл и, в частности, в котором антитело по изобретению, например, указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, получают в 50 mM фосфатно-цитратного буфера с 150 mM NaCl при pH 6,4 и/или
- c) в случае формата scFv после хранения в течение по меньшей мере двух недель, в частности в течение по меньшей мере четырех недель, при 40°C имеет потерю содержания мономера менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2%, предпочтительно менее 1%, когда антитело по изобретению находится в начальной концентрации 10 мг/мл и, в частности, в котором антитело по изобретению, например, указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, получают в 50 mM фосфатно-цитратного буфера с 150 mM NaCl при pH 6,4.

DSF описан ранее (Egan, et al., MAbs, 9(1) (2017), 68-84; Niesen, et al., Nature Protocols, 2(9) (2007) 2212-2221). Середину перехода для термического разворачивания конструкторов scFv определяют методом дифференциальной сканирующей флуориметрии с использованием флуоресцентного красителя SYPRO® Orange (см. Wong & Raleigh, Protein Science 25 (2016) 1834-1840). Образцы в фосфатно-цитратном буфере при pH 6,4 готовят при конечной концентрации белка 50 мкг/мл и содержат конечную концентрацию 5x SYPRO® Orange в общем объеме 100 мкл. Двадцать пять микролитров приготовленных образцов добавляют в трех повторах в планшеты с белыми стенками для ПЦР гена AB. Анализ выполняют на аппарате количественной ПЦР, используемой в качестве термоциклера, и флуоресцентное излучение определяют с помощью специальной

программы калибровки красителя. Планшет для ПЦР, содержащий исследуемые образцы, выдерживают при изменении температуры от 25°C до 96°C с шагом 1°C с паузами 30 с после каждого увеличения температуры. Общее время анализа составляет приблизительно около двух часов. Tm рассчитывают с помощью программного обеспечения GraphPad Prism при помощи математического метода второй производной для расчета точки перегиба кривой. Сообщенный показатель Tm представляет собой среднее значение трех измерений.

Потерю содержания мономера определяют путем расчета площади под кривой хроматограмм эксклюзионной ВЭЖХ. Эксклюзионная ВЭЖХ представляет собой метод разделения, основанный на твердой неподвижной фазе и жидкой подвижной фазе, описанных в главе 621 Фармакопеи США (USP). В этом методе происходит разделение молекул на основе их размера и формы с использованием гидрофобной стационарной фазы, и водной подвижной фазы. Разделение молекул происходит между объемом пустот (V₀) и общим объемом проникновения (V_T) конкретной колонки. Измерения с помощью эксклюзионной ВЭЖХ выполняются на системе ВЭЖХ Chromaster (Hitachi High-Technologies Corporation), оборудованной автоматическим вводом образца и УФ-детектором, настроенным на рабочую длину волны детектора 280 нм. Управление оборудованием осуществляют при помощи программного обеспечения EZChrom Elite (Agilent Technologies, версия 3.3.2 SP2), которое также поддерживает анализ полученных хроматограмм. Образцы белка очищают центрифугированием и хранят при температуре 4-6°C в автоматическом пробозаборнике перед введением. Для анализа образцов scFv используют колонку Shodex KW403-4F (Showa Denko Inc., # F6989202) со стандартизованной подвижной фазой, забуференной физиологическим раствором (50 мМ фосфата натрия, pH 6,5, 300 мМ хлорида натрия) при рекомендуемом расходе 0,35 мл/мин. Загрузка целевых образцов на одно введение составляла 5 мкг. Образцы обнаруживают УФ-детектором на длине волны 280 нм, данные записывают с помощью подходящего программного пакета. Полученные хроматограммы анализируют в диапазоне от V₀ до V_T, тем самым исключая связанные с матрицей пики с временем элюирования > 10 минут.

В настоящем изобретении предложены CD137-BD, которые специфически связываются с белком CD137, при этом указанные домены связывания содержат CDR VH, имеющую аминокислотную последовательность любого из CDR VH, перечисленных в таблице 1. В частности, в изобретении предложены CD137-BD, которые специфически связываются с белком CD137, при этом указанные CD137-BD содержат (или

альтернативно состоят из) одну, две, три или более CDR VH, имеющие аминокислотную последовательность любого из CDR VH, перечисленных в таблице 1.

В настоящем изобретении также предложены CD137-BD, которые специфически связываются с белком CD137, при этом указанные CD137-BD содержат CDR VL, имеющую аминокислотную последовательность любого из CDR VL, перечисленных в таблице 1. В частности, в изобретении предложены CD137-BD, которые специфически связываются с белком CD137, при этом указанные CD137-BD содержат (или альтернативно состоят из) одну, две, три или более CDR VL, имеющие аминокислотную последовательность любого из CDR VL, перечисленных в таблице 1.

Другие CD137-BD по изобретению включают в себя аминокислоты, которые были мутированы, но которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичны в областях CDR с областями CDR, указанными в последовательностях, описанных в таблице 1. В одном аспекте другие CD137-BD по изобретению включают в себя мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были мутированы в областях CDR по сравнению с областями CDR, указанными в последовательности, описанной в таблице 1.

Термины «идентичный» или «идентичность» в контексте двух или более нуклеиновых кислот или последовательностей полипептидов относятся к двум или более одинаковым последовательностям или подпоследовательностям. «Процент (%) идентичности последовательности» и «гомология» в отношении нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или последовательности антитела определяют как процент нуклеотидов или аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны нуклеотидам или аминокислотным остаткам в определенной последовательности нуклеиновой кислоты, пептида или полипептида, после выравнивания последовательностей и введения пропусков, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности, и без учета каких-либо консервативных замен в рамках идентичности последовательности. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть выполнено различными путями, известными специалисту в данной области, например, при помощи общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2 или ALIGN. Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для обеспечения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Для сравнения последовательностей одну последовательность обычно используют как эталонную последовательность, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемые и эталонные последовательности вводят в компьютер, назначают координаты подпоследовательностей, если необходимо, и назначают параметры программы алгоритма последовательности. Можно использовать параметры программы по умолчанию или назначить иные параметры. Затем алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает показатели идентичности последовательностей в процентах для тестируемых последовательностей по сравнению с эталонной последовательностью на основе параметров программы.

Два примера алгоритмов, которые подходят для определения процента идентичности последовательности и сходства последовательности, – алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные у Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977; и Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990, соответственно. Программное обеспечение BLAST для выполнения анализов является общедоступным и распространяется Национальным центром биотехнологической информации.

Процент идентичности у двух аминокислотных последовательностей также может быть определен при помощи алгоритма Э. Мейерса и У. Миллера (*Comput. Appl. Biosci.*, 4: *Appl. Biosci.*, 4: 11-17, 1988), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), при помощи таблицы весовых остатков PAM120, со штрафом за длину пропуска 12 и штрафом за пропуск 4. Кроме того, процент идентичности двух аминокислотных последовательностей может быть определен при помощи алгоритма Нидлмана и Вунша (*J. Mol. Biol.* 48: 444-453, 1970), который был включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (размещен на сайте www.gcg.com), при помощи либо матрицы Blossom 62, либо матрицы PAM250, и вес пропуска составляет 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и вес длины составляет 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Термин «аминокислота» относится к природным и синтетическим аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично природным аминокислотам. Природные аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые впоследствии модифицированы, например, гидроксипролин, гамма-карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Термины «полипептид» и «белок» используются в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Термины применяются к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик

соответствующей природной аминокислоты, а также к природным аминокислотным полимерам и не встречающемуся в природе аминокислотному полимеру. Если не указано иное, конкретная полипептидная последовательность также подразумеваемым образом включает в себя свои ее консервативно модифицированные варианты.

В соответствии с целью изобретения CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит: (а) переменную область тяжелой цепи CDR1 (HCDR1), содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 1, 4, 5, 8, 11, 35, 38, 41 и 44, предпочтительно SEQ ID NO: 1; (b) переменную область тяжелой цепи CDR2 (HCDR2), содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 36, 39, 42 и 45, предпочтительно SEQ ID NO: 2; (c) переменную область тяжелой цепи CDR3 (HCDR3), содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 3, 7, 10, 13, 37, 40, 43 и 46, предпочтительно SEQ ID NO: 3; (d) переменную область легкой цепи CDR1 (LCDR1), содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 18, 21, 24, 48, 51 и 54, предпочтительно SEQ ID NO: 18; (e) переменную область легкой цепи CDR2 (LCDR2), содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 19, 22, 25, 49, 52 и 55, предпочтительно SEQ ID NO: 19, и (f) переменную область легкой цепи CDR3 (LCDR3), содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 20, 23, 26, 50, 53 и 56, предпочтительно SEQ ID NO: 20. В соответствии с целью изобретения CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит: (а) переменную область тяжелой цепи CDR1 (HCDR1), содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью любой из SEQ ID NO: 1, 4, 5, 8, 11, 35, 38, 41 и 44, предпочтительно SEQ ID NO: 1; (b) переменную область тяжелой цепи CDR2 (HCDR2), содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с любой из SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 36, 39, 42 и 45, предпочтительно SEQ ID NO: 2; (c) переменную область тяжелой цепи CDR3 (HCDR3), содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с любой из SEQ ID NO: 3, 7, 10, 13, 37, 40, 43 и 46, предпочтительно SEQ ID NO: 3; (d) переменную область легкой цепи CDR1 (LCDR1), содержащую

последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с любой из SEQ ID NO: 18, 21, 24, 48, 51 и 54, предпочтительно SEQ ID NO: 18; (е) переменную область легкой цепи CDR2 (LCDR2), содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с любой из SEQ ID NO: 19, 22, 25, 49, 52 и 55, предпочтительно SEQ ID NO: 19, и (ф) переменную область легкой цепи CDR3 (LCDR3), содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с любой из SEQ ID NO: 20, 23, 26, 50, 53 и 56, предпочтительно SEQ ID NO: 20.

В одном варианте CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит: (а) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно; (б) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 4, 6 и 7, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 21, 22 и 23, соответственно; (с) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 21, 22 и 23, соответственно; (д) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно; (е) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 11, 12 и 13, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 24, 25 и 26, соответственно; (ф) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 35, 36 и 37, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно; (г) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 38, 39 и 40, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 51, 52 и 53, соответственно; (г) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 41, 42 и 43, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно; (и) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 44, 45 и 46, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 54, 55 и 56, соответственно. В предпочтительном варианте CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно.

В соответствии с целью изобретения CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит: (а) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90,

99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 38, 39 и 40, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 51, 52 и 53, соответственно; (h) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 41, 42 и 43, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно; (i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 44, 45 и 46, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 54, 55 и 56, соответственно. В предпочтительном варианте CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно. В соответствии с целью изобретения CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит: (a) HCDR1, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 1; (b) HCDR2, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 2; (c) HCDR3, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 3; (d) LCDR1, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 18; (e) LCDR2, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или

99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 19, и (f) LCDR3, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 20.

В дополнительном варианте CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит: (a) HCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5; (b) HCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6; (c) HCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7; (d) LCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21; (e) LCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22, и (f) LCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23. В соответствии с целью изобретения CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит: (a) HCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5; (b) HCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 6; (c) HCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 7; (d) LCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 21; (e) LCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 22, и (f) LCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 23.

В еще одном варианте CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит: (a) HCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35; (b) HCDR2, содержащую,

предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36; (c) HCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37; (d) LCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 48; (e) LCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 49; и (f) LCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50. В соответствии с целью изобретения CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит: (a) HCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 35; (b) HCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 36; (c) HCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 37; (d) LCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 48; (e) LCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 49, и (f) LCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 50.

В дополнительном варианте CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит: (a) HCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38; (b) HCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39; (c) HCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40; (d) LCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 51; (e) LCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52, и (f) LCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53. В соответствии с целью изобретения CD137-BD

мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит: (a) HCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 38; (b) HCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 39; (c) HCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 40; (d) LCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 51; (e) LCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 52, и (f) LCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 53.

В предпочтительном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит CD137-BD, при этом указанный CD137-BD содержит: (a) переменную область тяжелой цепи CDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 59, 62, 65 и 68, предпочтительно SEQ ID NO: 59; (b) переменную область тяжелой цепи CDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 60, 63, 66 и 69, предпочтительно SEQ ID NO: 60; (c) переменную область тяжелой цепи CDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 61, 64, 67 и 70, предпочтительно SEQ ID NO: 61; (d) переменную область легкой цепи CDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 74, 77 и 80, предпочтительно SEQ ID NO: 74; (e) переменную область легкой цепи CDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 75, 78 и 81, предпочтительно SEQ ID NO: 75, и (f) переменную область легкой цепи CDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 76, 79 и 82, предпочтительно SEQ ID NO: 76. В

соответствии с целью изобретения CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит: (a) переменную область тяжелой цепи CDR1, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с любой из SEQ ID NO: 59, 62, 65 и 68, предпочтительно SEQ ID NO: 59; (b) переменную область тяжелой цепи CDR2, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с любой из SEQ ID NO: 60, 63, 66 и 69, предпочтительно SEQ ID NO: 60; (c) переменную область тяжелой цепи CDR3, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с любой из SEQ ID NO: 61, 64, 67 и 70, предпочтительно SEQ ID NO: 61; (d) переменную область легкой цепи CDR1, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с любой из SEQ ID NO: 74, 77 и 80, предпочтительно SEQ ID NO: 74 (e) переменную область легкой цепи CDR2, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с любой из SEQ ID NO: 75, 78 и 81, предпочтительно SEQ ID NO: 75, и (f) переменную область легкой цепи CDR3, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с любой из SEQ ID NO: 76, 79 и 82, предпочтительно SEQ ID NO: 76.

В одном варианте CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит: (a) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно; (b) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 77, 78 и 79, соответственно; (c) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно; (d) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 68, 69 и 70, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 80, 81 и 82, соответственно. В предпочтительном варианте CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно.

В соответствии с целью изобретения, CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит: (a) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно; (b) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 62, 63 и 64, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 77, 78 и 79, соответственно; (c) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 65, 66 и 67, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно; (d) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 68, 69 и 70, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 80, 81 и 82, соответственно. В предпочтительном варианте CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно. В соответствии с целью изобретения CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит: (a) HCDR1, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 59; (b) HCDR2, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93,

94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 60; (c) HCDR3, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 61; (d) LCDR1, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 74; (e) LCDR2, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 75, и (f) LCDR3, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 76.

В дополнительном варианте CD137-BD мультиспецифического тела по настоящему изобретению содержит домен VH и домен VL. В контексте настоящего изобретения термины «VH» (вариабельная тяжелая цепь), «VL» (вариабельная легкая цепь), «Vk» и «Vλ» относятся к семействам последовательностей тяжелой и легкой цепи антитела, сгруппированным в соответствии с идентичностью и гомологией последовательности. Специалисту в данной области техники хорошо известны методы определения гомологий последовательностей, например, при помощи матрицы поиска гомологий, такой как BLOSUM (Henikoff S. & Henikoff, JG, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 10915-10919), и методы для группирования последовательностей в соответствии с гомологиями. Для VH, Vk и Vλ могут быть идентифицированы разные подсемейства, показанные, например, в Клэппик et al., J. Mol. Biol. 296 (2000) 57-86, где сгруппированы VH в VH1A, VH1B и VH2 в VH6, Vk в Vk1 в Vk4 и Vλ в Vλ1 в Vλ3. In vivo цепи Vk, цепи Vλ и цепи VH антител образуются в результате случайной реаранжировки сегментов V и J цепи к зародышевой линии, сегментов V и J зародышевой линии λ и сегментов V, D и J тяжелой цепи, соответственно. К какому подсемейству относится данная вариабельная цепь антитела, определяется соответствующим сегментом V и, в частности каркасными областями FR1-FR3. Таким образом, любая последовательность VH, которая характеризуется в настоящей заявке только конкретным набором каркасных областей HFR1-HFR3, может быть объединена с любой последовательностью HFR4, например, с последовательностью HFR4, взятой из одного из сегментов J зародышевой линии тяжелой цепи, или последовательностью HFR4, взятой из переранжированной последовательности VH.

В соответствии с целью изобретения CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит каркасные последовательности домена VH4 или VH3, предпочтительно каркасные последовательности домена VH4, более предпочтительно – каркасные последовательности домена VH3.

Конкретный пример VH, принадлежащего семейству VH3, представлен под SEQ ID NO: 71. В частности, каркасные области FR1-FR4, взятые из SEQ ID NO: 71, принадлежат к семейству VH3 (таблица 1, области, указанные “нежирным” шрифтом). В соответствии с целью изобретения при использовании в настоящем описании VH, принадлежащий к семейству VH3, представляет собой VH, содержащий FR1-FR4, последовательность которых по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% совпадает/идентична с последовательностями FR1-FR4 SEQ ID NO: 71.

Конкретный пример VH, принадлежащего семейству VH4, представлен под SEQ ID NO: 14. В частности, каркасные области FR1-FR4, взятые из SEQ ID NO: 14, принадлежат к семейству VH4 (таблица 1, области, указанные “нежирным” шрифтом). В соответствии с целью изобретения при использовании в настоящем описании VH, принадлежащий к семейству VH4, представляет собой VH, содержащий FR1-FR4, последовательность которых по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% совпадает/идентична с последовательностями FR1-FR4 SEQ ID NO: 14.

В соответствии с целью изобретения CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит каркасы V_k FR1, FR2 и FR3, в частности каркасы V_{k1} или V_{k3}, предпочтительно каркасы V_{k1} FR1- FR3, и каркас FR4, который выбран из V_k FR4, в частности V_{k1} FR4, V_{k3} FR4 и V_λ FR4. Подходящие каркасы V_{k1} FR1- FR3 указаны в SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 83 (таблица 1, области FR указаны “нежирным” шрифтом). Подходящие каркасы V_{k1} FR1-3 содержат аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадают с аминокислотными последовательностями, соответствующими FR1-3 и взятыми из SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 83 (таблица 1, области FR указаны “нежирным” шрифтом). Подходящие V_λ FR4 указаны в SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205. В одном варианте CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит V_λ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадает с/идентична содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205.

В одном варианте CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит:

- (i) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 с:
 - a. SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно; или

- b. SEQ ID NO: 35, 36 и 37, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно; или
- c. SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно;
- (ii) каркасные последовательности доменов VH3 или VH4 FR1-FR4; предпочтительно каркасные последовательности домена VH4 FR1-FR4, более предпочтительно каркасные последовательности домена VH3 FR1-FR4; и
- (iii) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасы V_к FR1, FR2 и FR3, в частности V_{к1} или V_{к3} FR1-FR3, предпочтительно V_{к1} FR1-FR3, и каркас FR4, который выбран из V_к FR4, в частности V_{к1} FR4, V_{к3} FR4, и V_λ FR4, в частности V_λ FR4, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 199 - SEQ ID NO: 205, более конкретно V_λ FR4, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 199 - SEQ ID NO: 205, предпочтительно, V_λ FR4, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 199.

В предпочтительном варианте указанный CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно.

В одном варианте CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит:

- (i) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 с:
 - a. SEQ ID NO: 4, 6 и 7, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 21, 22 и 23, соответственно;
 - b. SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 21, 22 и 23, соответственно; или
 - c. SEQ ID NO: 38, 39 и 40, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 51, 52 и 53, соответственно;
- (ii) Каркасные последовательности доменов VH3 или VH4 FR1-FR4; предпочтительно каркасные последовательности домена VH4 FR1-FR4, более предпочтительно каркасные последовательности домена VH3 FR1-FR4; и
- (iii) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасы V_к FR1, FR2 и FR3, в частности V_{к1} или V_{к3} FR1-FR3, предпочтительно V_{к1} FR1-FR3, и каркас

FR4, который выбран из V_к FR4, в частности V_{к1} FR4, V_{к3} FR4, и V_λ FR4, в частности V_λ FR4, содержащего аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, более конкретно V_λ FR4, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, предпочтительно V_λ FR4, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 199.

В одном варианте CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит V_L, содержащий:

- (i) домены CDR: CDR1, CDR2 and CDR3;
- (ii) каркасные области V_к человека FR1-FR3, в частности каркасные области V_{к1} человека FR1-FR3;
- (iii) FR4, который выбран из (a) последовательности зародышевой линии V_λ человека для FR4, в частности последовательности зародышевой линии V_λ, выбранной из списка: SEQ ID NO: 199-205, предпочтительно V_λ FR4, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 199, и (b) последовательности на основе V_λ, которая имеет одну или две мутации, в частности одну мутацию, по сравнению с самой близкой последовательностью зародышевой линии V_λ человека для FR4, содержащего аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, предпочтительно, V_λ FR4, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 199.

В предпочтительном варианте CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит:

- (i) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 с:
 - a. SEQ ID NO: 4, 6 и 7, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 21, 22 и 23, соответственно;
 - b. SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 21, 22 и 23, соответственно или
 - c. SEQ ID NO: 38, 39 и 40, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 51, 52 и 53, соответственно;
- (ii) каркасные последовательности домена V_{H4} FR1-FR4 и
- (iii) домен V_L, содержащий каркас V_L, содержащий каркасы V_{к1} FR1, FR2 и FR3, и V_λ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, которая по

меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадает с включенной аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, в частности V λ FR4, указанный в SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, предпочтительно SEQ ID NO: 199.

В еще одном предпочтительном варианте CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит:

- (i) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно;
- (ii) каркасные последовательности домена VH3 FR1-FR4 и
- (iii) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасы V κ 1 FR1, FR2 и FR3, и V λ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадает с включенной аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, в частности V λ FR4, указанный в SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, предпочтительно SEQ ID NO: 199.

В более предпочтительном варианте CD137-BD мультиспецифического антитела по настоящему изобретению содержит:

- (i) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно;
- (ii) каркасные последовательности домена VH3 FR1-FR4 и
- (iii) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасы V κ 1 FR1, FR2 и FR3, и V λ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадает с включенной аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, в частности V λ FR4, указанный в SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, предпочтительно SEQ ID NO: 199.

В соответствии с целью изобретения CD137-BD по изобретению содержит домен VH, указанный в таблице 1. В соответствии с целью изобретения CD137-BD по изобретению содержит аминокислотную последовательность VH, указанную в таблице 1, в которой произошла мутация не более чем около 10 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) (при этом мутацией является, в качестве различных не ограничивающих примеров, добавление,

замена или делеция). В соответствии с целью изобретения CD137-BD по изобретению содержит аминокислотную последовательность VH, указанную в таблице 1, в которой произошла мутация не более чем около 20 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) (при этом мутацией является, в качестве различных не ограничивающих примеров, добавление, замена или делеция). Другие CD137-BD по изобретению включают в себя аминокислоты, которые были мутированы, но которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичны/совпадают в областях VH с областями VH, указанными в последовательностях, описанных в таблице 1.

В соответствии с целью изобретения CD137-BD по изобретению содержит домен VL, указанный в таблице 1. В соответствии с целью изобретения CD137-BD по изобретению содержит аминокислотную последовательность VL, указанную в таблице 1, в которой произошла мутация не более чем около 10 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) (при этом мутацией является, в качестве различных не ограничивающих примеров, добавление, замена или делеция). В соответствии с целью изобретения CD137-BD по изобретению содержит аминокислотную последовательность VL, указанную в таблице 1, в которой произошла мутация не более чем около 20 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) (при этом мутацией является, в качестве различных не ограничивающих примеров, добавление, замена или делеция). Другие CD137-BD по изобретению включают в себя аминокислоты, которые были мутированы, но которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичны/совпадают в областях VL с областями VL, указанными в последовательностях, описанных в таблице 1.

В соответствии с целью изобретения CD137-BD по изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, предпочтительно по меньшей мере на 90 процентов, совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17 и 47, предпочтительно SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, предпочтительно по меньшей мере на 90 процентов, совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30 и 57, предпочтительно SEQ ID NO: 30.

В соответствии с целью изобретения CD137-BD по настоящему изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17 и 47, предпочтительно SEQ ID NO: 17, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30 и 57, предпочтительно SEQ ID NO: 30.

В дополнительном варианте CD137-BD по настоящему изобретению содержит: (a) последовательность VH SEQ ID NO: 14 и последовательность VL SEQ ID NO: 27; (b) последовательность VH SEQ ID NO: 15 и последовательность VL SEQ ID NO: 28; (c) последовательность VH SEQ ID NO: 16 и последовательность VL SEQ ID NO: 29; (d) последовательность VH SEQ ID NO: 17 и последовательность VL SEQ ID NO: 30 или (e) последовательность VH SEQ ID NO: 47 и последовательность VL SEQ ID NO: 57. В предпочтительном варианте CD137-BD по настоящему изобретению содержит последовательность VH SEQ ID NO: 17 и последовательность VL SEQ ID NO: 30.

В одном варианте CD137-BD по настоящему изобретению содержит:

(a) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 4, 6 и 7, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 21, 22 и 23, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27;

(b) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 4, 6 и 7, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 21, 22 и 23, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28;

(c) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 21, 22 и 23, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, и последовательность VL, которая по меньшей мере

на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29;

(d) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 4, 6 и 7, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 21, 22 и 23, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, и последовательность VL, которая по меньшей мере чем на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30, предпочтительно в котором указанная VH содержит мутацию G51C (нумерация АНо), и указанная VL содержит мутацию T141C (нумерация АНо) или

(e) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 38, 39 и 40, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 51, 52 и 53, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 47, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 57.

В одном варианте CD137-BD по настоящему изобретению содержит:

(a) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере чем на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27;

(b) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28;

(c) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19 и 20,

соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29;

(d) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30, предпочтительно в котором указанная VH содержит мутацию G51C (нумерация АНо), и указанная VL содержит мутацию T141C (нумерация АНо) или

(e) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 35, 36 и 37, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 47, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 57.

В предпочтительном варианте CD137-BD по настоящему изобретению содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30, предпочтительно, в котором указанная VH содержит мутацию G51C (нумерация АНо), и указанная VL содержит мутацию T141C (нумерация АНо). В соответствии с целью изобретения указанный CD137-BD по настоящему изобретению мутирован с образованием искусственного междоменного дисульфидного мостика в каркасной области, в частности в котором пара цистеинов заменяет Gly 51 (нумерация АНо) на указанных VH и Thr 141 (нумерация АНо) на указанной VL. Неожиданно было

обнаружено, что такой CD137-BD, содержащий междоменный дисульфидный мостик, обладает значительно повышенной термостойкостью.

Термин «искусственный» в отношении дисульфидного мостика («мостик S-S» или «diS») означает, что мостик S-S образован не природным антителом дикого типа, а образован с помощью сконструированного мутанта родительской молекулы, в котором по меньшей мере одна чужеродная аминокислота обеспечивает дисульфидное связывание. Искусственные дисульфидные мостики, полученные при помощи сайт-направленного инжинерии, четко отличаются от тех, которые возникли естественным образом в нативных иммуноглобулинах или в модулярных антителах, таких как те, которые описаны в WO 2009/000006, так как, по крайней мере, один из сайтов стоек искусственного дисульфидного мостика обычно расположен поодаль от положений остатков цистеина в антителе дикого типа, таким образом, создавая альтернативный или дополнительный дисульфидный мостик в каркасной области. Искусственный дисульфидный мостик по настоящему изобретению может быть сконструирован в домене антитела («внутридоменный мостик»), который стабилизировал бы бета-складчатую структуру или соединял бы домены («междоменный мостик») или цепочки доменов («мостик между цепями») для ограничения структуры мультиспецифического антитела по изобретению и поддержки его взаимодействия с потенциальными партнерами по связыванию.

В одном варианте CD137-BD по настоящему изобретению содержит:

- (a) последовательность VH SEQ ID NO: 14 и последовательность VL SEQ ID NO: 27;
- (b) последовательность VH SEQ ID NO: 15 и последовательность VL SEQ ID NO: 28;
- (c) последовательность VH SEQ ID NO: 16 и последовательность VL SEQ ID NO: 29;
- (d) последовательность VH SEQ ID NO: 17 и последовательность VL SEQ ID NO: 30

или

- (e) последовательность VH SEQ ID NO: 47 и последовательность VL SEQ ID NO: 57.

В одном варианте CD137-BD по настоящему изобретению содержит:

- (a) последовательность VH SEQ ID NO: 14 и последовательность VL SEQ ID NO: 27;
- (b) последовательность VH SEQ ID NO: 15 и последовательность VL SEQ ID NO: 28;
- (c) последовательность VH SEQ ID NO: 16 и последовательность VL SEQ ID NO: 29;
- (d) последовательность VH SEQ ID NO: 17 и последовательность VL SEQ ID NO: 30

или

- (e) последовательность VH SEQ ID NO: 47 и последовательность VL SEQ ID NO: 57.

В предпочтительном варианте CD137-BD по настоящему изобретению содержит последовательность VH SEQ ID NO: 17 и VL SEQ ID NO: 30.

В одном варианте CD137-BD по настоящему изобретению описан в таблице 1. В одном варианте CD137-BD по изобретению по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 58. В одном варианте CD137-BD по настоящему изобретению указан в SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 58. В одном варианте CD137-BD по настоящему изобретению указан в SEQ ID NO: 31 или SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34. В предпочтительном варианте CD137-BD по настоящему изобретению указан в SEQ ID NO: 33. В более предпочтительном варианте CD137-BD по настоящему изобретению указан в SEQ ID NO: 34.

В предпочтительном варианте CD137-BD по изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, предпочтительно по меньшей мере на 90 процентов, совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71, 72 и 73, предпочтительно SEQ ID NO: 71, более предпочтительно SEQ ID NO: 73, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, предпочтительно по меньшей мере на 90 процентов, совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83, 84 и 85, предпочтительно SEQ ID NO: 83, более предпочтительно SEQ ID NO: 85. В частном варианте CD137-BD по настоящему изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 71, 72 и 73, предпочтительно SEQ ID NO: 71, более предпочтительно SEQ ID NO: 73, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 83, 84 и 85, предпочтительно SEQ ID NO: 83, более предпочтительно SEQ ID NO: 85.

В дополнительном варианте CD137-BD по настоящему изобретению содержит: (a) последовательность VH SEQ ID NO: 71 и последовательность VL SEQ ID NO: 83; (b) последовательность VH SEQ ID NO: 72 и последовательность VL SEQ ID NO: 84 или (c) последовательность VH SEQ ID NO: 73 и последовательность VL SEQ ID NO: 85. В предпочтительном варианте CD137-BD по настоящему изобретению содержит последовательность VH SEQ ID NO: 71 и последовательность VL SEQ ID NO: 83. В более предпочтительном варианте CD137-BD по настоящему изобретению содержит последовательность VH SEQ ID NO: 73 и последовательность VL SEQ ID NO: 85.

В предпочтительном варианте CD137-BD по настоящему изобретению содержит:

(a) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 71, и последовательность VL, которая по меньшей мере чем на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83, предпочтительно в котором указанная VH содержит мутацию G51C (нумерация АНо), и указанная VL содержит мутацию T141C (нумерация АНо);

(b) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 72, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 84 или

(c) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 73, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 85, предпочтительно в котором указанная VH содержит мутацию G51C (нумерация АНо), и указанная VL содержит мутацию T141C (нумерация АНо).

В предпочтительном варианте CD137-BD по настоящему изобретению содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 71, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83, предпочтительно в котором указанная VH содержит мутацию G51C (нумерация АНо), и указанная VL содержит мутацию T141C (нумерация АНо). В соответствии с

целью изобретения указанный CD137-BD по настоящему изобретению мутирован с образованием искусственного междоменного дисульфидного мостика в каркасной области, в частности в котором пара цистеинов заменяет Gly 51 (нумерация АНо) на указанных VH и Thr 141 (нумерация АНо) на указанной VL. Неожиданно было обнаружено, что такой CD137-BD, содержащий междоменный дисульфидный мостик, обладает значительно повышенной термостойкостью.

В предпочтительном варианте CD137-BD по настоящему изобретению содержит последовательность VH SEQ ID NO: 71 и VL SEQ ID NO: 83. В более предпочтительном варианте CD137-BD по настоящему изобретению содержит последовательность VH SEQ ID NO: 73 и VL SEQ ID NO: 85.

В одном варианте CD137-BD по настоящему изобретению описан в таблице 1. В одном варианте CD137-BD по изобретению по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 86, 87 и 88. В одном варианте CD137-BD по настоящему изобретению указан в SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87 или SEQ ID NO: 88. В предпочтительном варианте CD137-BD по настоящему изобретению указан в SEQ ID NO: 86. В более предпочтительном варианте CD137-BD по настоящему изобретению указан в SEQ ID NO: 88.

Другие CD137-BD по настоящему изобретению включают в себя CD137-BD, в которых аминокислоты или нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислоты, мутированы, но по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 или 95 процентов совпадают с последовательностями, описанными в таблице 1. В одном варианте они включают в себя мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были мутированы в переменных областях по сравнению с переменными областями, указанными в последовательности, описанной в таблице 1, при этом они сохраняют, по существу, ту же самую терапевтическую активность. При использовании в настоящем описании термин «по существу, та же самая активность» означает указанную активность, которая, по существу, составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или даже по меньшей мере 100% или по меньшей мере 110%, или по меньшей мере 120%, или по меньшей мере 130%, или по меньшей мере 140%, или по меньшей мере 150%, или по меньшей мере 160%, или по меньшей мере 170% или по меньшей мере 180% или по меньшей мере 190%, например, до 200% от активности, определенной для родительского CD137-BD, в частности для CD137 по изобретению, описанного в таблице 1.

С учетом того, что каждый из этих доменов связывания или антител может связываться с CD137 и что антигенсвязывающая специфичность обеспечивается в основном CDR1, 2 и 3 областями, последовательности VH CDR1, 2 и 3 и последовательности VL CDR1, 2 и 3 могут быть «смешаны и подобраны» (т.е. CDR из разных доменов связывания или антител можно смешивать и подбирать, хотя каждый домен связывания или каждое антитело должны содержать VH CDR1, 2 и 3, и VL CDR1, 2 и 3, для создания других молекул связывания с CD137 по изобретению. Такие «смешанные и подобранные» CD137-BD могут быть протестированы при помощи анализов связывания, известных из уровня техники и описанных в примерах (например, иммуносорбентного ферментного анализа). Когда последовательности CDR VH смешаны и подобраны, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из определенной последовательности VH должна быть заменена структурно аналогичной последовательностью (последовательностями) CDR. Аналогичным образом, когда последовательности CDR VL смешаны и подобраны, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из определенной последовательности VL должна быть заменена структурно аналогичной последовательностью (последовательностями) CDR. Специалисту в данной области техники будет понятно, что новые последовательности VH и VL могут быть созданы путем мутации одной или нескольких последовательностей областей CDR VH и/или VL со структурно аналогичными последовательностями последовательностей CDR, показанных в настоящем описании, для моноклональных антител или доменов связывания по настоящему изобретению.

В еще одном варианте в настоящем изобретении предложен CD137-BD, содержащий аминокислотные последовательности, гомологичные последовательностям, описанным в таблице 1, и указанный домен связывания связывается с CD137 и сохраняет желательные функциональные свойства этих доменов связывания, описанных в таблице 1.

Например, в изобретении предложен CD137-BD, который содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 47, 71, 72 и 73, предпочтительно SEQ ID NO: 17, более предпочтительно SEQ ID NO: 71; переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из

SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 57, 83, 84 и 85, предпочтительно SEQ ID NO: 30, более предпочтительно SEQ ID NO: 85; при этом домен связывания специфически связывается с белком CD137 человека.

В одном варианте аминокислотные последовательности VH и/или VL могут на 50 процентов, 60 процентов, 70 процентов, 80 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов совпадать с последовательностями, приведенными в таблице 1. В одном варианте аминокислотные последовательности VH и/или VL могут совпадать за исключением аминокислотного замещения не более чем в 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных положениях.

В одном варианте CD137-BD по изобретению имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, при этом одна или несколько из этих последовательностей CDR имеют указанные аминокислотные последовательности на основе CD137-BD, описанных в настоящем документе, или их консервативных модификаций, и при этом CD137-BD сохраняет желаемые функциональные свойства CD137-BD по изобретению.

Термин «консервативно модифицированный вариант» или «консервативный вариант» относится как к аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновых кислот. В отношении определенных последовательностей нуклеиновых кислот, консервативно модифицированные варианты означают такие нуклеиновые кислоты, которые кодируют идентичные или, по существу, идентичные аминокислотные последовательности, или, если нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, означают, по существу, идентичные последовательности. Вследствие вырождения генетического кода большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодируют любой данный белок. Например, все кодоны GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором аланин определен кодоном, кодон может быть заменен на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие вариации нуклеиновых кислот являются «молчащими вариациями» – одним из видов консервативно модифицированных вариаций. В настоящем описании каждая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, также описывает каждую возможную молчащую вариацию нуклеиновой кислоты. Специалист в данной области техники поймет, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (кроме AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) можно модифицировать с получением

функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждая молчащая вариация нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид, подразумеваемым образом включена в каждую описанную последовательность.

Для полипептидных последовательностей «консервативно модифицированные варианты» или «консервативные варианты» включают в себя отдельные замены, делеции или добавления к полипептидной последовательности, которые приводят к замещению аминокислоты химически аналогичной аминокислотой. В данной области техники хорошо известны таблицы консервативных замещений, в которых указаны функционально аналогичные аминокислоты. Такие консервативно модифицированные варианты дополняют и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели по изобретению. Следующие восемь групп содержат аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T); и 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, *Proteins* (1984)). В одном варианте термин «консервативные модификации последовательностей» используют для обозначения модификаций аминокислот, которые не оказывают значительного влияния или не изменяют в значительной степени характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность.

Соответственно, в изобретении предложен CD137-BD, состоящий из варибельной области тяжелой цепи, содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и варибельной области легкой цепи, содержащей последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, в котором варибельная область тяжелой цепи CDR1 содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 1, 4, 5, 8, 11, 35, 38, 41, 44, 59, 62, 65 и 68, предпочтительно SEQ ID NO: 1, более предпочтительно SEQ ID NO: 59, или консервативных вариантов; варибельная область тяжелой цепи CDR2 содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 2, 6, 9, 12, 36, 39, 42, 45, 60, 63, 66 и 69, предпочтительно SEQ ID NO: 2, более предпочтительно SEQ ID NO: 60, или консервативных вариантов; варибельная область тяжелой цепи CDR3 содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 3, 7, 10, 13, 37, 40, 43, 46, 61, 64, 67 и 70, предпочтительно SEQ ID NO: 3, более предпочтительно SEQ ID NO: 61, или консервативных вариантов; варибельная область легкой цепи CDR1 содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной

последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 18, 21, 24, 48, 51, 54, 74, 77 и 80, предпочтительно SEQ ID NO: 18, более предпочтительно SEQ ID NO: 74, или консервативных вариантов; переменная область легкой цепи CDR2 содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 19, 22, 25, 49, 52, 55, 75, 78 и 81, предпочтительно SEQ ID NO: 19, более предпочтительно SEQ ID NO: 75, или консервативных вариантов; переменная область легкой цепи CDR3 содержит, предпочтительно состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 20, 23, 26, 50, 53, 56, 76, 79 и 82, предпочтительно SEQ ID NO: 20, более предпочтительно SEQ ID NO: 76, или ее консервативных вариантов; при этом указанный CD137-BD способен активировать передачу сигналов CD137 с дополнительной перекрестной сшивкой или без нее.

В одном варианте CD137-BD или мультиспецифическое антитело, содержащее указанный CD137-BD по изобретению, оптимизированный для экспрессии в клетке млекопитающего, имеет переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом одна или несколько таких последовательностей имеют указанные аминокислотные последовательности, образованные на основе CD137-BD, описанных в настоящем описании, или их консервативных модификаций, и при этом CD137-BD или мультиспецифическое антитело, содержащее указанный CD137-BD, сохраняют желаемые функциональные свойства CD137-BD по изобретению. Соответственно, в изобретении предложен CD137-BD или мультиспецифическое антитело, содержащее указанный CD137-BD по изобретению, оптимизированный для экспрессии в клетке млекопитающего, содержащий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 47, 71, 72 и 73, предпочтительно SEQ ID NO: 17, более предпочтительно SEQ ID NO: 71, и ее консервативных модификаций; переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 27, 28, 29, 30, 57, 83, 84 и 85, предпочтительно SEQ ID NO: 30, более предпочтительно SEQ ID NO: 83, и ее консервативных модификаций; при этом указанный CD137-BD способен активировать передачу сигналов CD137 с дополнительной перекрестной сшивкой или без нее.

При использовании в настоящем описании термин «оптимизированный» означает, что нуклеотидная последовательность была изменена для кодирования аминокислотной последовательности при помощи кодонов, которые являются предпочтительными в клетке-продуценте или организме, обычно в эукариотической клетке, например, клетке *Pichia*, клетке яичника китайского хомяка (CHO) или клетке человека. Оптимизированная

нуклеотидная последовательность сконструирована таким образом, чтобы она полностью или в максимально возможной степени сохранила аминокислотную последовательность, первоначально кодируемую исходной нуклеотидной последовательностью, которая также известна как «родительская» последовательность. В настоящем описании оптимизированные последовательности были сконструированы таким образом, чтобы включать в себя кодоны, которые предпочтительны в клетках млекопитающих. Однако в настоящем описании также предусмотрена оптимизированная экспрессия этих последовательностей в других эукариотических клетках или прокариотических клетках. Аминокислотные последовательности, кодируемые оптимизированными нуклеотидными последовательностями, также называют оптимизированными.

Еще одним типом модификации варибельной области является мутация аминокислотных остатков в областях CDR1, CDR2 и/или CDR3 VH и/или VL, что улучшает одно или несколько свойств связывания (например, аффинности) исследуемого антитела, известное как «созревание аффинности». Для введения мутации (мутаций) могут быть выполнены сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез, и влияние на связывание антител или другое исследуемое функциональное свойство может быть оценено в анализах *in vitro* или *in vivo* в порядке, описанном в настоящем описании и представленном в Примерах. Могут быть введены консервативные модификации (рассмотренные выше). Мутациями могут быть замены, добавления или делеции аминокислот. Кроме того, обычно изменяются не более одного, двух, трех, четырех или пяти остатков в области CDR.

Антитело «с созревшей аффинностью» или домен связывания представляет собой антитело или домен с одним или несколькими изменениями в одном или нескольких его варибельных доменах, которые приводят к улучшению аффинности антитела или домена связывания с антигеном по сравнению с родительским антителом или доменом связывания, в котором эти изменения отсутствуют. В одном варианте антитело с созревшей аффинностью или домен связывания обладают наномолярной или даже пикомолярной аффинностью к антигену-мишени. Антитела или домены с созревшей аффинностью получают способами, известными из уровня техники. Например, у Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992), описано созревание аффинности при помощи перетасовки доменов VH и VL. Случайный мутагенез гиперварибельной области (HVR) и/или каркасных остатков описан, например, у: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Jackson et al, *J. Immunol.* 154(7):3310- 9 (1995); и Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

В одном варианте CD137-BD по изобретению с «созревшей аффинностью» содержит VH4, содержащую мутации I44V; F89V; Y105F, в частности содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую мутацию A51P, в частности содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 28.

В еще одном варианте CD137-BD по изобретению с «созревшей аффинностью» содержит VH4, содержащую мутации V25A; I44V; V82K; F89V; Y105F, в частности содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 16, и VL, содержащую мутации I2L; A51P, в частности содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 29.

CD137-BD по изобретению может быть получен с использованием антитела или его домена связывания, имеющего одну или несколько последовательностей VH и/или VL, показанных в настоящем описании, в качестве исходного материала для конструирования модифицированного домена связывания, который может иметь свойства, измененные по сравнению с исходным доменом связывания. Домен связывания может быть сконструирован путем модификации одного или нескольких остатков в одной или обеих переменных областях (т.е. VH и/или VL), например, в одной или нескольких областях CDR и/или в одной или нескольких каркасных областях.

Одним из типов конструирования переменной области, который может быть выполнен, является трансплантация CDR. Антитела или их домены связывания взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно через аминокислотные остатки, которые расположены в шести определяющих комплементарность областях (CDR) тяжелой и легкой цепей. По этой причине аминокислотные последовательности в CDR более разнообразны в разных отдельных антителах или их доменах связывания, чем последовательности вне CDR. Так как последовательности CDR обеспечивают большинство взаимодействий антител с антигенами, можно экспрессировать рекомбинантные антитела или домены связывания, которые имитируют свойства специфических природных антител, путем конструирования векторов экспрессии, которые включают в себя последовательности CDR из специфического природного антитела, трансплантированного на каркасные последовательности из другого антитела с иными свойствами (см., например, Riechmann, L. et al., 1998 Nature 332:323-327; Jones, P. et al., 1986 Nature 321:522- 525; Queen, C. et al., 1989 Proc. Natl. Acad., U.S.A. 86: 10029-10033; U.S. Pat. No. 5,225,539 to Winter, and U.S. Pat. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 и 6,180,370 – Queen et al.).

Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных источников, которые включают в себя последовательности гена антитела зародышевых линий или переаранжированные последовательности антител. Например, последовательности ДНК зародышевых линий для генов варибельной области тяжелой и легкой цепи человека можно найти в базе данных последовательностей зародышевой линии человека VBase (доступна в Интернете по адресу www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), а также у Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al., 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798; and Cox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836; содержание каждого из которых прямо включено в настоящее описание путем ссылки. Например, последовательности ДНК зародышевых линий для генов варибельной области тяжелой и легкой цепи человека и переаранжированные последовательности антител можно найти в базе данных IMGT (доступна в Интернете по адресу www.imgt.org; см. Lefranc, M.P. et al., 1999 Nucleic Acids Res. 27:209-212; содержание каждого из которых прямо включено в настоящее описание путем ссылки).

Пример каркасных последовательностей для применения в CD137-BD по изобретению - каркасные последовательности, которые структурно аналогичны каркасным последовательностям, используемым в выбранных CD137-BD по изобретению. Последовательности CDR1, 2 и 3 VH и последовательности CDR1, 2 и 3 VL могут быть трансплантированы на каркасные области, последовательность которых совпадает с последовательностью, которая обнаружена в гене иммуноглобулина зародышевой линии, из которого получена каркасная последовательность, или последовательности CDR могут быть трансплантированы на каркасные области, которые содержат одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было обнаружено, что в некоторых случаях полезно осуществить мутацию остатков в каркасных областях для сохранения или усиления антигенсвязывающей способности антитела или его домена связывания (см., например, U.S. Pat. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen et al).

В соответствии с целью изобретения CD137-BD по изобретению выбирают из группы, состоящей из Fab, Fv, scFv, dsFv, scAb, STAB, однодоменного антитела (sdAb или dAb), однодоменного антитела с тяжелой цепью и однодоменного антитела с легкой цепью, VHH, VNAR, однодоменных антител на основе структуры VNAR акулы и доменов связывания, основанных на альтернативных каркасах, включая, помимо прочего, домены на основе анкирина, финомеры, авимеры, антикалины, фибронектины и сайты

связывания, встроенные в константные области антител (например, технология f-star (F-star Modular Antibody Technology™)).

В соответствии с целью изобретения CD137-BD по изобретению является фрагментом антитела scFv. Фрагменты «одноцепочечных Fv» или «scFv» или «sFv» антител содержат домены VH и VL антитела, при этом эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет sFv образовывать желаемую структуру для связывания с мишенью. Фрагменты «одноцепочечных Fv» или «scFv» антител содержат домены VH и VL антитела, при этом эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. Как правило, полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv образовывать желаемую структуру для связывания с мишенью (см., например, Plückthun, *The pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315).

В частных вариантах указанный CD137-BD представляет собой scFv, содержащий линкер согласно SEQ ID NO: 206.

В дополнительном варианте CD137-BD по изобретению представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), показанный в SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 58, предпочтительно SEQ ID NO: 34. В одном варианте CD137-BD по изобретению представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), показанный в SEQ ID NO: 32. В еще одном варианте CD137-BD по изобретению представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), показанный в SEQ ID NO: 33. В предпочтительном варианте CD137-BD по изобретению представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), показанный в SEQ ID NO: 34. В дополнительном предпочтительном варианте CD137-BD по изобретению представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), показанный в SEQ ID NO: 86, 87 или 88, предпочтительно SEQ ID NO: 86, более предпочтительно SEQ ID NO: 88.

Другой подходящий домен связывания CD137 для применения в мультиспецифическом антителе по настоящему изобретению содержит или происходит от антитела, выбранного из группы, состоящей из (i) урелумаба, (BMS-663513, полностью гуманизированного mAb IgG4; Bristol-Myers Squibb, описанного в WO 2004/010947, US 6,887,673 и US 7,214,493, которые полностью включены в настоящую заявку путем ссылки) и (ii) утомилумаба, (PF-05082566, полностью человеческого mAb IgG2; Pfizer,

описанного в WO 2012/032433 и US 8,821,867, которые полностью включены в настоящую заявку путем ссылки).

Мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один домен, связывающий PDL1 (PDL1-BD).

Термин «PDL1» относится, в частности, к PDL1 человека с идентификационным номером базы данных UniProt Q9NZQ7, воспроизведенному здесь как SEQ ID NO: 198. В соответствии с целью изобретения мишенью PDL1-BD по настоящему изобретению является PDL1, в частности PDL1 человека, указанный в базе данных UniProt под идентификационным номером Q9NZQ7, воспроизведенный здесь как SEQ ID NO: 198. В соответствии с целью изобретения антитела по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие PDL1 человека и *Macaca fascicularis* (*Супомолгус*) (яванского макака) – мишень для PDL1-BD, и предпочтительно не вступают в перекрестную реакцию с PDL1 домовой мыши (*Mus musculus*), PDL1-BD по настоящему изобретению специфически связывается с белком PDL1 человека.

PDL1-BD по настоящему изобретению является ингибитором PDL1. Термин «блокатор» или «блокирующее антитело», или «ингибитор», или «ингибирующее антитело», или «антагонист», или «антагонистическое антитело», или «блокирующий домен связывания», или «ингибирующий домен связывания», означает антитело или его домен связывания, который ингибирует или снижает биологическую активность антигена, с которым он связывается. В некоторых вариантах блокирующие антитела, или блокирующие домены связывания, или антагонистические антитела или антагонистические домены связывания, по существу, или полностью ингибируют биологическую активность антигена. PDL1-BD по настоящему изобретению нацеливается, уменьшает, ингибирует способность связывания PDL1 с его партнерами по связыванию, таким образом, препятствуя осуществлению функции PDL1. В частности, PDL1-BD по настоящему изобретению блокирует взаимодействие PDL1 с его рецептором, в частности с PD-1. В некоторых вариантах PDL1-BD по настоящему изобретению блокирует взаимодействие PDL1 с его рецептором или рецепторами, в частности с PD-1 и/или B7-1.

В некоторых вариантах PDL1-BD получают из моноклонального антитела или фрагмента антитела.

Подходящие PDL1-BD для применения в мультиспецифических антителах по настоящему изобретению представляют собой новые домены связывания, представленные в настоящем описании. Новые домены связывания PDL1 по настоящему изобретению включают в себя, помимо прочего, гуманизированные моноклональные антитела,

выделенные в порядке, описанном в настоящем описании, в том числе в Примерах. Примерами таких PDL1-BD являются антитела или их домены связывания, последовательности которых перечислены в таблице 2.

В соответствии с целью изобретения, PDL1-BD по настоящему изобретению специфически связывается с PDL1 и имеет один или несколько из следующих параметров:

- (i) связывается с PDL1 человека с константой диссоциации (KD) менее 10 нМ, в частности менее 5 нМ, в частности менее 1 нМ, в частности менее 500 пМ, более конкретно менее 100 пМ, предпочтительно менее 50 пМ, более предпочтительно менее 10 пМ, более предпочтительно 5 пМ, в частности при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv (одновалентную аффинность);
- (ii) связывается с человеческим PDL1 со скоростью K_{off} 10^{-3} с^{-1} или менее или 10^{-4} с^{-1} или менее, или 10^{-5} с^{-1} или менее при измерении с помощью SPR, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv;
- (iii) связывается с человеческим PDL1 со скоростью K_{on} по меньшей мере $10^3 \text{ M}^{-1}\text{с}^{-1}$ или более, по меньшей мере $10^4 \text{ M}^{-1}\text{с}^{-1}$ или более, по меньшей мере $10^5 \text{ M}^{-1}\text{с}^{-1}$ или более, по меньшей мере $10^6 \text{ M}^{-1}\text{с}^{-1}$ или более при измерении с помощью SPR, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv;
- (iv) перекрестно реактивен с PDL1 *Macaca fascicularis* (Сыномолгус), в частности связывается с PDL1 *Cynomolgus* с KD менее 10 нМ, менее 5 нМ, в частности менее 1 нМ, в частности менее 500 пМ, более конкретно менее 100 пМ, предпочтительно менее 10 пМ при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса;
- (v) не перекрестно реактивен с PDL1 *Mus musculus* (домовой мыши), в частности при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса и/или
- (vi) не связывается с PDL2 человека, в частности при измерении с помощью SPR.

В одном варианте PDL1-BD по настоящему изобретению имеет высокую аффинность к PDL1, например, к PDL1 человека. В подходящем варианте PDL1-BD по изобретению связывается с PDL1 человека с KD от 1 до 50 000 пМ, от 1 до 40 000 пМ, от 1 до 30 000 пМ, от 1 до 20 000 пМ, от 1 до 10 000 пМ, от 1 до 5 000 пМ, от 1 до 2 500 пМ, от 1 до 1 000 пМ, от 1 до 750 пМ, от 1 до 500 пМ, от 1 до 250 пМ, от 1 до 100 пМ, в частности

при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В подходящем варианте PDL1-BD по изобретению связывается с PDL1 человека с KD менее чем приблизительно 50 нМ, менее чем приблизительно 45 нМ, менее чем приблизительно 40 нМ, менее чем приблизительно 35 нМ, менее чем приблизительно 30 нМ, менее чем приблизительно 25 нМ, менее чем 20 нМ, менее чем приблизительно 15 нМ, менее чем приблизительно 10 нМ, менее чем приблизительно 9 нМ, менее чем приблизительно 8 нМ, менее чем приблизительно 7 нМ, менее чем приблизительно 6 нМ, менее чем приблизительно 5 нМ, менее чем приблизительно 4 нМ, менее чем приблизительно 3 нМ, менее чем 2 нМ, менее чем 1 нМ, менее чем 0,5 нМ, менее чем 0,25 нМ, менее чем 100 нМ, менее чем 10 пМ или менее чем 5 пМ, в частности при измерении с помощью SPR. В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению связывается с PDL1 человека с KD менее 1 нМ. В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению связывается с PDL1 человека с KD менее 0,5 нМ, в частности при измерении с помощью SPR. В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению связывается с PDL1 человека с KD менее 100 пМ, в частности при измерении с помощью SPR. В предпочтительном случае PDL1-BD по изобретению связывается с PDL1 человека с KD менее 10 пМ, в частности при измерении с помощью SPR. В более предпочтительном случае PDL1-BD по изобретению связывается с PDL1 человека с KD менее 5 пМ, в частности при измерении с помощью SPR.

В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению связывается с PDL1 человека со скоростью K_{on} по меньшей мере $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, по меньшей мере $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, по меньшей мере $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, по меньшей мере $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, по меньшей мере $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, по меньшей мере $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, по меньшей мере $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, по меньшей мере $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, по меньшей мере $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В предпочтительном случае PDL1-BD по изобретению связывается с PDL1 человека со скоростью K_{on} по меньшей мере $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше, в частности по меньшей мере $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или выше при измерении с помощью SPR, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv (одновалентную аффинность).

В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению связывается с PDL1 человека со скоростью K_{off} 10^{-3} s^{-1} или менее, $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ или менее, $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ или менее, 10^{-4} s^{-1} или менее, $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ или менее, 10^{-5} s^{-1} или менее, $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ или менее, 10^{-6} s^{-1} или менее, от 10^{-7} s^{-1} или менее при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В предпочтительном PDL1-BD по изобретению связывается с PDL1

человека со скоростью K_{off} 10^{-3} с^{-1} или менее, 10^{-4} с^{-1} или менее, в частности 10^{-5} с^{-1} или менее при измерении с помощью SPR.

В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по настоящему изобретению специфически связывается с PDL1 и имеет один или несколько из следующих параметров:

- (i) в случае формата scFv имеет температуру плавления (T_m), определенную с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии, по меньшей мере 55°C , например, по меньшей мере 60°C , предпочтительно по меньшей мере 65°C , более предпочтительно по меньшей мере 70°C , в частности в котором указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают в фосфатно-цитратном буфере при pH 6,4, 150 mM NaCl, в частности, в котором указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают в 50 mM фосфатно-цитратного буфера с 150 mM NaCl при pH 6,4;
- (ii) в случае формата scFv после пяти последовательных циклов замораживания-размораживания имеет потерю содержания мономера менее 5%, предпочтительно менее 3%, более предпочтительно менее 1%, когда антитело по изобретению находится в начальной концентрации 10 мг/мл, в частности, в котором указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент получают в 50 mM фосфатно-цитратного буфера с 150 mM NaCl при pH 6,4 и/или
- (iii) в случае формата scFv после хранения в течение по меньшей мере двух недель, в частности в течение по меньшей мере четырех недель, при 4°C имеет потерю содержания мономера менее чем 15%, например, менее 12%, менее 10%, менее 7%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2%, предпочтительно менее 1%, когда антитело по изобретению находится в начальной концентрации 10 мг/мл, и, в частности, в котором антитело по изобретению, например, указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, получают в 50 mM фосфатно-цитратного буфера с 150 mM NaCl при pH 6,4.

В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению содержит CDR VH, имеющей аминокислотную последовательность любой из CDR VH, перечисленных в таблице 2. В частности, PDL1-BD по изобретению содержит один, два, три или более VH CDR с аминокислотной последовательностью любой из CDR VH, перечисленных в таблице 2.

В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению содержит CDR VL с аминокислотной последовательностью любой из CDR VL, перечисленных в таблице 2. В частности, PDL1-BD по изобретению содержит один, два, три или более CDR VL с аминокислотной последовательностью любой из CDR VL, перечисленных в таблице 2.

Другие PDL1-BD по изобретению включают в себя аминокислоты, которые были мутированы, но которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичны/совпадают в областях CDR с областями CDR, указанными в последовательностях, описанных в таблице 2. Другие PDL1-BD по изобретению включают в себя мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были мутированы в областях CDR по сравнению с областями CDR, указанными в последовательности, описанной в таблице 2.

В настоящем изобретении предложен PDL1-BD, содержащий: (a) переменную область тяжелой цепи CDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 89, 92, 93, 96, 99, 119, 122, 123, 126 и 129, предпочтительно SEQ ID NO: 89 или 119, более предпочтительно SEQ ID NO: 89; (b) переменную область тяжелой цепи CDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 90, 94, 97, 100, 120, 124, 127 и 130, предпочтительно SEQ ID NO: 90 или 120, более предпочтительно SEQ ID NO: 90; (c) переменную область тяжелой цепи CDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 91, 95, 98, 101, 121, 125, 128 и 131, предпочтительно SEQ ID NO: 91 или 121, более предпочтительно SEQ ID NO: 91; (d) переменную область легкой цепи CDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 105, 108, 111, 135, 138 и 141, предпочтительно SEQ ID NO: 105 или 135, более предпочтительно SEQ ID NO: 105; (e) переменную область легкой цепи CDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 106, 109, 112, 136, 139 и 142, предпочтительно SEQ ID NO: 106 или 136, более предпочтительно SEQ ID NO: 106 и (f) переменную область легкой цепи CDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 107, 110, 113, 137, 140 и 143, предпочтительно SEQ ID NO: 107 или 137, более предпочтительно SEQ ID NO: 107.

В соответствии с целью изобретения выделенное антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (a) переменную область тяжелой цепи CDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью любой из SEQ ID NO: 89, 92, 93, 96, 99, 119, 122, 123, 126 и 129, предпочтительно SEQ ID NO: 89 или 119, более предпочтительно SEQ ID NO: 89; (b) переменную область тяжелой цепи CDR1, содержащую, предпочтительно

состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью любой из SEQ ID NO: 90, 94, 97, 100, 120, 124, 127 и 130, предпочтительно SEQ ID NO: 90 или 120, более предпочтительно SEQ ID NO: 90; (с) переменную область тяжелой цепи CDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью любой из SEQ ID NO: 91, 95, 98, 101, 121, 125, 128 и 131, предпочтительно SEQ ID NO: 91 или 121, более предпочтительно SEQ ID NO: 91; (d) переменную область легкой цепи CDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью любой из SEQ ID NO: 105, 108, 111, 135, 138 и 141, предпочтительно SEQ ID NO: 105 или 135, более предпочтительно SEQ ID NO: 105; (e) переменную область легкой цепи CDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью любой из SEQ ID NO: 106, 109, 112, 136, 139 и 142, предпочтительно SEQ ID NO: 106 или 136, более предпочтительно SEQ ID NO: 106 и (f) переменную область легкой цепи CDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью любой из SEQ ID NO: 107, 110, 113, 137, 140 и 143, предпочтительно SEQ ID NO: 107 или 137, более предпочтительно SEQ ID NO: 107.

В одном варианте PDL1-BD по изобретению содержит: (a) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 105, 106 и 107, соответственно; (b) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 92, 94 и 95, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 108, 109 и 110, соответственно; (с) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 93, 94 и 95, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 108, 109 и 110, соответственно; (d) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 96, 97 и 98, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 105, 106 и 107, соответственно; (e) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 99, 100 и 101, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 111, 112 и 113, соответственно; (f) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 119, 120 и 121, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и

LCDR3 SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно; (g) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 122, 124 и 125, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 138, 139 и 140, соответственно; (h) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 123, 124 и 125, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 138, 139 и 140, соответственно; (i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 126, 127 и 128, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно; (j) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 129, 130, и 131, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 141, 142 и 143, соответственно. В одном варианте PDL1-BD по изобретению содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 105, 106 и 107, соответственно. В еще одном варианте PDL1-BD по изобретению содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 119, 120 и 121, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно.

В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению содержит: (a) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностью SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 105, 106 и 107, соответственно; (b) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 92, 94 и 95, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 108, 109 и 110, соответственно; (c) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 93, 94 и 95, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 108, 109 и 110, соответственно; (d)

99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно; (j) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 129, 130 и 131, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 141, 142 и 143, соответственно. В одном варианте PDL1-BD по изобретению содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 105, 106 и 107, соответственно. В еще одном варианте PDL1-BD по изобретению содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 119, 120 и 121, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно.

В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению содержит: (a) HCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 89; (b) HCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 90; (c) HCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 91; (d) LCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 105; (e) LCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 106 и (f) LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107. В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению содержит: (a) HCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 89; (b) HCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70,

80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 90; (c) HCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 91; (d) LCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 105; (e) LCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 106 и (f) LCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 107.

В дополнительном варианте PDL1-BD по изобретению содержит: (a) HCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 92 или SEQ ID NO: 93; (b) HCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 94; (c) HCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 95; (d) LCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 108; (e) LCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 109 и (f) LCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 110. В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению содержит: (a) HCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 92 или SEQ ID NO: 93; (b) HCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 94; (c) HCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 95; (d) LCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 108; (e) LCDR2, содержащую, предпочтительно

состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 109 и (f) LCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 110.

В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению содержит: (a) HCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 119; (b) HCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 120; (c) HCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 121; (d) LCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 135; (e) LCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 136 и (f) LCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 137. В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению содержит: (a) HCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 119; (b) HCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 120; (c) HCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 121; (d) LCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 135; (e) LCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 136 и (f) LCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 137.

В дополнительном варианте PDL1-BD по изобретению содержит: (a) HCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 122 или SEQ ID NO: 123; (b) HCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую

из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 124; (c) HCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 125; (d) LCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 138; (e) LCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 139 и (f) LCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 140. В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению содержит: (a) HCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 122 или SEQ ID NO: 123; (b) HCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 124; (c) HCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 125; (d) LCDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 138; (e) LCDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 139 и (f) LCDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью SEQ ID NO: 140.

В дополнительном варианте в настоящем изобретении предложен PDL1-BD, который специфически связывается с PDL1 (например, белком PDL1 человека), при этом указанный домен связывания содержит домен VH и домен VL.

В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по настоящему изобретению содержит VH1A, VH1B, VH3 или VH4. В одном варианте PDL1-BD по настоящему изобретению содержит домен VH3. В одном варианте PDL1-BD по настоящему изобретению содержит домен VH4. В еще одном варианте PDL1-BD по настоящему изобретению содержит домен VH1A или VH1B.

Конкретный пример VH, принадлежащего семейству VH1, представлен под SEQ ID NO: 103. В частности, каркасные области FR1-FR4, взятые из SEQ ID NO: 103, принадлежат к семейству VH1 (таблица 1, области, указанные “нежирным” шрифтом). В

соответствии с целью изобретения при использовании в настоящем описании VH, принадлежащий к семейству VH1, представляет собой VH, содержащий FR1-FR4, последовательность которых по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% совпадает с последовательностями FR1-FR4 SEQ ID NO: 103.

Конкретный пример VH, принадлежащего семейству VH3, представлен под SEQ ID NO: 104. В частности, каркасные области FR1-FR4, взятые из SEQ ID NO: 104, принадлежат к семейству VH3 (таблица 2, области, указанные “нежирным” шрифтом). В соответствии с целью изобретения при использовании в настоящем описании VH, принадлежащий к семейству VH3, представляет собой VH, содержащий FR1-FR4, последовательность которых по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% совпадает с последовательностями FR1-FR4 SEQ ID NO: 104.

Конкретный пример VH, принадлежащего семейству VH4, представлен под SEQ ID NO: 102. В частности, каркасные области FR1-FR4, взятые из SEQ ID NO: 102, принадлежат к семейству VH4 (таблица 2, области, указанные “нежирным” шрифтом). В соответствии с целью изобретения при использовании в настоящем описании VH, принадлежащий к семейству VH4, представляет собой VH, содержащий FR1-FR4, последовательность которых по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95% совпадает с последовательностями FR1-FR4 SEQ ID NO: 102.

В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по настоящему изобретению содержит каркасы V_к FR1, FR2 и FR3, в частности каркасы V_{к1} или V_{к3}, предпочтительно каркасы V_{к1} FR1-FR3, и каркас FR4, который выбран из V_к FR4, в частности V_{к1} FR4, V_{к3} FR4 и V_λ FR4. Подходящие каркасы V_{к1} FR1- FR3 указаны в SEQ ID NO: 114 (таблица 2, области FR указаны “нежирным” шрифтом). Подходящие каркасы V_{к1} FR1-3 содержат аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадают с аминокислотными последовательностями, соответствующими FR1-3 и взятыми из SEQ ID NO: 114 (таблица 2, области FR указаны “нежирным” шрифтом). Подходящие V_λ FR4 указаны в SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205. В одном варианте PDL1-BD по настоящему изобретению содержит V_λ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадает с содержащейся аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205.

Таким образом, в одном варианте PDL1-BD по настоящему изобретению содержит:

- (i) последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 LCDR3:
 - а. последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 92, 94 и 95, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 108, 109 и 110, соответственно;
 - б. последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 122, 124 и 125, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 138, 139 и 140, соответственно, или
 - с. последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 123, 124 и 125, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 138, 139 и 140, соответственно;
- (ii) домен VH3 или VH4, предпочтительно домен VH4, и
- (iii) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасы V_к FR1, FR2 и FR3, в частности V_{к1} или V_{к3} FR1-FR3, предпочтительно V_{к1} FR1-FR3, и каркас FR4, который выбран из V_к FR4, в частности V_{к1} FR4, V_{к3} FR4, и V_λ FR4, в частности V_λ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, предпочтительно V_λ FR4, указанный в SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, более предпочтительно V_λ FR4, указанный в SEQ ID NO: 199.

В еще одном варианте PDL1-BD по настоящему изобретению содержит:

- (i) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 с: SEQ ID NO: 93, 94 и 95, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 108, 109 и 110, соответственно;
- (ii) домен VH1A, VH1B, VH3 или VH4, предпочтительно домен VH1A или VH1B и
- (iii) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасы V_к FR1, FR2 и FR3, в частности V_{к1} или V_{к3} FR1-FR3, предпочтительно V_{к1} FR1-FR3, и каркас FR4, который выбран из V_к FR4, в частности V_{к1} FR4, V_{к3} FR4, и V_λ FR4, предпочтительно V_λ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, предпочтительно V_λ FR4, содержащий аминокислотную последовательность,

выбранную из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, более предпочтительно Vλ FR4, указанный в SEQ ID NO: 199.

В частном варианте PDL1-BD по настоящему изобретению содержит:

- (i) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 с: SEQ ID NO: 119, 120 и 121, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно;
- (ii) домен VH3 или VH4, предпочтительно домен VH4 и
- (iii) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасы Vκ FR1, FR2 и FR3, в частности Vκ1 или Vκ3 FR1-FR3, предпочтительно Vκ1 FR1-FR3, и каркас FR4, который выбран из Vκ FR4, в частности Vκ1 FR4, Vκ3 FR4, и Vλ FR4, предпочтительно Vλ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, предпочтительно Vλ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, более предпочтительно Vλ FR4, указанный в SEQ ID NO: 199.

В предпочтительном варианте PDL1-BD по настоящему изобретению содержит:

- (i) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 105, 106 и 107, соответственно;
- (ii) каркасные последовательности доменов VH3 или VH4 FR1-FR4; предпочтительно каркасные последовательности домена VH3 FR1-FR4 и
- (iii) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасы Vκ FR1, FR2 и FR3, в частности Vκ1 или Vκ3 FR1-FR3, предпочтительно Vκ1 FR1-FR3, и каркас FR4, который выбран из Vκ FR4, в частности Vκ1 FR4, Vκ3 FR4, и Vλ FR4, предпочтительно Vλ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, предпочтительно Vλ FR4, указанный в SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, более предпочтительно Vλ FR4, указанный в SEQ ID NO: 199.

В одном варианте PDL1-BD по настоящему изобретению содержит VL, содержащий:

- (i) домены CDR: CDR1, CDR2 and CDR3;
- (ii) каркасные области Vκ человека FR1-FR3, в частности каркасные области Vκ1 человека FR1-FR3;

- (iii) FR4, который выбран из (а) последовательности зародышевой линии V λ человека для FR4, в частности последовательности зародышевой линии V λ , выбранной из списка: SEQ ID NO: 199-205, предпочтительно V λ FR4, указанный в SEQ ID NO: 199, и (б) последовательность на основе V λ , которая имеет одну или две мутации, в частности одну мутацию, по сравнению с самой близкой последовательностью зародышевой линии V λ человека для FR4, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, предпочтительно SEQ ID NO: 199.

PDL1-BD по изобретению содержит домен VH, указанный в таблице 2. В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению содержит аминокислотную последовательность VH, указанную в таблице 2, в которой произошла мутация не более чем около 10 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) (при этом мутацией является, в качестве различных не ограничивающих примеров, добавление, замена или делеция). В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению содержит аминокислотную последовательность VH, указанную в таблице 2, в которой произошла мутация не более чем около 20 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) (при этом мутацией является, в качестве различных не ограничивающих примеров, добавление, замена или делеция). Другие PDL1-BD по изобретению включают в себя аминокислоты, которые были мутированы, но которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичны/совпадают в областях VH с областями VH, указанными в последовательностях, описанных в таблице 2.

PDL1-BD по изобретению содержит домен VL, указанный в таблице 2. В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению содержит аминокислотную последовательность VL, указанную в таблице 2, в которой произошла мутация не более чем около 10 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) (при этом мутацией является, в качестве различных не ограничивающих примеров, добавление, замена или делеция). В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению содержит аминокислотную последовательность VL, указанную в таблице 2, в которой произошла мутация не более чем около 20 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) (при этом мутацией является, в качестве различных не ограничивающих примеров, добавление, замена или делеция). Другие PDL1-BD по изобретению включают в себя аминокислоты, которые были мутированы, но

которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичны/совпадают в областях VL с областями VL, указанными в последовательностях, описанных в таблице 2.

В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, предпочтительно по меньшей мере на 90 процентов, совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 102, 103, 104, 132, 133 и 134, предпочтительно SEQ ID NO: 102 или 104, более предпочтительно SEQ ID NO: 104, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, предпочтительно по меньшей мере на 90 процентов, совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114, 115, 144 и 145, предпочтительно SEQ ID NO: 114 или 115, более предпочтительно SEQ ID NO: 115.

В одном варианте PDL1-BD по изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 102, 103, 104, 132, 133 и 134, предпочтительно SEQ ID NO: 102 или 104, более предпочтительно SEQ ID NO: 104, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 114, 115, 144 и 145, предпочтительно SEQ ID NO: 114 или 115, более предпочтительно SEQ ID NO: 115.

В дополнительном варианте PDL1-BD по изобретению содержит: (a) последовательность VH SEQ ID NO: 102 и последовательность VL SEQ ID NO: 114; (b) последовательность VH SEQ ID NO: 103 и последовательность VL SEQ ID NO: 114; (c) последовательность VH SEQ ID NO: 104 и последовательность VL SEQ ID NO: 115; (d) последовательность VH SEQ ID NO: 132 и последовательность VL SEQ ID NO: 144; (e) последовательность VH SEQ ID NO: 133 и последовательность VL SEQ ID NO: 145 или (f) последовательность VH SEQ ID NO: 134 и последовательность VL SEQ ID NO: 144. В предпочтительном варианте PDL1-BD по изобретению содержит последовательность VH SEQ ID NO: 102 и последовательность VL SEQ ID NO: 114. В более предпочтительном варианте PDL1-BD по изобретению содержит последовательность VH SEQ ID NO: 104 и последовательность VL SEQ ID NO: 115.

В одном варианте PDL1-BD по настоящему изобретению содержит:

(a) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 92, 94 и 95, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 108, 109 и 110, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 102, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 114;

(b) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 с: SEQ ID NO: 93, 94 и 95, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 108, 109 и 110, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 103, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 114;

(c) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 с: SEQ ID NO: 92, 93 и 94, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 108, 109 и 110, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 104, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 115, предпочтительно, в котором указанная VH содержит мутации G56A и Y105F (нумерация АНо), и указанная VL содержит мутации S9A и A51P (нумерация АНо);

(d) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 122, 124 и 125, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 138, 139 и 140, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 132, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 144;

(e) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 123, 124 и 125, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 138, 139 и 140, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 133, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 145, предпочтительно, в котором указанная VH содержит мутации V2S, V25A, I44V, G56A, V82K, F89V и Y105F (нумерация АНо), и указанная VL содержит мутации I2F, M4L и A51P (нумерация АНо)
или

(f) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 122, 124 и 125, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 138, 139 и 140, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 134, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 144, предпочтительно в котором указанная VH содержит мутации V25A, I44V, G56A, V82K и F89V (нумерация АНю).

В одном варианте PDL1-BD по настоящему изобретению содержит:

(a) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO 105, 106 и 107, соответственно, при этом последовательность VH по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 102, и последовательность VL по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 114;

(b) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 с: SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 105, 106 и 107, соответственно, при этом последовательность VH по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 103, и последовательность VL по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 114;

(c) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 с: SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 105, 106 и 107, соответственно, при этом последовательность VH по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 104, и последовательность VL по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 115, предпочтительно где указанный VH содержит мутации G56A и Y105F (нумерация АНю), и указанный VL содержит мутации S9A и A51P (нумерация АНю);

(d) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 119, 120 и 121, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 132, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 144;

(e) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 119, 120 и 121, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 133, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 145, предпочтительно где указанный VH содержит мутации V2S, V25A, I44V, G56A, V82K, F89V и Y105F (нумерация АНо), и указанный VL содержит мутации I2F, M4L и A51P (нумерация АНо) или

(f) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 119, 120 и 121, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 134, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 144, предпочтительно где указанный VH содержит мутации V25A, I44V, G56A, V82K и F89V (нумерация АНо).

В предпочтительном варианте PDL1-BD по настоящему изобретению содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 105, 106 и 107, соответственно, при этом последовательность VH по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с SEQ ID NO: 104, и последовательность VL по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 115, предпочтительно где указанный VH содержит мутации G56A и Y105F (нумерация АНо), и указанный VL содержит мутации S9A и A51P (нумерация АНо).

В одном варианте PDL1-BD, который специфически связывается с PDL1, представляет собой домен связывания, который описан в таблице 2. В одном варианте PDL1-BD по изобретению, который специфически связывается с PDL1, указан в SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147 или SEQ ID NO: 148. В одном варианте PDL1-BD по изобретению, который специфически связывается с PDL1, указан в SEQ ID NO: 116 или SEQ ID NO: 117 или SEQ ID NO: 118, предпочтительно SEQ ID NO: 116, более предпочтительно SEQ ID NO: 118. В одном варианте PDL1-BD по изобретению, который специфически связывается с PDL1, указан в SEQ ID NO: 146 или SEQ ID NO: 147 или SEQ ID NO: 148, предпочтительно SEQ ID NO: 146, более предпочтительно SEQ ID NO: 148.

Другие PDL1-BD по изобретению включают в себя те, в которых аминокислоты или нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислоты, мутированы, но по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 или 95 процентов совпадают с последовательностями, описанными в таблице 2. В одном варианте он включает в себя мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были мутированы в переменных областях по сравнению с переменными областями, указанными в последовательности, описанной в таблице 2, при этом они сохраняют, по существу, ту же самую активность. При использовании в настоящем описании термин «по существу та же самая активность» означает указанную активность, которая, по существу, составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или даже по меньшей мере 100% или по меньшей мере 110%, или по меньшей мере 120%, или по меньшей мере 130%, или по меньшей мере 140%, или по меньшей мере 150%, или по меньшей мере 160%, или по меньшей мере 170% или по меньшей мере 180% или по меньшей мере 190%, например, до 200% от активности, определенной для родительского PDL1-BD, в частности для PDL1-BD по изобретению, описанного в таблице 2.

С учетом того, что каждый из этих доменов связывания может связываться с PDL1 и что антигенсвязывающая специфичность обеспечивается в основном областями CDR1, 2 и 3, последовательности CDR1 VH, 2 и 3, и последовательности CDR1 VL, 2 и 3 могут быть «смешаны и подобраны». Такие «смешанные и подобранные» PDL1-BD могут быть протестированы при помощи анализов связывания, известных из уровня техники и описанных в примерах (например, иммуносорбентного ферментного анализа). Когда последовательности CDR VH смешаны и подобраны, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из определенной последовательности VH должна быть заменена структурно аналогичной последовательностью (последовательностями) CDR. Аналогичным образом, когда последовательности CDR VL смешаны и подобраны, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из определенной последовательности VL должна быть заменена структурно аналогичной последовательностью (последовательностями) CDR.

В еще одном варианте PDL1-BD по изобретению содержит аминокислотные последовательности, которые гомологичны последовательностям, описанным в таблице 2, и указанный домен связывания BD связывается с PDL1 и сохраняет желательные функциональные свойства этих антител, описанных в таблице 2.

Например, в изобретении предложен PDL1-BD, который содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по

меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 102, 103, 104, 132, 133 и 134, предпочтительно SEQ ID NO: 102 или 104, более предпочтительно SEQ ID NO: 104, переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 114, 115, 144 и 145, предпочтительно SEQ ID NO: 114 или 115, более предпочтительно SEQ ID NO: 115.

В одном варианте аминокислотные последовательности VH и/или VL могут на 50 процентов, 60 процентов, 70 процентов, 80 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 96 процентов, 97 процентов, 98 процентов или 99 процентов совпадать с последовательностями, приведенными в таблице 2. В одном варианте аминокислотные последовательности VH и/или VL могут совпадать за исключением аминокислотного замещения не более чем в 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных положениях.

В одном варианте в изобретении предложен PDL1-BD, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, при этом одна или несколько из этих последовательностей CDR имеют указанные аминокислотные последовательности на основе PDL1-BD, описанных в настоящем документе, или их консервативных модификаций, и при этом PDL1-BD сохраняет желаемые функциональные свойства PDL1-BD по изобретению.

Соответственно, в изобретении предложен PDL1-BD, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, в котором переменная область тяжелой цепи CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 89, 92, 93, 96, 99, 119, 122, 123, 126 и 129, предпочтительно SEQ ID NO: 89 или 119, более предпочтительно SEQ ID NO: 89, или ее консервативных вариантов; переменная область тяжелой цепи CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 90, 94, 97, 100, 120, 124, 127 и 130, предпочтительно SEQ ID NO: 90 или 120, более предпочтительно SEQ ID NO: 90, или ее консервативных вариантов; переменная область тяжелой цепи CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 91, 95, 98, 101, 121, 125, 128 и 131, предпочтительно SEQ ID NO: 91 или 121, более предпочтительно SEQ ID NO: 91, или ее консервативных вариантов;

вариабельная область легкой цепи CDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 105, 108, 111, 135, 138 и 141, предпочтительно SEQ ID NO: 105 или 135, более предпочтительно SEQ ID NO: 105, или ее консервативные варианты; вариабельная область легкой цепи CDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 106, 109, 112, 136, 139 и 142, предпочтительно SEQ ID NO: 106 или 136, более предпочтительно SEQ ID NO: 106, или консервативных вариантов; вариабельная область легкой цепи CDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 107, 110, 113, 137, 140 и 143, предпочтительно SEQ ID NO: 107 или 137, более предпочтительно SEQ ID NO: 107, или их консервативных вариантов; при этом PDL1-BD специфически связывается с PDL1 и способно блокировать взаимодействие PD-1/PDL1.

В одном варианте PDL1-BD по изобретению оптимизирован для экспрессии в клетке млекопитающего, имеет вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом одна или несколько таких последовательностей имеют указанные аминокислотные последовательности, образованные на основании доменов связывания, описанных в настоящем описании, или их консервативных, при этом домены связывания сохраняют желаемые функциональные свойства PDL1-BD по изобретению. Соответственно, в изобретении предложен PDL1-BD, оптимизированный для экспрессии в клетке млекопитающего, содержащий вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 102, 103, 104, 132, 133 и 134, предпочтительно SEQ ID NO: 102 или 104, более предпочтительно SEQ ID NO: 104, и ее консервативных модификаций; вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 114, 115, 144 и 145, предпочтительно SEQ ID NO: 114 или 115, более предпочтительно SEQ ID NO: 115, и их консервативных модификаций; при этом PDL1-BD специфически связывается с PDL1 и способен блокировать взаимодействие PD-1/PDL1.

В одном варианте PDL1-BD по изобретению содержит VH3, содержащий мутации G56A и Y105F, в частности содержащий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 104, и предпочтительно VL, содержащий мутации S9A; A51P, в частности содержащий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 115.

В еще одном варианте PDL1-BD по изобретению с «созревшей аффинностью» содержит VH4, содержащий мутации V25A; I44V; G56A; V82K; F89V, в частности содержащий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 134, и

предпочтительно VL, содержащий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 144. В дополнительном варианте PDL1-BD по изобретению с «созревшей аффинностью» содержит VH4, содержащий мутации V2S; V25A; I44V; G56A; V82K; F89V; Y105F, в частности содержащий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 133, и VL, содержащий мутации I2F; M4L; A51P, в частности содержащий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 145.

Кроме того, PDL1-BD по изобретению дополнительно может быть получен с использованием антитела или его домена связывания, имеющего одну или несколько последовательностей VH и/или VL, показанных в настоящем описании, в качестве исходного материала для конструирования модифицированного домена связывания, и такой модифицированный домен связывания может иметь свойства, измененные по сравнению с исходным антителом или доменом связывания. Домен связывания может быть сконструирован путём модификации одного или нескольких остатков в пределах одной или обеих переменных областей (т.е. VH и/или VL), например, в одной или нескольких областях CDR и/или в одной или нескольких каркасных областях.

В соответствии с целью изобретения, PDL1-BD по изобретению выбран из группы, состоящей из: Fab, Fv, scFv, dsFv, scAb, STAB и домены связывания, основанные на альтернативных каркасах, включая, помимо прочего, домены на основе анкирина, финомеры, авимеры, антикалины, фибронектины и сайты связывания, встроенные в константные области антител (например, при помощи технологии f-star (F-star's Modular Antibody Technology™)).

В соответствии с целью изобретения PDL1-BD по изобретению является фрагментом антитела scFv. В частных вариантах указанный PDL1-BD представляет собой scFv, содержащий линкер согласно SEQ ID NO: 206.

В дополнительном варианте PDL1-BD по изобретению представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), показанный в SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147 и SEQ ID NO: 148. В одном варианте PDL1-BD по изобретению представляет собой scFv, показанный в SEQ ID NO: 116 или SEQ ID NO: 117 или SEQ ID NO: 118, предпочтительно SEQ ID NO: 116 или 118, более предпочтительно SEQ ID NO: 118. В одном варианте PDL1-BD по изобретению представляет собой scFv, показанный в SEQ ID NO: 146 или SEQ ID NO: 147 или SEQ ID NO: 148, предпочтительно SEQ ID NO: 147 или 148, более предпочтительно SEQ ID NO: 148.

Другие подходящие PDL1-BD содержат или получены из антитела, выбранного из группы, состоящей из: (i) авелумаба (MSB0010718C; моноклонального антитела IgG1

человека к PDL1; Merck-Serono; описанного в WO 2013/079174, который полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки); (ii) атезолизумаба (MPDL3280A, RG7446; моноклонального антитела IgG человека к PDL1; Hoffmann-La Roche); (iii) MDX-1105 (BMS-936559; моноклонального антитела IgG4 человека к PDL1; Bristol-Myers Squibb; описанного в WO 2007/005874, который полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки); (iv) дурвалумаба (MEDI4736; гуманизированного моноклонального антитела IgG1 к PDL1; AstraZeneca; описанного в WO 2011/066389 и US 2013/034559, которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки); (v) KN035 (моноклонального антитела к PDL1; 3D Medicines); (vi) LY3300054 (моноклонального антитела к PDL1; Eli Lilly); и (vii) YW243.55.S70 (описанного в WO 2010/077634 и патенте США № 8217149, каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки).

Авторы изобретения также неожиданно обнаружили, что при определенных соотношениях между аффинностями или авидностями CD137-BD и PDL1-BD интервал концентрации максимальной активности расширяется, что, по прогнозам, будет полезным для терапевтического применения и обеспечит более высокую гибкость при дозировании мультиспецифического антитела по изобретению или фармацевтических композиций, содержащих его. Таким образом, в одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один CD137-BD и по меньшей мере один PDL1-BD, при этом аффинность указанного CD137-BD слабее аффинности указанного PDL1-BD по меньшей мере в 5,0 раз, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз, например, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 200 раз, по меньшей мере в 300 раз, по меньшей мере в 400 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 500 раз, например, по меньшей мере в 600 раз, по меньшей мере в 700 раз, по меньшей мере в 800 раз, по меньшей мере в 900 раз, по меньшей мере 1000, в частности при измерении с помощью SPR. Иначе говоря, мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один CD137-BD и по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный CD137-BD связывается с CD137 человека с константой диссоциации (KD), которая по меньшей мере в 5,0 раз, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз, например, по меньшей мере в 50, по меньшей мере в 100, по меньшей мере в 200, по меньшей мере в 300, по меньшей мере в 400, более предпочтительно по меньшей мере в 500 раз, например, по меньшей мере в 600, по меньшей мере в 700, по меньшей мере в 800, по меньшей мере в 900, по меньшей мере в 1000 раз выше константы диссоциации (KD) связывания с PDL1 человека указанного PDL1-BD, в частности, при измерении с помощью SPR. Таким образом, в соответствии с целью изобретения мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит

по меньшей мере один CD137-BD и по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный CD137-BD связывается с CD137 человека с константой диссоциации (KD), которая выше константы диссоциации (KD) связывания PDL1 человека указанного PDL1-BD в 5-1000 раз, например, в 10 -1000 раз, предпочтительно в 50 -1000 раз, более предпочтительно в 100 -1000 раз, например, в 200 -1000 раз, в 300 -1000 раз, в 400 -1000 раз, в 500 -1000 раз, в 600 -1000 раз, в 700 -1000 раз, в 800 -1000 раз, в 900 -1000 раз, в частности при измерении с помощью SPR. В дополнительном варианте указанный CD137-BD связывается с CD137 человека с константой диссоциации (KD) от 10 нМ до 10 пМ, предпочтительно от 10 нМ до 0,1 нМ, например, от 5 нМ до 0,1 нМ, более предпочтительно от 5 нМ до 1 нМ, в частности, при этом указанный PDL1-BD связывается с PDL1 человека с константой диссоциации (KD) от 1 нМ до 1 пМ, предпочтительно от 0,5 нМ до 1 пМ, более предпочтительно от 100 пМ до 1 пМ, в частности, при измерении с помощью SPR. В еще одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один CD137-BD и по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный CD137-BD имеет avidность, которая слабее (ниже) avidности указанного PDL1-BD по меньшей мере в 5,0 раз, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз, например, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 200 раз, по меньшей мере в 300 раз, по меньшей мере в 400 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 500 раз, например, по меньшей мере в 600 раз, по меньшей мере в 700 раз, по меньшей мере в 800 раз, по меньшей мере в 900 раз, по меньшей мере в 1000.

В одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один CD137-BD и по меньшей мере один PDL1-BD, при этом аффинность указанного PDL1-BD сильнее аффинности указанного CD137-BD по меньшей мере в 5,0 раз, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз, например, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 200 раз, по меньшей мере в 300 раз, по меньшей мере в 400 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 500 раз, например, по меньшей мере в 600 раз, по меньшей мере в 700 раз, по меньшей мере в 800 раз, по меньшей мере в 900 раз, по меньшей мере в 1000, в частности, при измерении с помощью SPR. В одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один CD137-BD и по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD связывается с PDL1 человека с константой диссоциации (KD), которая ниже константы диссоциации (KD) связывания с CD137 человека указанного CD137-BD по меньшей мере в 5,0 раз, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз, например, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 200

раз, по меньшей мере в 300 раз, по меньшей мере в 400 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 500 раз, например, по меньшей мере в 600 раз, по меньшей мере в 700 раз, по меньшей мере в 800 раз, по меньшей мере в 900 раз, по меньшей мере 1000, в частности, при измерении с помощью SPR. В еще одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один CD137-BD и по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD имеет avidность, которая сильнее (выше) avidности указанного CD137-BD по меньшей мере в 5,0 раз, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз, например, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 200 раз, по меньшей мере в 300 раз, по меньшей мере в 400 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 500 раз, например, по меньшей мере в 600 раз, по меньшей мере в 700 раз, по меньшей мере в 800 раз, по меньшей мере в 900 раз, по меньшей мере 1000, в частности, при измерении с помощью SPR.

В одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: (i) по меньшей мере один CD137-BD, при этом указанный CD137-BD содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31 или 34, предпочтительно SEQ ID NO: 34, и (ii) по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из списка, состоящего из SEQ ID NO: 116, 117, 118, 146, 147 и 148, предпочтительно SEQ ID NO: 116 или 118, более предпочтительно SEQ ID NO: 118. В дополнительном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: (i) по меньшей мере один CD137-BD, при этом указанный CD137-BD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 или 34, предпочтительно SEQ ID NO: 34, и (ii) по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из списка, состоящего из SEQ ID NO: 116, 117, 118, 146, 147 и 148, предпочтительно SEQ ID NO: 116 или 118, более предпочтительно SEQ ID NO: 118. В одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: (i) по меньшей мере один CD137-BD, при этом указанный CD137-BD представляет собой scFv, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 31 или 34,

предпочтительно SEQ ID NO: 34, и (ii) по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD представляет собой scFv, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из списка, состоящего из SEQ ID NO: 116, 117, 118, 146, 147 и 148, предпочтительно SEQ ID NO: 116 или 118, более предпочтительно SEQ ID NO: 118. В дополнительном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: (i) по меньшей мере один CD137-BD, при этом указанный CD137-BD представляет собой scFv, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31 или 34, предпочтительно SEQ ID NO: 34, и (ii) по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD представляет собой scFv, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из списка, состоящего из SEQ ID NO: 116, 117, 118, 146, 147 и 148, предпочтительно SEQ ID NO: 116 или 118, более предпочтительно SEQ ID NO: 118.

В одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: (i) по меньшей мере один CD137-BD, при этом указанный CD137-BD содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32, и (ii) по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из списка, состоящего из SEQ ID NO: 116, 117, 118, 146, 147 и 148, предпочтительно SEQ ID NO: 118. В дополнительном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: (i) по меньшей мере один CD137-BD, при этом указанный CD137-BD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, и (ii) по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из списка, состоящего из SEQ ID NO: 116, 117, 118, 146, 147 и 148, предпочтительно SEQ ID NO: 118. В одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: (i) по меньшей мере один CD137-BD, при этом указанный CD137-BD представляет собой Fv, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32, и (ii) по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD представляет собой Fv, содержащий

аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из списка, состоящего из SEQ ID NO: 116, 117, 118, 146, 147 и 148, предпочтительно SEQ ID NO: 118. В дополнительном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: (i) по меньшей мере один CD137-BD, при этом указанный CD137-BD представляет собой Fv, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, и (ii) по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD представляет собой Fv, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из списка, состоящего из SEQ ID NO: 116, 117, 118, 146, 147 и 148, предпочтительно SEQ ID NO: 118.

В одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: (i) по меньшей мере один CD137-BD, при этом указанный CD137-BD содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 33, и (ii) по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из списка, состоящего из SEQ ID NO: 116, 117, 118, 146, 147 и 148, предпочтительно SEQ ID NO: 118. В дополнительном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: (i) по меньшей мере один CD137-BD, при этом указанный CD137-BD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и (ii) по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из списка, состоящего из SEQ ID NO: 116, 117, 118, 146, 147 и 148, предпочтительно SEQ ID NO: 118. В одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: (i) по меньшей мере один CD137-BD, при этом указанный CD137-BD представляет собой Fv, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 33, и (ii) по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD представляет собой Fv, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 116, 117, 118, 146, 147 и 148, предпочтительно SEQ ID NO: 118. В дополнительном варианте мультиспецифическое

антитело по настоящему изобретению содержит: (i) по меньшей мере один CD137-BD, при этом указанный CD137-BD представляет собой Fv, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и (ii) по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD представляет собой Fv, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из списка, состоящего из SEQ ID NO: 116, 117, 118, 146, 147 и 148, предпочтительно SEQ ID NO: 118.

В предпочтительном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: (i) по меньшей мере один CD137-BD, при этом указанный CD137-BD содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87 или SEQ ID NO: 88, предпочтительно SEQ ID NO: 86, более предпочтительно SEQ ID NO: 88, и (ii) по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80 процентов, по меньшей мере на 90 процентов или по меньшей мере на 95 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из списка, состоящего из SEQ ID NO: 116, 117, 118, 146, 147 и 148, предпочтительно SEQ ID NO: 118. В дополнительном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: (i) по меньшей мере один CD137-BD, при этом указанный CD137-BD содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86 или SEQ ID NO: 87 или SEQ ID NO: 88, предпочтительно SEQ ID NO: 86, более предпочтительно SEQ ID NO: 88, и (ii) по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из списка, состоящего из SEQ ID NO: 116, 117, 118, 146, 147 и 148, предпочтительно SEQ ID NO: 118.

В предпочтительном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит:

(i) по меньшей мере один CD137-BD, при этом указанный CD137-BD содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, предпочтительно последовательность VH SEQ ID NO: 17, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30, предпочтительно последовательность VL SEQ ID NO: 30; и

- (ii) по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD содержит:
- (a) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 105, 106 и 107, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 102, предпочтительно последовательность VH SEQ ID NO: 102, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 114, предпочтительно последовательность VL SEQ ID NO: 114
- или
- (b) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 105, 106 и 107, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 104, предпочтительно последовательность VH SEQ ID NO: 104, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 115, предпочтительно последовательность VL SEQ ID NO: 115
- или
- (c) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 119, 120 и 121, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 133, предпочтительно последовательность VH SEQ ID NO: 133, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, предпочтительно последовательность VL SEQ ID NO: 145
- или
- (d) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 119, 120 и 121, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с

аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 134, предпочтительно последовательность VH SEQ ID NO: 134, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, предпочтительно последовательность VL SEQ ID NO: 144.

В более предпочтительном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит:

(i) по меньшей мере один CD137-BD, при этом указанный CD137-BD содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 71, предпочтительно последовательность VH SEQ ID NO: 71, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83, предпочтительно последовательность VL SEQ ID NO: 83 и

(ii) по меньшей мере один PDL1-BD, при этом указанный PDL1-BD содержит:

(a) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 105, 106 и 107, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 102, предпочтительно последовательность VH SEQ ID NO: 102, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 114, предпочтительно последовательность VL SEQ ID NO: 114

или

(b) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 105, 106 и 107, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 104, предпочтительно последовательность VH SEQ ID NO: 104, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов

совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 115, предпочтительно последовательность VL SEQ ID NO: 115

или

- (с) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 119, 120 и 121, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 133, предпочтительно последовательность VH SEQ ID NO: 133, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 145, предпочтительно последовательность VL SEQ ID NO: 145

или

- (d) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 119, 120 и 121, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 134, предпочтительно последовательность VH SEQ ID NO: 134, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 144, предпочтительно последовательность VL SEQ ID NO: 144.

В соответствии с целью изобретения мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению имеет две различные специфичности (PDL1 и CD137). В соответствии с целью изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению представляет собой биспецифическое антитело. Мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению может содержать дополнительную специфичность (триспецифичность) или специфичности (тетраспецифическое, пентаспецифическое или гексаспецифическое антитело). В одном варианте мультиспецифическое антитело является триспецифическим.

В одном варианте мультиспецифическое антитело по изобретению содержит полипептид области Fc иммуноглобулина. Термин «область Fc» в настоящем описании используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая области Fc нативной последовательности и области Fc вариантов. Подходящие области Fc нативной последовательности включают в себя IgG1, IgG2 (IgG2A, JgG2B), IgG3 и IgG4 человека. «Fc-рецептор» или «FcR» описывает рецептор, который связывается

с областью Fc антитела. Предпочтительным FcR является FcR человека с нативной последовательностью. Более того, предпочтительным FcR является FcR, который связывается с антителом IgG (гамма-рецептор) и включает в себя рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов, рецепторы FcγRII включают в себя FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые имеют аналогичные аминокислотные последовательности, которые отличаются, главным образом, своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (см. M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 5:203-234 (1997)). FcR рассмотрены у Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capet et al, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); и de Haas et al, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Другие FcR, включая FcR, которые будут определены в будущем, включены в термин «FcR» в настоящем описании. Термин «Fc-рецептор» или «FcR» также включает в себя неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за передачу плоду материнских IgG (Guyer et al., *J. Immunol.* 117: 587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994)). Известны методы измерения связывания с FcRn (см., например, Ghetie and Ward, *Immunol. Today* 18: (12): 592-8 (1997); Ghetie et al., *Nature Biotechnology* 15 (7): 637-40 (1997); Hinton et al., *J. Biol. Chem. TJI* (8): 6213-6 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al). Связывание с FcRn *in vivo* и период полужизни полипептидов связывания с высокой аффинностью FcRn человека в сыворотке можно анализировать, например, в клеточных линиях трансгенных мышей или трансфицированных клеточных линиях человека, экспрессирующих человеческий FcRn, или у приматов, которым вводят полипептиды, имеющие вариантную область Fc. В публикации WO 2004/42072 (Presta) описаны варианты антител, которые улучшали или уменьшали связывание с FcR (см. также, например, Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)).

В еще одном варианте антитело по изобретению не содержит полипептид области Fc иммуноглобулина.

Для увеличения количества специфичностей/функциональных возможностей при той же или более низкой молекулярной массе целесообразно использовать антитела, содержащие фрагменты антител, например, фрагменты Fv, Fab, Fab' и F(ab')₂ и другие фрагменты антител. Эти более мелкие молекулы сохраняют антигенсвязывающую активность всего антитела и могут также демонстрировать улучшение проникновения в

ткани и лучшие фармакокинетические свойства по сравнению с целыми молекулами иммуноглобулина. Хотя, как представляется, такие фрагменты обладают рядом преимуществ по сравнению с цельными иммуноглобулинами, они также страдают от повышенной скорости выведения из сыворотки, так как у них отсутствует домен Fc, который обеспечивает длительный период полужизни *in vivo* (Medasan et al., 1997, *J. Immunol.* 158:2211-2217). Молекулы с более низкой молекулярной массой более эффективно проникают в ткани-мишени (например, солидный рак) и, таким образом, сулят хорошие перспективы в плане повышения эффективности при той же или более низкой дозе.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что добавление домена связывания сывороточного альбумина человека (HSA-BD) с мультиспецифическим антителом по изобретению, содержащим (a) по меньшей мере один CD137-BD и (b) по меньшей мере один PDL1-BD, имеет следующие полезные эффекты:

- (i) период полужизни в сыворотке мультиспецифического антитела по изобретению, содержащего по меньшей мере один домен человеческого сывороточного альбумина, сопоставим с периодом полужизни у IgG;
- (ii) добавление домена связывания человеческого сывороточного альбумина с мультиспецифическим антителом по изобретению совместимо с функциональными возможностями других доменов связывания, например, PDL1-BD сохраняет свою блокирующую активность и CD137-BD сохраняет способность активировать передачу сигналов CD137 при кластеризации;
- (iii) даже несмотря на то, что домен связывания человеческого сывороточного альбумина увеличивает EC50 мультиспецифического антитела по изобретению для активации CD137, он неожиданно улучшает максимальный размер эффекта, например, значительно повышается максимальная активация передачи сигнала CD137.

В соответствии с целью изобретения мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению может содержать дополнительный домен связывания, обладающий специфичностью к человеческому сывороточному альбумину. В одном варианте мультиспецифическое антитело содержит: (i) по меньшей мере один CD137-BD; (ii) по меньшей мере один PDL1-BD и (iii) по меньшей мере один HSA-BD. В соответствии с целью изобретения мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: (i) один CD137-BD; (ii) по меньшей мере один PDL1-BD, предпочтительно один PDL1-BD или два PDL1-BD, более предпочтительно один PDL1-BD и (iii) по меньшей мере один HSA-BD, предпочтительно один HSA-BD.

Термин «HSA» относится к, в частности, человеческому сывороточному альбумину с идентификационным номером UniProt P02768. Человеческий сывороточный альбумин (HSA) представляет собой многокопийный белок с длиной 66,4 кДа в сыворотке человека (50% от общего белка), содержащий 585 аминокислот (Sugio, Protein Eng, Vol. 12, 1999, 439-446). Многофункциональный белок HSA ассоциируется с его структурой, которая позволяет связывать и транспортировать ряд метаболитов, таких как жирные кислоты, ионы металлов, билирубин и некоторые лекарственные средства (Fanali, Molecular Aspects of Medicine, Vol. 33, 2012, 209-290). Концентрация HSA в сыворотке крови составляет около 3,5-5 г/дл. Связывающие альбумин антитела и их фрагменты можно использовать, например, для увеличения периода полужизни лекарственных средств или белков, конъюгированных с ними, в сыворотке.

В некоторых вариантах HSA-BD получают из моноклонального антитела или фрагмента антитела.

Подходящие HSA-BD для применения в мультиспецифических антителах по изобретению представляют собой домены связывания, представленные в настоящем описании. HSA-BD по изобретению включают в себя, помимо прочего, гуманизированные моноклональные антитела, последовательности которых перечислены в таблице 3.

HSA-BD по изобретению специфически связываются с человеческим сывороточным альбумином. HSA-BD по изобретению содержат CDR VH с аминокислотной последовательностью любой из CDR VH, перечисленных в таблице 3. В частности, в изобретении предложены HSA-BD, содержащие один, два, три или более CDR VH с аминокислотной последовательностью любой из CDR VH, перечисленных в таблице 3.

В изобретении также предложены HSA-BD, содержащие CDR VL с аминокислотной последовательностью любой из CDR VL, перечисленных в таблице 3. В частности, в изобретении предложены HSA-BD, содержащие один, два, три или более CDR VL с аминокислотной последовательностью любой из CDR VL, перечисленных в таблице 3.

Другие HSA-BD по изобретению включают в себя аминокислоты, которые были мутированы, но которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают в областях CDR с областями CDR, указанными в последовательностях, описанных в таблице 3. Другие HSA-BD по изобретению включают в себя мутантные аминокислотные последовательности, в которых не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были мутированы в областях CDR по сравнению с областями CDR, указанными в последовательности, описанной в таблице 3.

HSA-BD по настоящему изобретению содержит: (а) вариабельную область тяжелой цепи CDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной

последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 149, 152, 155, 158, 173, 176, 179 и 182, предпочтительно SEQ ID NO: 149 или 173, более предпочтительно SEQ ID NO: 149; (b) вариабельную область тяжелой цепи CDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 150, 153, 156, 159, 174, 177, 180 и 183, предпочтительно SEQ ID NO: 150 или 174, более предпочтительно SEQ ID NO: 150; (c) вариабельную область тяжелой цепи CDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 151, 154, 157, 160, 175, 178, 181 и 184, предпочтительно SEQ ID NO: 151 или 175, более предпочтительно SEQ ID NO: 151; (d) вариабельную область легкой цепи CDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 162, 165, 168, 186, 189 и 192, предпочтительно SEQ ID NO: 162 или 186, более предпочтительно SEQ ID NO: 162; (e) вариабельную область легкой цепи CDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 163, 166, 169, 187, 190 и 193, предпочтительно SEQ ID NO: 163 или 187, более предпочтительно SEQ ID NO: 163, и (f) вариабельную область легкой цепи CDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 164, 167, 170, 188, 191 и 194, предпочтительно SEQ ID NO: 164 или 188, более предпочтительно SEQ ID NO: 164. В соответствии с целью изобретения HSA-BD по настоящему изобретению содержит: (a) вариабельную область тяжелой цепи CDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью любой из SEQ ID NO: 149, 152, 155, 158, 173, 176, 179 и 182, предпочтительно SEQ ID NO: 149 или 173, более предпочтительно SEQ ID NO: 149; (b) вариабельную область тяжелой цепи CDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью любой из SEQ ID NO: 150, 153, 156, 159, 174, 177, 180 и 183, предпочтительно SEQ ID NO: 150 или 174, более предпочтительно SEQ ID NO: 150; (c) вариабельную область тяжелой цепи CDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью любой из SEQ ID NO: 151, 154, 157, 160, 175, 178, 181 и 184, предпочтительно SEQ ID NO: 151 или 175, более предпочтительно SEQ ID NO: 151; (d) вариабельную область легкой цепи CDR1, содержащую, предпочтительно состоящую из выбранной аминокислотной

последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью любой из SEQ ID NO: 162, 165, 168, 186, 189 и 192, предпочтительно SEQ ID NO: 162 или 186, более предпочтительно SEQ ID NO: 162; (е) переменную область легкой цепи CDR2, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью любой из SEQ ID NO: 163, 166, 169, 187, 190 и 193, предпочтительно SEQ ID NO: 163 или 187, более предпочтительно SEQ ID NO: 163, и (ф) переменную область легкой цепи CDR3, содержащую, предпочтительно состоящую из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с последовательностью любой из SEQ ID NO: 164, 167, 170, 188, 191 и 194, предпочтительно SEQ ID NO: 164 или 188, более предпочтительно SEQ ID NO: 164.

В одном варианте HSA-BD по изобретению содержит: (а) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 149, 150, и 151, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 162, 163 и 164, соответственно; (b) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 152, 153 и 154, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 165, 166 и 167, соответственно; или (с) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 173, 174 и 175, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 186, 187 и 188, соответственно; или (d) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 176, 177 и 178, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 189, 190 и 191, соответственно. В предпочтительном варианте HSA-BD по изобретению содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с SEQ ID NO: 149, 150, и 151, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 162, 163 и 164, соответственно. В соответствии с целью изобретения HSA-BD по изобретению содержит: (а) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностью SEQ ID NO: 149, 150 и 151, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 162, 163 и 164, соответственно; или (b) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID

NO: 152, 153 и 154, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 165, 166 и 167, соответственно; или (с) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 173, 174 и 175, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 186, 187 и 188, соответственно; или (с) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 176, 177 и 178, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 189, 190 и 191, соответственно. В предпочтительном варианте HSA-BD по изобретению содержит: (а) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 149, 150 и 151, соответственно, и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие последовательности аминокислот, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадают с последовательностями SEQ ID NO: 162, 163 и 164, соответственно.

В дополнительном варианте в изобретении предложен HSA-BD, который специфически связывается с человеческим сывороточным альбумином, при этом указанный домен связывания содержит домен VH и домен VL.

В соответствии с целью изобретения HSA-BD по изобретению содержит VH3 или VH4. В одном варианте HSA-BD по изобретению содержит каркасные последовательности домена VH3. Конкретный пример VH, принадлежащего семейству VH3, представлен под SEQ ID NO: 161. В частности, каркасные области FR1-FR4, взятые из SEQ ID NO: 161, принадлежат к семейству VH3 (таблица 3, области, указанные “нежирным” шрифтом). В соответствии с целью изобретения при использовании в настоящем описании VH, принадлежащий к семейству VH3, представляет собой VH, содержащий FR1-FR4, последовательность которых по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на

95% совпадает с последовательностью FR1-FR4 SEQ ID NO: 161. Альтернативные примеры последовательностей VH3 и примеры последовательностей VH4 можно найти в Кнаррик et al., J. Mol. Biol. 296 (2000) 57-86. В соответствии с целью изобретения HSA-BD по изобретению содержит каркасы Vк FR1, FR2 и FR3, в частности каркасы Vк1 или Vк3, предпочтительно каркасы Vк1 FR1-FR3, и каркас FR4, который выбран из Vк FR4, в частности Vк1 FR4, Vк3 FR4, и Vλ FR4. Подходящие каркасы Vк1 FR1- FR3 указаны в SEQ ID NO: 171 (таблица 3, области FR указаны “нежирным” шрифтом). Альтернативные примеры последовательностей Vк1 и примеры последовательностей Vк2, Vк3 или Vк4 можно найти в Кнаррик et al., J. Mol. Biol. 296 (2000) 57-86. Подходящие каркасы Vк1 FR1-3 содержат аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадают с аминокислотными последовательностями, соответствующими FR1-3 и взятыми из SEQ ID NO: 171 (таблица 3, области FR указаны “нежирным” шрифтом). Подходящие Vλ FR4 указаны в SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205. В одном варианте HSA-BD по настоящему изобретению содержит Vλ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, предпочтительно SEQ ID NO: 199.

Таким образом, в одном варианте HSA-BD по настоящему изобретению содержит:

- (i) последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 LCDR3:
 - (a) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 152, 153 и 154, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 165, 166 и 167, соответственно, или
 - (b) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 176, 177 и 178, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 189, 190 и 191, соответственно;
- (ii) каркасные последовательности доменов VH3 или VH4 FR1-FR4, предпочтительно каркасные последовательности домена VH3 FR1-FR4; и d
- (iii) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасы Vк FR1, FR2 и FR3, в частности Vк1 или Vк3 FR1-FR3, предпочтительно Vк1 FR1-FR3, и каркас FR4, который выбран из Vк FR4, в частности Vк1 FR4, Vк3 FR4, и Vλ FR4, предпочтительно Vλ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, предпочтительно Vλ FR4, указанную в аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO:

199 – SEQ ID NO: 205, более предпочтительно Vλ FR4, указанный в SEQ ID NO: 199.

Таким образом, в предпочтительном варианте HSA-BD по настоящему изобретению содержит:

- (i) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 149, 150, и 151, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 162, 163 и 164, соответственно;
- (ii) каркасные последовательности доменов VH3 или VH4 FR1-FR4; предпочтительно каркасные последовательности домена VH3 FR1-FR4, и
- (iii) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасы Vκ FR1, FR2 и FR3, в частности Vκ1 или Vκ3 FR1-FR3, предпочтительно Vκ1 FR1-FR3, и каркас FR4, который выбран из Vκ FR4, в частности Vκ1 FR4, Vκ3 FR4, и Vλ FR4, предпочтительно Vλ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, предпочтительно Vλ FR4, указанную в аминокислотной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, более предпочтительно Vλ FR4, указанный в SEQ ID NO: 199.

В одном варианте HSA-BD по настоящему изобретению содержит VL, содержащую:

- (iv) домены CDR: CDR1, CDR2 and CDR3;
- (v) каркасные области Vκ человека FR1-FR3, в частности каркасные области Vκ1 человека FR1-FR3;
- (vi) FR4, который выбран из (a) последовательности зародышевой линии Vλ человека для FR4, в частности последовательности зародышевой линии Vλ, выбранной из списка: SEQ ID NO: 199-205, предпочтительно SEQ ID NO: 199, и (b) последовательность на основе Vλ, которая имеет одну или две мутации, в частности одну мутацию, по сравнению с самой близкой последовательностью зародышевой линии Vλ человека для FR4, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, предпочтительно SEQ ID NO: 199.

HSA-BD по изобретению содержит домен VH, указанный в таблице 3. В соответствии с целью изобретения HSA-BD по изобретению содержит аминокислотную последовательность VH, указанную в таблице 3, в которой произошла мутация не более чем около 10 аминокислот в каркасной последовательности (например,

последовательности, которая не является CDR) (при этом мутацией является, в качестве различных не ограничивающих примеров, добавление, замена или делеция). В соответствии с целью изобретения HSA-BD по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность VH, указанную в таблице 3, в которой произошла мутация не более чем около 20 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) (при этом мутацией является, в качестве различных не ограничивающих примеров, добавление, замена или делеция). Другие HSA-BD по изобретению включают в себя аминокислоты, которые были мутированы, но которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичны/совпадают в областях VH с областями VH, указанными в последовательностях, описанных в таблице 3.

HSA-BD по изобретению содержит домен VL, указанный в таблице 3. В соответствии с целью изобретения HSA-BD по изобретению содержит аминокислотную последовательность VL, указанную в таблице 3, в которой произошла мутация не более чем около 10 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) (при этом мутацией является, в качестве различных не ограничивающих примеров, добавление, замена или делеция). В соответствии с целью изобретения HSA-BD по изобретению содержит аминокислотную последовательность VL, указанную в таблице 3, в которой произошла мутация не более чем около 20 аминокислот в каркасной последовательности (например, последовательности, которая не является CDR) (при этом мутацией является, в качестве различных не ограничивающих примеров, добавление, замена или делеция). Другие HSA-BD по изобретению включают в себя аминокислоты, которые были мутированы, но которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичны/совпадают в областях VL с областями VL, указанными в последовательностях, описанных в таблице 3.

В соответствии с целью изобретения HSA-BD по изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, предпочтительно по меньшей мере на 90 процентов, совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 161 и 185, предпочтительно SEQ ID NO: 161, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов, предпочтительно по меньшей мере на 90

процентов, совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 171 и 195, предпочтительно SEQ ID NO: 171.

В одном варианте HSA-BD по изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 161 и 185, предпочтительно SEQ ID NO: 161, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 171 и 195, предпочтительно SEQ ID NO: 161.

В дополнительном варианте HSA-BD по изобретению содержит: (a) последовательность VH SEQ ID NO: 161 и последовательность VL SEQ ID NO: 171 или (b) последовательность VH SEQ ID NO: 185 и последовательность VL SEQ ID NO: 195. В предпочтительном варианте HSA-BD по изобретению содержит последовательность VH SEQ ID NO: 161 и последовательность VL SEQ ID NO: 171

В одном варианте HSA-BD по изобретению содержит:

(a) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 152, 153 и 154, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 165, 166 и 167, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 161, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 171, или

(b) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 176, 177 и 178, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 189, 190 и 191, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 185, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 195.

В одном варианте HSA-BD по изобретению содержит:

(a) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 149, 150, и 151, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 162, 163 и 164, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 161, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 171, или

(b) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 173, 174 и 175, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 186, 187 и 188, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90,

91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 185, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 195.

В соответствии с целью изобретения HSA-BD по изобретению выбран из группы, состоящей из: Fab, Fv, scFv, dsFv, scAb, STAB и доменов связывания, основанных на альтернативных каркасах, включая, помимо прочего, домены на основе анкирина, финомеры, авимеры, антикалсины, фибронектины и сайты связывания, встроенные в константные области антител (например, при помощи технологии f-star (F-star Modular Antibody Technology™)).

В соответствии с целью изобретения HSA-BD по изобретению является фрагментом антитела scFv. В одном варианте HSA-BD по настоящему изобретению указан в SEQ ID NO: 172 или SEQ ID NO: 196, предпочтительно SEQ ID NO: 172.

Другой подходящий HSA-BD для применения в мультиспецифическом антителе по изобретению содержит или происходит от антитела, выбранного из группы, состоящей из: (i) полипептидов, которые связываются с сывороточным альбумином (см., например, Smith et al., 2001, Bioconjugate Chem. 12:750-756; EP0486525; US6267964; WO 2004/001064; WO 2002/076489; and WO 2001/45746); (ii) единичных переменных доменов связывания к сывороточному альбумину, описанных в Holt et al., Protein Engineering, Design & Selection, vol 21, 5, pp283-288, WO 2004/003019, WO 2008/096158, WO 2005/118642, WO 2006/0591056 and WO 2011/006915; (iii) антител к сывороточному альбумину, описанных в WO 2009/040562, WO 2010/035012 and WO 2011/086091.

Мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению может быть в любом подходящем формате.

Соответственно, домены связывания мультиспецифического антитела функционально связаны. Домены связывания мультиспецифического антитела по настоящему изобретению способны связываться с их соответствующими антигенами или рецепторами одновременно.

В одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один CD137-BD и по меньшей мере один PDL1-BD, в котором: (i) указанный CD137-BD и указанный PDL1-BD функционально связаны друг с другом. В одном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один CD137-BD, по меньшей мере один PDL1-BD и по меньшей мере один HSA-BD, в котором: (i) указанный CD137-BD и указанный PDL1-BD функционально связаны с указанным HSA-BD или (ii) указанный CD137-BD и указанный HSA-BD функционально связаны с указанным PDL1-BD, или (iii) указанный

PDL1-BD и указанный HSA-BD функционально связаны с указанным CD137-BD. В предпочтительном варианте мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит по меньшей мере один CD137-BD, по меньшей мере один PDL1-BD, по меньшей мере один HSA-BD. при этом и указанный CD137-BD и указанный HSA-BD функционально связаны с указанным PDL1-BD.

Используемый в настоящем описании термин «функционально связанный» означает, что две молекулы (например, полипептиды, домены, домены связывания) присоединены так, что каждая из них сохраняет функциональную активность. Две молекулы могут быть «функционально связаны» независимо от того, присоединены они прямо или косвенно (например, через линкер, через фрагмент, через линкер к фрагменту). Термин «линкер» относится к пептиду или другому фрагменту, который необязательно расположен между доменами связывания или фрагментами антител по настоящему изобретению. Для ковалентного связывания молекул друг с другом может быть использован ряд стратегий. Они включают, помимо прочего, полипептидные связи между N- и C-концами белков или белковых доменов, соединение через дисульфидные связи и сшивание через химические сшивающие реагенты. В одном аспекте данного варианта осуществления изобретения линкер представляет собой пептидную связь, генерируемую рекомбинантными методами или пептидным синтезом. Выбор подходящего линкера для конкретного случая, где должны быть связаны две полипептидные цепи, зависит от различных параметров, включая, помимо прочего, характер двух полипептидных цепей (например, олигомеризуются ли они естественным образом), расстояние между соединяемыми N- и C-концами, если они известны, и/или стабильность линкера в отношении протеолиза и окисления. Кроме того, линкер может содержать аминокислотные остатки, которые обеспечивают гибкость.

В контексте настоящего изобретения термин «полипептидный линкер» относится к линкеру, состоящему из цепи аминокислотных остатков, связанных пептидными связями, которые соединяют два домена, каждый из которых присоединен к одному концу линкера. Полипептидный линкер должен иметь длину, достаточную для связывания двух молекул таким образом, чтобы они принимали правильную конформацию относительно друг друга и сохраняли, тем самым, желаемую активность. В конкретных вариантах осуществления полипептидный линкер имеет непрерывную цепь от 2 до 30 аминокислотных остатков (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотных остатков). Кроме того, аминокислотные остатки, выбранные для включения в полипептидный линкер, должны проявлять свойства, которые не оказывают значительного влияния на активность полипептида. Таким образом, линкер-

пептид в целом не должен демонстрировать заряд, который будет несовместим с активностью полипептида, мешать внутреннему фолдингу или образовывать связи или другие взаимодействия с аминокислотными остатками в одном или нескольких мономерах, которые будут серьезно препятствовать связыванию доменов рецептор-мономеров. В конкретных вариантах осуществления полипептидный линкер представляет собой неструктурированный полипептид. Полезные линкеры включают глицин-серин или GS-линкеры. Под линкерами «Gly-Ser» или «GS» понимается полимер глицинов и серинов в сериях (включая, например, $(\text{Gly-Ser})_n$, $(\text{GSGGS})_n$, $(\text{GGGGS})_n$ и $(\text{GGGS})_n$, где n - целое число, равное по меньшей мере единице), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, такие как связь для калиевого канала шейкера, и большое разнообразие других гибких линкеров, что будет ясно специалистам в данной области техники. Глицин-аланиновые полимеры являются предпочтительными, поскольку обе эти аминокислоты являются относительно неструктурированными и, следовательно, могут служить нейтральной связью между компонентами. Во-вторых, серин является гидрофильным и, следовательно, способен растворять то, что может представлять собой глобулярную глициновую цепь. В-третьих, было показано, что подобные цепи эффективны в соединении субъединиц рекомбинантных белков, таких как одноцепочечные антитела.

Соответственно, мультиспецифическое антитело имеет формат, выбранный из любого подходящего мультиспецифического антитела, например, биспецифичный формат, известный из уровня техники, включая, в качестве неограничивающего примера, форматы на основе одноцепочечного антитела (scDb), тандемного scDb (Tandab), линейного димерного scDb (LD-scDb), кольцевого димерного scDb (CD-scDb), биспецифического рекрутера Т-клеток (BiTE; тандемный di-scFv), тандемного tri-scFv, триатела (Fab- (scFv) 2) или битела (Fab- (scFv) 1), Fab, Fab-Fv2, Моррисона (гибридного IgG CH₃-scFv (Моррисон L) или гибридного IgG CL-scFv (Моррисон H)), триатела, scDb-scFv, биспецифичного Fab2, ди-миниантитела, тетратела, гибридного scFv-Fc-scFv, гибридного scFv-HSA-scFv, ди-диатела, DVD-Ig, COVD, IgG-scFab, scFab-dsscFv, гибридного Fv2-Fc, IgG-scFv, например, bsAb (scFv, связанного с С-концом легкой цепи), Bs1Ab (scFv, связанного с N-концом легкой цепи), Bs2Ab (scFv, связанного с N-концом тяжелой цепи), Bs3Ab (scFv, связанного с С-концом тяжелой цепи), Ts1Ab (scFv, связанного с N-концом как тяжелой цепи, так и легкой цепи), Ts2Ab (dsscFv, связанного с С-концом тяжелой цепи), биспецифических антител на основе гетеродимерных Fc-доменов, таких как антитела типа «выступы во впадину» (KiHs) (биспецифические IgG, полученные по технологии KiH); Fv, scFv, scDb, тандемных ди-scFv, тандемных три-scFv,

Fab- (scFv) 2, Fab- (scFv) 1, Fab, Fab-Fv2, COVD, слитых с N- и/или C- концами любой цепи гетеродимерного Fc-домена или любого другого домена гетеродимеризации, MATCH (описанного в WO 2016/0202457; Egan T., et al., mAbs 9 (2017) 68-84) и DuoBodies (биспецифические IgG, полученные с помощью технологии Duobody) (MAbs. 2017 Feb/Mar;9(2):182-212. doi: 10.1080/19420862.2016.1268307). Особенно подходящим для применения в соответствии с настоящим изобретением является одноцепочечное диатело (scDb) или scDb-scFv.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению находится в формате, выбранном из списка, включающего в себя scDb (диатело), scDb-scFv, триатело и тритело. Особенно подходящим для применения в соответствии с настоящим изобретением является одноцепочечное диатело (scDb), в частности биспецифическое мономерное scDb. Также особенно подходящим для применения в соответствии с настоящим изобретением является scDb-scFv, в частности в котором указанный CD137-BD и указанный PDL1-BD в форме scDb, а указанный HSA-BD представляет собой scFv, функционально связанный с указанным scDb.

Термин «диатела» относится к фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые содержат VH, связанный с VL в одной и той же полипептидной цепи (VH-VL). При использовании линкера, который является слишком коротким для того, чтобы два домена в одной цепи могли соединиться, домены вынуждены соединяться с комплементарными доменами другой цепи, образуя два антигенсвязывающих сайта. Диатела могут быть двухвалентными или биспецифическими. Диатела более подробно описаны, например, в EP404097, WO 93/01161, Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003), и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). Триатела и тетратела также описаны в Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Биспецифическое scDb, в частности биспецифическое мономерное scDb, содержит два переменных домена тяжелой цепи (VH) или их фрагменты и два переменных домена легкой цепи (VL) или их фрагменты, соединенные линкерами L1, L2 и L3 в порядке VHA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VLA, VHA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VLA, VLA-L1-VLB-L2-VHB-L3-VHA, VLA-L1-VHB-L2-VLB-L3-VHA, VHB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VLB, VHB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VLB, VLB-L1-VLA-L2-VHA-L3-VHB или VLB-L1-VHA-L2-VLA-L3-VHB, где домены VLA и VHA совместно образуют антигенсвязывающий сайт для первого антигена, а VLB и VHB совместно образуют антигенсвязывающий сайт для второго антигена.

Линкер L1, в частности, представляет собой пептид из 2-10 аминокислот, более конкретно 3-7 аминокислот, и наиболее конкретно 5 аминокислот, а линкер L3, в

частности, представляет собой пептид из 1-10 аминокислот, более конкретно 2-7 аминокислот, и наиболее конкретно 5 аминокислот. В конкретных вариантах осуществления линкер L1 и/или L3 содержит одну или две единицы из четырех (4) аминокислотных остатков глицина и одного (1) аминокислотного остатка серина (GGGGS)_n, где n = 1 или 2, предпочтительно n = 1. В более конкретных вариантах осуществления линкер L1 и/или L3 указан в SEQ ID NO: 207 или SEQ ID NO: 208, предпочтительно SEQ ID NO: 207.

Средний линкер L2, в частности, представляет собой пептид из 10-40 аминокислот, более конкретно 15-30 аминокислот и наиболее конкретно 20-25 аминокислот. В конкретных вариантах указанный линкер L2 содержит одну или несколько единиц из четырех (4) аминокислотных остатков глицина и одного (1) аминокислотного остатка серина (GGGGS)_n, где n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, предпочтительно n = 4. В более конкретных вариантах осуществления линкер L2 указан в SEQ ID NO: 206.

В одном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb. В конкретном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb, содержащее аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из SEQ ID NO: 209, 210, 211, 212, 213, 214 и 215. В одном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 209, 210, 211, 212, 213, 214 и 215. В дополнительном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по настоящему изобретению является scDb, состоящее из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 209, 210, 211, 212, 213, 214 и 215.

В одном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv. Термин «scDb-scFv» относится к формату антитела, в котором одноцепочечный фрагмент Fv (scFv) слит гибким линкером Gly-Ser с одноцепочечным диателом (scDb). В одном варианте осуществления указанный гибкий линкер Gly-Ser представляет собой пептид из 2-40 аминокислот, например, 2-35, 2-30, 2-25, 2-20, 2-15, 2-10 аминокислот, в частности 10 аминокислот. В конкретных вариантах указанный линкер содержит одну или несколько единиц из четырех (4) аминокислотных остатков глицина и одного (1) аминокислотного остатка серина (GGGGS)_n, где n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, предпочтительно n = 2. В более конкретных вариантах осуществления упомянутый линкер указан в SEQ ID NO: 208.

В конкретном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из SEQ ID NO: 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230 и 231. Соответственно, мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из SEQ ID NO: 222. Более предпочтительно мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную SEQ ID NO: 223 или 224.

Соответственно, мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, предпочтительно по меньшей мере на 90, например, на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную SEQ ID NO: 216, где (a) CD137-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 4, 6 и 7, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 21, 22 и 23, соответственно, и (b) PDL1-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 122, 124 и 125, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 138, 139 и 140, соответственно, и (c) HSA-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 152, 153 и 154, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 165, 166 и 167, соответственно.

Соответственно, мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, предпочтительно по меньшей мере на 90, например, на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную SEQ ID NO: 217, где (a) CD137-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 38, 39 и 40, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 51, 52 и 53, соответственно, и (b) PDL1-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 122, 124 и 125, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 138, 139 и 140, соответственно, и (c) HSA-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3

SEQ ID NO: 152, 153 и 154, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 165, 166 и 167, соответственно.

Соответственно, мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, предпочтительно по меньшей мере на 90, например, на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную SEQ ID NO: 218, где (a) CD137-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 4, 6 и 7, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 21, 22 и 23, соответственно, и (b) PDL1-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 122, 124 и 125, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 138, 139 и 140, соответственно, и (c) HSA-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 176, 177 и 178, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 189, 190 и 191, соответственно.

Соответственно, мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, предпочтительно по меньшей мере на 90, например, на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную SEQ ID NO: 219, где (a) CD137-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 38, 39 и 40, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 51, 52 и 53, соответственно, и (b) PDL1-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 122, 124 и 125, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 138, 139 и 140, соответственно, и (c) HSA-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 176, 177 и 178, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 189, 190 и 191, соответственно.

Соответственно, мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, предпочтительно по меньшей мере на 90, например, на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную SEQ ID NO: 220, где (a) CD137-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 4, 6 и 7, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 21, 22 и 23, соответственно, и (b) PDL1-BD указанного мультиспецифического

антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 92, 94 и 95, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 108, 109 и 110, соответственно, и (с) HSA-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 152, 153 и 154, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 165, 166 и 167, соответственно.

Соответственно, мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, предпочтительно по меньшей мере на 90, например, на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную SEQ ID NO: 221, где (а) CD137-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 4, 6 и 7, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 21, 22 и 23, соответственно, и (b) PDL1-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 92, 94 и 95, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 108, 109 и 110, соответственно, и (с) HSA-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 176, 177 и 178, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 189, 190 и 191, соответственно.

В предпочтительном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, предпочтительно по меньшей мере на 90, например, на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную SEQ ID NO: 222 или SEQ ID NO: 223 или SEQ ID NO: 224, предпочтительно SEQ ID NO: 222, более предпочтительно SEQ ID NO: 223, где (а) CD137-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно, и (b) PDL1-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 105, 106 и 107, соответственно, и (с) HSA-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 149, 150, и 151, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 162, 163 и 164, соответственно.

В одном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, по

меньшей мере на 60, 70, 80, предпочтительно по меньшей мере на 90, например, на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную SEQ ID NO: 225 или SEQ ID NO: 226 или SEQ ID NO: 227 или SEQ ID NO: 228, предпочтительно SEQ ID NO: 225 или SEQ ID NO: 228, более предпочтительно SEQ ID NO: 225, где (a) CD137-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно, и (b) PDL1-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 119, 120 и 121, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно, и (c) HSA-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 149, 150, и 151, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 162, 163 и 164, соответственно.

В одном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227 и 228, предпочтительно SEQ ID NO: 222 или 223, более предпочтительно SEQ ID NO: 223. В еще одном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, состоящее из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227 и 228, предпочтительно SEQ ID NO: 222 или 223, более предпочтительно SEQ ID NO: 223.

В еще одном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, предпочтительно по меньшей мере на 90, например, на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную SEQ ID NO: 229 или SEQ ID NO: 230 или SEQ ID NO: 231, предпочтительно до SEQ ID NO: 229 или SEQ ID NO: 231, более предпочтительно SEQ ID NO: 229, где (a) CD137-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно, и (b) PDL1-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 119, 120 и 121, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 135, 136 и 137, соответственно, и (c) HSA-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 149, 150, и 151,

соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 162, 163 и 164, соответственно.

В предпочтительном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную SEQ ID NO: 229 или SEQ ID NO: 230, или SEQ ID NO: 231, предпочтительно SEQ ID NO: 229 или SEQ ID NO: 231, более предпочтительно SEQ ID NO: 229. В конкретном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, предпочтительно по меньшей мере на 90, например, на 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную SEQ ID NO: 229 или SEQ ID NO: 230, или SEQ ID NO: 231, предпочтительно SEQ ID NO: 229 или SEQ ID NO: 231, более предпочтительно SEQ ID NO: 229, где (a) CD137-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно, и (b) PDL1-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 105, 106 и 107, соответственно, и (c) HSA-BD указанного мультиспецифического антитела содержит последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 149, 150, и 151, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 162, 163 и 164, соответственно.

В одном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230 и 231, предпочтительно SEQ ID NO: 222 или 223, более предпочтительно SEQ ID NO: 223. В еще одном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, состоящее из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230 и 231, предпочтительно SEQ ID NO: 222 или 223, более предпочтительно SEQ ID NO: 223. В предпочтительном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 229, 230 и 231, предпочтительно SEQ ID NO: 239 или 231, более предпочтительно SEQ ID NO: 229. В более конкретном варианте осуществления мультиспецифическим антителом по изобретению является scDb-scFv, состоящее из аминокислотной последовательности,

выбранной из SEQ ID NO: 229, 230 и 231, предпочтительно SEQ ID NO: 229 или 231, более предпочтительно SEQ ID NO: 229.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению имеет Моррисон-L формат.

В конкретном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению включает в себя (i) легкую цепь Моррисон-L, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из SEQ ID NO: 232, и (ii) тяжелую цепь Моррисон-L, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере чем на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с любой из SEQ ID NO: 233. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению включает в себя (i) легкую цепь Моррисон-L, содержащую аминокислоту из SEQ ID NO: 232, и (ii) тяжелую цепь Моррисон-L, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 233. В еще одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению включает в себя (i) легкую цепь Моррисон-L, содержащую аминокислоту из SEQ ID NO: 232, и (ii) тяжелую цепь Моррисон-L, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 233.

В еще одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению включает в себя (i) легкую цепь Моррисон-L, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из SEQ ID NO: 236, и (ii) тяжелую цепь Моррисон-L, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с любой из SEQ ID NO: 237. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению включает в себя (i) легкую цепь Моррисон-L, содержащую аминокислоту из SEQ ID NO: 236, и (ii) тяжелую цепь Моррисон-L, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 237. В еще одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению включает в себя (i) легкую цепь Моррисон-L, содержащую аминокислоту из SEQ ID NO: 236, и (ii) тяжелую цепь Моррисон-L, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 237.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению имеет Моррисон-H формат.

В конкретном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению включает в себя (i) легкую цепь Моррисон-H, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99

процентов идентичную любой из SEQ ID NO: 234, и (ii) тяжелую цепь Моррисон-Н, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с любой из SEQ ID NO: 235. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению включает в себя (i) легкую цепь Моррисон-Н, содержащую аминокислоту из SEQ ID NO: 234, и (ii) тяжелую цепь Моррисон-Н, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 235. В еще одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению включает в себя (i) легкую цепь Моррисон-L, содержащую аминокислоту из SEQ ID NO: 234, и (ii) тяжелую цепь Моррисон-L, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 235.

В еще одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению включает в себя (i) легкую цепь Моррисон-Н, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичную любой из SEQ ID NO: 238, и (ii) тяжелую цепь Моррисон-Н, содержащую последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с любой из SEQ ID NO: 239. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению включает в себя (i) легкую цепь Моррисон-Н, содержащую аминокислоту из SEQ ID NO: 238, и (ii) тяжелую цепь Моррисон-Н, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 239. В еще одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело по изобретению включает в себя (i) легкую цепь Моррисон-L, содержащую аминокислоту из SEQ ID NO: 238, и (ii) тяжелую цепь Моррисон-L, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 239.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения мультиспецифическое антитело по изобретению имеет формат MATCH, описанный в WO 2016/0202457; Egan T., et al., *mAbs* 9 (2017) 68-84.

Мультиспецифическое антитело по изобретению может быть получено с использованием любого удобного способа получения антител, известного в данной области (см., например, Fischer, N. & Leger, O., *Pathobiology* 74 (2007) 3-14 в отношении получения биспецифических конструкторов; Hornig, N. & Färber-Schwarz, A., *Methods Mol. Biol.* 907 (2012)713-727 и WO 99/57150 в отношении биспецифических диател и тандемных scFvs). Конкретные примеры подходящих способов получения биспецифического конструктора по изобретению дополнительно включают в себя, среди прочего, технологии Genmab (см. Labrijn et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110 (2013) 5145-5150) и Merus (см. de Kruif et al., *Biotechnol. Bioeng.* 106 (2010) 741-750). Способы

получения биспецифических антител, содержащих Fc-часть функционального антитела, также известны в данной области техники (см., например, Zhu et al., *Cancer Lett.* 86 (1994) 127-134); и Suresh et al., *Methods Enzymol.* 121 (1986) 210-228).

Эти способы обычно включают в себя генерацию моноклональных антител, например, путем слияния клеток миеломы с клетками селезенки от мыши, которая была иммунизирована желаемым антигеном, с использованием технологии гибридомы (см., например, Yokoyama et al., *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 2, Unit 2.5, 2006), или с помощью рекомбинантных антител (клонирование иммунного репертуара или фаговый дисплей/дрожжевой дисплей) (см., например, Chames & Baty, *FEMS Microbiol. Letters* 189 (2000) 1-8) и комбинации антигенсвязывающих доменов или фрагментов, или их частей двух или более различных моноклональных антител для получения биспецифического или мультиспецифического конструкта с использованием известных методов молекулярного клонирования.

Мультиспецифичные молекулы по изобретению могут быть получены путем конъюгирования специфичностей связывания компонентов с использованием способов, известных в данной области техники. Например, каждую специфичность связывания биспецифической молекулы можно сгенерировать отдельно и затем конъюгировать их друг с другом. Когда специфичностями связывания являются белки или пептиды, для ковалентной конъюгации можно использовать различные связывающие или перекрестно-сшивающие агенты. Примеры перекрестно-сшивающих агентов включают в себя белок А, карбодиимид, N-сукцинимидил-5-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис (2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky et al., 1984 *J. Exp. Med.* 160: 1686; Liu, M A et al., 1985 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Другие способы включают в себя способы, описанные в Paulus, 1985, *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan et al., 1985 *Science* 229:81-83), and Glennie et al., 1987 *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Конъюгирующими агентами являются SATA и сульфо-SMCC, оба доступны от компании Pierce Chemical Co. (Rockford, 111).

Когда специфичностями связывания являются антитела, они могут быть конъюгированы сульфгидрильным связыванием шарниров C-конца двух тяжелых цепей. В конкретном варианте осуществления шарнир модифицируют так, чтобы он содержал нечетное число сульфгидрильных остатков, например, один, до конъюгации.

Альтернативно две или более специфичности связывания могут быть закодированы в одном и том же векторе и экспрессированы и собраны в одной и той же клетке-хозяине.

Этот способ особенно полезен, когда биспецифическая молекула представляет собой гибридный белок mAb X mAb, mAb X Fab, Fab X F (ab')₂ или лиганда X Fab. Мультиспецифическим антителом по изобретению может быть одноцепочечная молекула, содержащая одноцепочечное антитело и детерминанту связывания, или одноцепочечное мультиспецифическое антитело, содержащее две детерминанты связывания. Мультиспецифическое антитело может содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения мультиспецифических антител и молекул описаны, например, в следующих публикациях: US 5,260,203; US 5,455,030; US 4,881,175; US 5,132,405; US 5,091,513; US 5,476,786; US 5,013,653; US 5,258,498; и US 5,482,858.

Связывание мультиспецифических антител с их специфичными мишенями может быть подтверждено, например, с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), радиоиммуноанализа (REA), анализа FACS, биоанализа (например, ингибирования роста) или вестерн-блоттинга. Каждый из этих анализов обычно выявляет присутствие комплексов белок-антитело, представляющих особый интерес, с использованием меченого реагента (например, антитела), специфичного для представляющего интерес комплекса.

В дополнительном аспекте изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей мультиспецифическое антитело по изобретению или его фрагменты, или его домены связывания. Такие последовательности нуклеиновых кислот могут быть оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих.

Термин «нуклеиновая кислота» используется в настоящем описании взаимозаменяемо с термином «полинуклеотид(ы)» и относится к одному или нескольким дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки, или связи основной цепи, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, имеют свойства связывания, сходные с эталонной нуклеиновой кислотой, и которые метаболизируются способом, сходным с эталонными нуклеотидами. Примеры таких аналогов включают, без ограничений, фосфотиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфораты, 2-О-метил рибонуклеотиды, пептид-нуклеиновые кислоты (ПНК). Если не указано иное, подразумевается, что конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также включает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденного кодона) и комплементарные последовательности, а также явно указанную последовательность. В частности, как подробно описано ниже, замены вырожденных кодонов могут быть достигнуты путем генерации

последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов замещено остатками смешанного основания и/или дезоксииннозина (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; и Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994).

Изобретение обеспечивает, главным образом, молекулы очищенной нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды, содержащие сегменты или домены мультиспецифического антитела, описанного выше. При экспрессии из соответствующих векторов экспрессии полипептиды, кодируемые этими молекулами нуклеиновой кислоты, способны проявлять антигенсвязывающую способность или способности мультиспецифического антитела по настоящему изобретению.

В изобретении также представлены полинуклеотиды, которые кодируют по меньшей мере одну область CDR и обычно все три области CDR доменов связывания мультиспецифического антитела по настоящему изобретению, представленных в таблицах 1-3. Из-за дегенерации (вырождения) кода различные последовательности нуклеиновых кислот будут кодировать каждую из аминокислотных последовательностей иммуноглобулина.

Полинуклеотидные последовательности могут быть получены путем твердофазного синтеза ДНК *de novo* или с помощью ПЦР-мутагенеза существующей последовательности (например, последовательности, как описано в приведенных ниже примерах), кодирующей мультиспецифическое антитело по изобретению или его фрагменты, или его домены связывания. Прямой химический синтез нуклеиновых кислот может быть осуществлен способами, известными в данной области техники, такими как фосфотриэфирный метод, описанный в Narang et al., 1979, *Meth. Enzymol.* 68:90; фосфодиэфирный метод, описанный в Brown et al., *Meth. Enzymol.* 68: 109, 1979; диэтилфосфорамидитный метод, описанный в Beaucage et al., *Tetra. Lett.*, 22: 1859, 1981; и твердофазный метод, описанный в патенте США № 4,458,066. Мутации могут быть введены в полинуклеотидную последовательность с помощью ПЦР, как описано, например, в следующих источниках: *PCR Technology; Principles and Applications for DNA Amplification*, H. A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, N.Y., 1992; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, Calif, 1990; Mattila et al., *Nucleic Acids Res.* 19:967, 1991; и Eckert et al., *PCR Methods and Applications* 1:17, 1991.

В изобретении также предусмотрены векторы экспрессии и клетки-хозяева для продуцирования мультиспецифического антитела по изобретению или его фрагментов, или его доменов связывания.

Термин «вектор» предназначен для обозначения полинуклеотидной молекулы, способной транспортировать другой полинуклеотид, с которым она связана. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к петле кольцевой двухцепочечной ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Еще одним типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эпизомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, непизомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом-хозяином.

Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы именуется в настоящем описании как «рекомбинантные векторы экспрессии» (или просто «векторы экспрессии»). Как правило, векторы экспрессии, используемые в технологиях рекомбинантных ДНК, часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании «плазида» и «вектор» могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако предполагается, что изобретение включает в себя такие другие формы векторов экспрессии, как вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции. В этом конкретном контексте термин «функционально связанный» относится к функциональной взаимосвязи между двумя или более полинуклеотидными (например, ДНК) сегментами. Как правило, это относится к функциональному отношению транскрипционной регуляторной последовательности к транскрибируемой последовательности. Например, последовательность промотора или энхансера функционально связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой системе экспрессии. Как правило, транскрипционные регуляторные последовательности промоторов, которые функционально связаны с транскрибируемой последовательностью, являются физически смежными с транскрибируемой последовательностью, т.е. они действуют в cis-положении. Однако некоторые транскрипционные регуляторные последовательности, такие как энхансеры, не обязательно должны быть физически смежными или располагаться в непосредственной близости от кодирующих последовательностей, транскрипцию которых они усиливают.

Различные векторы экспрессии могут быть использованы для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих цепи мультиспецифических антител или фрагменты связывания. Как вирусные, так и невирусные векторы экспрессии могут быть использованы для продуцирования антител в клетке-хозяине млекопитающего. Невирусные векторы и системы включают плазмиды, эписомальные векторы, обычно с кассетой экспрессии для экспрессии белка или РНК, и искусственные хромосомы человека (см. например, Harrington et al., *Nat Genet.* 15:345, 1997). Например, невирусные векторы, полезные для экспрессии CD137-связывающих полинуклеотидов и полипептидов в клетках млекопитающих (например, человека), включают pThioHis A, B и C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B и C (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), векторы MPS V и многочисленные другие векторы, известные в данной области техники для экспрессии других белков. Полезные вирусные векторы включают векторы на основе ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, векторы на основе SV40, вируса папилломы, вируса Эпштейна-Барра НВР, векторы на основе вируса осповакцины и вируса леса Семлики (SFV). См. Brent et al., *supra*; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807, 1995; и Rosenfeld et al., *Cell* 68: 143, 1992.

Выбор вектора экспрессии зависит от предполагаемых клеток-хозяев, в которых этот вектор должен быть экспрессирован. Как правило, векторы экспрессии содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидами, кодирующими цепь или фрагмент мультиспецифического антитела. В одном варианте осуществления индуцибельный промотор используется для предотвращения экспрессии встроенных последовательностей в отсутствие индуцирующих условий. Индуцируемые промоторы включают в себя, например, арабинозу, *lacZ*, металлотионеиновый промотор или промотор теплового шока. Культуры трансформированных организмов могут расти в неиндуцирующих условиях без смещения популяции для кодирующих последовательностей, продукты экспрессии которых лучше переносятся клетками-хозяевами. В дополнение к промоторам также могут быть необходимы или желательны другие регуляторные элементы для эффективной экспрессии цепи или фрагмента мультиспецифического антитела. Эти элементы обычно включают в себя иницирующий кодон ATG и смежный сайт связывания рибосом или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии может быть повышена путем включения энхансеров, подходящих для используемой клеточной системы (см., например, Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20: 125, 1994; и Bittner et al., *Meth. Enzymol.*, 153:516, 1987). Например, энхансер SV40 или энхансер CMV можно использовать для увеличения экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих.

Векторы экспрессии также могут обеспечивать положение сигнальной последовательности секрета для образования белка слияния с полипептидами, кодируемыми встроенным мультиспецифическим антителом по изобретению или его фрагментами, или последовательностями его доменов связывания. Чаще всего включенные мультиспецифические антитела по изобретению или их фрагменты, или последовательности их доменов связывания связывают с сигнальными последовательностями перед включением в вектор. Векторы, используемые для получения последовательностей, кодирующих домены связывания переменных доменов легкой и тяжелой цепи мультиспецифического антитела, иногда также кодируют константные области или их части. Такие векторы позволяют экспрессировать переменные области в виде белков слияния с константными областями, что приводит к образованию интактных антител и их антигенсвязывающих фрагментов. Как правило, такие константные области являются человеческими.

Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») относится к клетке, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной клетки-субъекта, но и потомства такой клетки. Поскольку определенные модификации могут происходить в последующих поколениях из-за мутации или влияния окружающей среды, такое потомство может фактически не быть идентичным родительской клетке, но все же включено в значение термина «клетка-хозяин» в контексте настоящего описания.

Клетки-хозяева для удержания и экспрессии мультиспецифических антител по изобретению или их фрагментов, или их доменов связывания могут быть либо прокариотическими, либо эукариотическими. *E. coli* является одним прокариотическим хозяином, полезным для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие микробные хозяева, подходящие для использования, включают бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. В этих прокариотических хозяевах также можно создавать векторы экспрессии, которые обычно содержат последовательности контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, точка начала репликации). Кроме того, будет присутствовать любое количество различных хорошо известных промоторов, таких как система промоторов лактозы, система промоторов триптофана (*trp*), система промоторов бета-лактамазы или система промоторов из фага лямбда. Промоторы обычно контролируют экспрессию, необязательно с последовательностью оператора, и имеют последовательности сайта связывания рибосом и т.п. для инициации и завершения транскрипции и трансляции. Другие микробы, такие как

дрожжи, также могут быть использованы для экспрессии CD137-связывающих полипептидов по изобретению. Также могут быть использованы клетки насекомых в сочетании с бакуловирусными векторами.

В одном варианте осуществления клетки-хозяева млекопитающих используют для экспрессии и продуцирования мультиспецифического антитела по изобретению или его фрагментов или его доменов связывания. Например, они могут представлять собой либо клеточную линию гибридомы, экспрессирующую гены эндогенного иммуноглобулина, либо клеточную линию млекопитающего, несущую вектор экзогенной экспрессии. Они включают в себя любую нормальную мортальную или нормальную или аномальную иммортальную клетку животного или человека. Например, был разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, включая линии клеток CHO, различные линии клеток Cos, клетки HeLa, линии клеток миеломы, трансформированные В-клетки и гибридомы. Использование культуры клеточных тканей млекопитающих для экспрессии полипептидов в общих чертах рассмотрено, например, в Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Векторы экспрессии для клеток-хозяев млекопитающих могут включать в себя последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen et al., Immunol. Rev. 89: 49-68, 1986), и необходимые сайты обработки информации, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и транскрипционные последовательности терминатора. Эти векторы экспрессии обычно содержат промоторы, полученные из генов млекопитающих или вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут быть конститутивными, специфичными для типа клеток, специфичными для стадии и/или модулируемыми или регулируемыми. Полезные промоторы включают в себя, среди прочего, металлотронеинный промотор, конститутивный главный поздний промотор аденовируса, индуцируемый дексаметазоном промотор MMTV, промотор SV40, промотор MRP polIII, конститутивный промотор MPS V, индуцируемый тетрациклином промотор CMV (такой как человеческий немедленно-ранний промотор CMV), конститутивный промотор CMV и комбинации промотор-энхансер, известные в данной области техники.

Способы введения векторов экспрессии, содержащих интересующие полинуклеотидные последовательности, варьируют в зависимости от типа клетки-хозяина. Например, трансфекцию хлоридом кальция обычно используют для прокариотических клеток, тогда как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно использовать для других клеток-хозяев. (см. в целом Sambrook, et al., et al., supra). Другие способы

включают, например, электропорацию, обработку фосфатом кальция, опосредованную липосомами трансформацию, инъекцию и микроинъекцию, баллистические методы, вирусомы, иммунолипсомы, конъюгаты поликатионуклеиновой кислоты, голую ДНК, искусственные вирионы, слияние со структурным белком вируса герпеса VP22 (Elliot and O'Hare, Cell 88:223, 1997), усиленное агентом поглощение ДНК и трансдукцию *ex vivo*. Для долгосрочного и высокоэффективного производства рекомбинантных белков часто требуется стабильная экспрессия. Например, клеточные линии, которые стабильно экспрессируют мультиспецифическое антитело по изобретению или его фрагменты, или его домены связывания, могут быть получены с использованием векторов экспрессии по изобретению, которые содержат вирусные точки начала репликации или эндогенные элементы экспрессии и ген селективируемого маркера. После введения вектора клеткам можно дать расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде перед переключением их на селективную среду. Селективируемый маркер служит для придания устойчивости к селекции, и его присутствие обеспечивает рост клеток, которые успешно экспрессируют введенные последовательности в селективных средах. Устойчивые, стабильно трансфицированные клетки можно размножать, используя методы культивирования тканей, соответствующие типу клеток. Таким образом, настоящее изобретение предоставляет способ получения антитела по изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, при этом указанный способ включает этап культивирования клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту или вектор, кодирующий антитело по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, в результате чего указанное антитело по изобретению или его фрагмент экспрессируется.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения мультиспецифического антитела по изобретению или его связывающего домена, или его фрагмента, при этом способ включает этап культивирования клетки-хозяина, экспрессирующей нуклеиновую кислоту, кодирующую мультиспецифическое антитело по изобретению или его связывающий домен, или его фрагмент.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители дополняют или стабилизируют композицию, или облегчают приготовление композиции. Фармацевтически приемлемые носители включают в себя растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми.

Фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить различными способами, известными в данной области техники. Путь и/или способ введения зависит от желаемых результатов. Введение может быть внутривенным, внутримышечным, внутривнутрибрюшинным или подкожным, или близко к участку мишени. Фармацевтически приемлемый носитель должен подходить для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения активное вещество, то есть мультиспецифическое антитело по изобретению, может быть покрыто материалом для защиты вещества от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать указанное вещество.

Фармацевтические композиции по изобретению могут быть получены в соответствии со способами, хорошо известными и обычно применяемыми в данной области техники. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; и Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Фармацевтические композиции предпочтительно изготавливают в условиях соответствия GMP. Как правило, терапевтически эффективная доза или эффективная доза мультиспецифического антитела по изобретению используется в фармацевтических композициях по изобретению. Мультиспецифические антитела по изобретению вводят в состав фармацевтически приемлемых дозированных лекарственных форм обычными способами, известными специалистам в данной области техники. Режимы дозирования корректируют для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, может быть введен один болюс, могут быть введены несколько отдельных доз с течением времени или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена, в зависимости от терапевтической ситуации. Особое преимущество заключается в составлении парентеральных композиций в единицах дозирования для простоты введения и однородности дозировки. Используемая в настоящем изобретении единичная дозированная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве однократных дозировок для проходящих лечение пациентов; каждая единица содержит заранее заданное количество активного вещества, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем.

Фактические уровни дозирования активных ингредиентов в фармацевтических композициях по изобретению можно варьировать, чтобы получить такое количество активного ингредиента, которое будет эффективно для достижения желаемого

терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозирования зависит от множества фармакокинетических факторов, включая активность веществ конкретных используемых композиций по настоящему изобретению или их эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого вещества, продолжительности лечения, других лекарственных препаратов, веществ и/или материалов, используемых в комбинации с конкретными используемыми композициями, возрастом, полом, массой тела, состоянием, общим состоянием здоровья и анамнезом получающего лечение пациента, которого лечат, и других подобных факторов.

Мультиспецифическое антитело по изобретению обычно вводят несколько раз. Интервалы между однократными дозами могут быть еженедельными, ежемесячными или ежегодными. Интервалы также могут быть нерегулярными, как указано путем измерения уровней мультиспецифических антител по изобретению у пациента в крови. Альтернативно мультиспецифическое антитело по изобретению можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируется в зависимости от периода полужизни антитела у пациента. В целом, гуманизированные антитела имеют более длительный период полужизни, чем химерные и нечеловеческие антитела. Дозировка и частота введения может варьироваться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических целях относительно низкие дозы вводят с относительно редкими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца своей жизни. В терапевтических целях иногда требуется введение относительно высокой дозы с относительно короткими интервалами, пока прогрессирование заболевания не уменьшится или не прекратится, и предпочтительно, пока пациент не покажет частичное или полное улучшение симптомов заболевания. После этого пациенту может быть назначен профилактический режим.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению для применения в качестве лекарственного средства. В подходящем варианте осуществления настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу или фармацевтической композиции для применения при лечении пролиферативного заболевания, в частности рака у пациента, нуждающегося в таком лечении.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к мультиспецифическому антителу или фармацевтической композиции для применения в производстве лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания, в частности рака.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению мультиспецифического антитела или фармацевтической композиции для лечения пролиферативного заболевания, в частности рака, у пациента, нуждающегося в таком лечении.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению мультиспецифического антитела или фармацевтической композиции в производстве лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания, в частности рака, у пациента, нуждающегося в таком лечении.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, включающему в себя введение пациенту терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела по настоящему изобретению. В подходящем варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения пролиферативного заболевания, в частности рака, у субъекта, включающему в себя введение субъекту терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела по настоящему изобретению.

Термин «субъект» включает в себя человека и животных, отличных от человека. Животные, отличные от человека, включают в себя всех позвоночных животных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, отличные от человека, овцы, собаки, коровы, куры, земноводные и рептилии. Если не указано иное, термины «пациент» или «субъект» используются в настоящем описании взаимозаменяемо.

Термины «лечение», «лечащий», «лечить», «получивший лечение» и т.п., используемые в настоящем документе, относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения от заболевания и/или нежелательного явления, связанного с заболеванием, или замедления прогрессирования заболевания. Термин «лечение» в контексте настоящего описания охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, например, у человека, и включает в себя: (a) ингибирование заболевания, т.е. прекращение его развития, и (b) облегчение заболевания, т.е. регрессия заболевания.

Термин «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» относится к количеству агента, которого при введении млекопитающему или другому субъекту для лечения заболевания достаточно для достижения лечения такого заболевания. «Терапевтически эффективное количество» будет варьироваться в

зависимости от агента, заболевания и степени его тяжести, а также возраста, массы тела и т.п. подлежащего лечению субъекта.

В одном варианте осуществления пролиферативным заболеванием является рак. Термин «рак» относится к заболеванию, характеризующемуся быстрым и неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в другие части тела. Термины «опухоль» и «рак» используются в настоящем описании взаимозаменяемо, например, оба термина охватывают солидные и жидкие, например, диффузные или циркулирующие, опухоли. В контексте настоящего изобретения термин «рак» или «опухоль» включает в себя предраковые, а также злокачественные образования и опухоли. Термин «рак» в контексте настоящего изобретения используется для обозначения широкого спектра опухолей, включая все солидные и гематологические злокачественные новообразования. Примеры таких опухолей включают, помимо прочего: доброкачественную или особенно злокачественную опухоль, солидные опухоли, рак головного мозга, рак почки, рак печени, рак надпочечника, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак желудка (например, опухоли желудка), рак пищевода, рак яичника, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак простаты, рак поджелудочной железы, рак легких (например, немелкоклеточный рак легких и мелкоклеточный рак легких), рак влагалища, рак щитовидной железы, меланома (например, неоперабельная или метастатическая меланома), почечно-клеточный рак (карцинома), саркома, глиобластома, множественная миелома или рак желудочно-кишечного тракта, особенно рак толстой кишки или колоректальная аденома, опухоль шеи и головы, рак эндометрия, синдром Каудена, болезнь Лермитта-Дуклоса, синдром Банная-Зонана, увеличение предстательной железы, неоплазия, особенно эпителиального характера, предпочтительно рак молочной железы или плоскоклеточный рак, хронический лимфолейкоз, хронический миелогенный лейкоз (например, Ph-положительный хронический миелолейкоз), острый лимфобластный лейкоз (например, Ph-положительный острый лимфобластный лейкоз), неходжкинская лимфома, плазмноклеточная миелома, лимфома Ходжкина, лейкоз и любая их комбинация. В предпочтительном варианте осуществления рак представляет собой рак легкого, предпочтительно немелкоклеточный рак легкого (NSCLC). В другом варианте осуществления указанный рак представляет собой колоректальный рак.

Мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению или композиция по настоящему изобретению ингибирует рост солидных опухолей, а также жидких опухолей. В еще одном варианте осуществления пролиферативным заболеванием является солидная опухоль. Термин «солидная опухоль» особенно означает рак молочной железы, рак

яичника, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак предстательной железы, рак желудка (особенно рак ЖКТ), рак шейки матки, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого и мелкоклеточный рак легкого) и опухоль головы и шеи. Кроме того, в зависимости от типа опухоли и конкретной используемой комбинации может быть получено уменьшение объема опухоли. Мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению или композиция по настоящему изобретению также подходит для предотвращения метастатического распространения опухолей и роста или развития микрометастазов у субъекта, имеющего рак.

В одном варианте осуществления указанный рак является PDL1-позитивным, предпочтительно в котором указанный рак экспрессирует высокие уровни PDL1 по сравнению со здоровой тканью, в частности в котором указанный рак экспрессирует PDL1 (мРНК или белок) по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 60 раз, по меньшей мере в 70 раз, по меньшей мере в 80 раз, по меньшей мере в 90 раз, по меньшей мере в 100 раз сильнее по сравнению с экспрессией PDL1 (мРНК или белок соответственно) в здоровой ткани. В некоторых вариантах осуществления указанный рак является злокачественным. В некоторых вариантах осуществления указанный рак является доброкачественным. В некоторых вариантах осуществления указанный рак является первичным. В некоторых вариантах осуществления указанный рак является вторичным. В одном варианте осуществления указанный рак представляет собой рак легкого, предпочтительно немелкоклеточный рак легкого (NSCLC). В другом варианте осуществления указанный рак представляет собой колоректальный рак.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к набору, включающему в себя мультиспецифическое антитело по изобретению или фармацевтическую композицию по изобретению. В набор могут входить один или несколько других элементов, в том числе: инструкция по применению; другие реагенты, например, метка, терапевтический агент или агент, полезный для хелатирования или иного связывания антитела с меткой, или терапевтическим агентом, или радиопротекторной композицией; устройства или другие материалы для приготовления молекулы антитела для введения; фармацевтически приемлемые носители; устройства или другие материалы для введения субъекту. В конкретном варианте осуществления набор включает в себя мультиспецифическое антитело по изобретению в фармацевтически эффективном количестве. В еще одном

варианте осуществления набор включает в себя фармацевтически эффективное количество мультиспецифического антитела по изобретению в лиофилизированной форме и разбавитель и необязательно инструкцию по применению. Указанный набор может также содержать фильтрующую иглу для восстановления и иглу для инъекции.

Примеры доменов связывания CD137 по настоящему изобретению (остатки CDR показаны «жирным» шрифтом и курсивом)

SEQ ID номер	Область Ab	Последовательность
38-02-A04		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (H27-H42; нумерация AHo)	GFSFSNSYWIC
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (H57-H76; нумерация AHo)	CTFVGSSDSTYYANWAKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (H108-H138; нумерация AHo)	RHPSDAVYGYANNL
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Определение от AHo) (38-02-A04 sc01) (38-02-A04 sc05 IF)	VSGFSGNSYW
SEQ ID NO: 5	HCDR1 (Определение от AHo) (38-02-A04 sc06 Full) (38-02-A04 sc13)	ASGFSFSNSYW
SEQ ID NO: 6	HCDR2 (Определение от AHo)	TFVGSSDSTYYANWAKGR
SEQ ID NO: 7	HCDR3 (Определение от AHo)	HPSDAVYGYANN
SEQ ID NO: 8	HCDR1 (Определение от Kabat)	NSYWIC
SEQ ID NO: 9	HCDR2 (Определение от Kabat)	CTFVGSSDSTYYANWAKG
SEQ ID NO: 10	HCDR3 (Определение от Kabat)	HPSDAVYGYANNL
SEQ ID NO: 11	HCDR1 (Определение от Chothia)	GFSFSNSY

SEQ ID NO: 12	HCDR2 (Определение от Chothia)	VGSSD
SEQ ID NO: 13	HCDR3 (Определение от Chothia)	PSDAVYGYANN
SEQ ID NO: 14	VH(VH4) (38-02-A04 sc01)	<i>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSNSYWICWVRQPPGKGLEWIGCTFV GSSDSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHPSDAVY GYANNLWGQGTLLTVSS</i>
SEQ ID NO: 15	VH (VH4) (38-02-A04 sc05 IF) Мутации VH: I44V; F89V; Y105F.	<i>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSNSYWICWVRQPPGKGLEWIGCTFV GSSDSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQVSLKLSVTAADTAVYFCARHPSDAVY GYANNLWGQGTLLTVSS</i>
SEQ ID NO: 16	VH (VH4) (38-02-A04 sc06 Full) Мутации VH: V25A; I44V; V82K; F89V; Y105F	<i>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKASGFSFSNSYWICWVRQPPGKGLEWIGCTFV GSSDSTYYANWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLSVTAADTAVYFCARHPSDAVY GYANNLWGQGTLLTVSS</i>
SEQ ID NO: 17	VH (VH3) (38-02-A04 sc13) Мутации VH: G51C (нумерация AHo)	<i>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSNSYWICWVRQAPGKCLEWIGCTF VGSSDSTYYANWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARHPSDAV YGYANNLWGQGTLLTVSS</i>
SEQ ID NO: 18	LCDR1 (L24-L42; нумерация AHo) (Определение от Kabat)	QASQSINNVLA
SEQ ID NO: 19	LCDR2 (L58-L72; нумерация AHo) (Определение от Kabat)	RASTLAS
SEQ ID NO: 20	LCDR3 (L107-L138; нумерация AHo) (Определение от Kabat)	QSSYGNYGD
SEQ ID NO: 21	LCDR1 (Определение от AHo)	ASQSINNV

SEQ ID NO: 22	LCDR2 (Определение от АНо)	RASTLASGVPSR
SEQ ID NO: 23	LCDR3 (Определение от АНо)	SYGNYG
SEQ ID NO: 24	LCDR1 (Определение от Chothia)	SQSINNV
SEQ ID NO: 25	LCDR2 (Определение от Chothia)	RAS
SEQ ID NO: 26	LCDR3 (Определение от Chothia)	SYGNYG
SEQ ID NO: 27	VL (Vk1-sk17) (38-02-A04 sc01)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQSINNV</i> LAWYQQKPGKAPKLLIY <i>RASTL</i> ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <i>QSSYGNYG</i> DFGTGKVTVLG
SEQ ID NO: 28	VL (Vk1-sk17) (38-02-A04 sc05 IF) Мутации VL: A51P	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQSINNV</i> LAWYQQKPGKPPKLLIY <i>RASTLA</i> SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <i>QSSYGNYG</i> DFGTGKVTVLG
SEQ ID NO: 29	VL (Vk1-sk17) (38-02-A04 sc06 Full) Мутации VL: I2L; A51P	DLQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQSINNV</i> LAWYQQKPGKPPKLLIY <i>RASTL</i> ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <i>QSSYGNYG</i> DFGTGKVTVLG
SEQ ID NO: 30	VL (Vk1-sk17) (38-02-A04 sc13) Мутации VL: T141C (нумерация АНо)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQSINNV</i> LAWYQQKPGKAPKLLIY <i>RASTL</i> ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <i>QSSYGNYG</i> DFGCGTKVTVLG
SEQ ID NO: 31	scFv (VL-линкер-VH) (38-02-A04 sc01)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQSINNV</i> LAWYQQKPGKAPKLLIY <i>RASTL</i> ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <i>QSSYGNYG</i> DFGTGKVTVLGG GGSGGGGGSGGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSNSYW ICWIRQPPGKGLEWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSST AADTAVYYCARHPSDAVYGYANNLWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 32	scFv (VL-линкер-VH) (38-02-A04 sc05 IF)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQSINNV</i> LAWYQQKPGKPPKLLIY <i>RASTL</i> SGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC <i>QSSYGNYG</i> DFGTGKVTVLGGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSG <i>F</i> SFSNSYWI CWVRQPPGKGLEWIGCTFV <i>GSSDSTYYANWAK</i> GRVTISVDSSKNQVSLKLSSV TAADTAVYFCAR <i>HPSDAVYGYANNL</i> WGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 33	scFv (VL-линкер-VH)(38-02- A04 sc06 Full)	DLQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQSINNV</i> LAWYQQKPGKPPKLLIY <i>RASTL</i> ASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC <i>QSSYGNYG</i> DFGTGKVTVLGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKAS <i>G</i> F <i>S</i> FNSYW ICWVRQPPGKGLEWIGCTFV <i>GSSDSTYYANWAK</i> GRVTISKDSSKNQVSLKLSSV TAADTAVYFCAR <i>HPSDAVYGYANNL</i> WGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 34	scFv (VL-линкер-VH) (38-02-A04 sc13)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQSINNV</i> LAWYQQKPGKAPKLLIY <i>RASTL</i> ASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC <i>QSSYGNYG</i> DFGCGTKVTVLGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <i>G</i> F <i>S</i> FNSY WICWVRQAPGKCLEWIGCTFV <i>GSSDSTYYANWAK</i> GRFTISRDNKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCAR <i>HPSDAVYGYANNL</i> WGQGLVTVSS
38-27-C05 sc01		
SEQ ID NO: 35	HCDR1 (H27-H42; нумерация AHo)	GFSFNNDYDMC
SEQ ID NO: 36	HCDR2 (H57-H76; нумерация AHo)	CIDTGDGSTYYASWAKG
SEQ ID NO: 37	HCDR3 (H108-H138; нумерация AHo)	REAASSSGYGMGYFDL
SEQ ID NO: 38	HCDR1 (Определение от AHo)	VSGFSFNNDYD
SEQ ID NO: 39	HCDR2 (Определение от AHo)	IDTGDGSTYYASWAKGR
SEQ ID NO: 40	HCDR3 (Определение от AHo)	EAASSSGYGMGYFD
SEQ ID NO: 41	HCDR1 (Определение от Kabat)	NDYDMC
SEQ ID NO: 42	HCDR2 (Определение от Kabat)	CIDTGDGSTYYASWAKG

SEQ ID NO: 43	HCDR3 (Определение от Kabat)	EAASSSGYGMGYFDL
SEQ ID NO: 44	HCDR1 (Определение от Chothia)	GFSFNNDY
SEQ ID NO: 45	HCDR2 (Определение от Chothia)	TGDG
SEQ ID NO: 46	HCDR3 (Определение от Chothia)	AASSSGYGMGYFD
SEQ ID NO: 47	VH (VH4)	QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCKVSGFSFNNDYDMCWIRQPPGKGLEWIGCID TGDGSTYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAREAAASSSGY GMGYFDLWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 48	LCDR1 (L24-L42; нумерация AHo) (Определение от Kabat)	QSSQSVYDNNWLA
SEQ ID NO: 49	LCDR2 (L58-L72; нумерация AHo) (Определение от Kabat)	RASNLAS
SEQ ID NO: 50	LCDR3 (L107-L138; нумерация AHo) (Определение от Kabat)	QGTYLSSNWWYA
SEQ ID NO: 51	LCDR1 (Определение от AHo)	SSQSVYDNNW
SEQ ID NO: 52	LCDR2 (Определение от AHo)	RASNLAGVPSR
SEQ ID NO: 53	LCDR3 (Определение от AHo)	TYLSSNWWY
SEQ ID NO: 54	LCDR1 (Определение от Chothia)	SQSVYDNNW
SEQ ID NO: 55	LCDR2 (Определение от Chothia)	RAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (Определение от Chothia)	TYLSSNWWY

SEQ ID NO: 57	VL (Vkl-sk17)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QSSQSVYDNNW LAWYQQKPGKAPKLLIY RAS N LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QGTYLSSN WYWAFGTGTK VTVLG
SEQ ID NO: 58	scFv (VL-липкер-VH)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QSSQSVYDNNW LAWYQQKPGKAPKLLIY RAS N LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QGTYLSSN WYWAFGTGTK VTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSG FS FNNDYDMC WIRQPPGKGLEWIG CIDTGDGSTYYASWAKGR VTISVDSSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYC AREAASSSGYGMGYFDL WGQGTLVTVSS
38-27-A11		
SEQ ID NO: 59	HCDR1 (H27-H42; нумерация AHo)	GFSFSANYPC
SEQ ID NO: 60	HCDR2 (H57-H76; нумерация AHo)	CIYGGSSDITYDANWTK
SEQ ID NO: 61	HCDR3 (H108-H138; нумерация AHo)	RSAWYSGWGGDL
SEQ ID NO: 62	HCDR1 (Определение от AHo)	ASGFSFSANY
SEQ ID NO: 63	HCDR2 (Определение от AHo)	IYGGSSDITYDANWTKG
SEQ ID NO: 64	HCDR3 (Определение от AHo)	SAWYSGWGGD
SEQ ID NO: 65	HCDR1 (Определение от Kabat)	ANYPC
SEQ ID NO: 66	HCDR2 (Определение от Kabat)	CIYGGSSDITYDANWTK
SEQ ID NO: 67	HCDR3 (Определение от Kabat)	SAWYSGWGGDL
SEQ ID NO: 68	HCDR1 (Определение от Chothia)	GFSFSANY
SEQ ID NO: 69	HCDR2 (Определение от Chothia)	GGSS
SEQ ID NO: 70	HCDR3 (Определение от Chothia)	AWYSGWGGD

SEQ ID NO: 71	VH (VH3) (38-27-A11 sc02)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFSANY PCWVRQAPGKGLEWIGCIY GGSSDITYDANWTK GRFTISRDNKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYC CARSAWYSG WGGDLWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 72	VH (VH3) (38-27-A11 sc03)	ESQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFSANY PCWVRQAPGKGLEWIGCIY GGSSDITYDANWTK GRFTISRDNKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFC CARSAWYSG WGGDLWGPGTLTVTVSS
SEQ ID NO: 73	VH (VH3) (38-27-A11 sc07) (G51C)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFSANY PCWVRQAPGKCLEWIGCIY GGSSDITYDANWTK GRFTISRDNKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYC CARSAWYSG WGGDLWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 74	LCDR1 (L24-L42; нумерация АНо) (Определение от Kabat)	QASQISISNRLA
SEQ ID NO: 75	LCDR2 (L58-L72; нумерация АНо) (Определение от Kabat)	SASTLAS
SEQ ID NO: 76	LCDR3 (L107-L138; нумерация АНо) (Определение от Kabat)	QSTYYGNDGNA
SEQ ID NO: 77	LCDR1 (Определение от АНо)	ASQISISNR
SEQ ID NO: 78	LCDR2 (Определение от АНо)	SASTLASGVPSR
SEQ ID NO: 79	LCDR3 (Определение от АНо)	TYYGNDGN
SEQ ID NO: 80	LCDR1 (Определение от Chothia)	SQISISNR
SEQ ID NO: 81	LCDR2 (Определение от Chothia)	SAS
SEQ ID NO: 82	LCDR3 (Определение от Chothia)	TYYGNDGN

SEQ ID NO: 83	VL (Vk1-sk17) (38-27-A11 sc02)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <i>QASQ</i> SI <i>NRLAWY</i> QQKPGKAPKLLIY <i>SASTLA</i> SGVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYC <i>QSTYYGNDGNA</i> FGTGTKVTVLG
SEQ ID NO: 84	VL (Vk1-sk17) (38-27-A11 sc03)	DFQLTQSPSSLSASVGDRVITTC <i>QASQ</i> SI <i>NRLAWY</i> QQKPGKPPKLLIY <i>SASTLA</i> SGVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYC <i>QSTYYGNDGNA</i> FGTGTKVTVLG
SEQ ID NO: 85	VL (Vk1-sk17) (38-27-A11 sc07) (T141C)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <i>QASQ</i> SI <i>NRLAWY</i> QQKPGKAPKLLIY <i>SASTLA</i> SGVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQSTYYGNDGNAFGCGTKVTVL G
SEQ ID NO: 86	scFv (VL-линкер-VH) (38-27-A11 sc02) (PRO1359)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <i>QASQ</i> SI <i>NRLAWY</i> QQKPGKAPKLLIY <i>SASTLA</i> SGVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYC <i>QSTYYGNDGNA</i> FGTGTKVTVLG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <i>GFSFSAN</i> <i>YPCWVRQAPGKGLEWIGCIYGGSSDITYDANWTKGRFTISRDN</i> SKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYC <i>CARSAWYSGWGGDLWGQGLTVTVSS</i>
SEQ ID NO: 87	scFv (VL-линкер-VH) (38-27-A11 sc03) (PRO1360)	DFQLTQSPSSLSASVGDRVITTC <i>QASQ</i> SI <i>NRLAWY</i> QQKPGKPPKLLIY <i>SASTLA</i> SGVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYC <i>QSTYYGNDGNA</i> FGTGTKVTVLG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSESQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <i>GFSFSANY</i> <i>YPCWVRQAPGKGLEWIGCIYGGSSDITYDANWTKGRFTISRDN</i> SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYFC <i>CARSAWYSGWGGDLWGPGLTVTVSS</i>
SEQ ID NO: 88	scFv (VL-линкер-VH) (38-27-A11 sc07) (VL-T141C; VH-G51C) (PRO1704)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <i>QASQ</i> SI <i>NRLAWY</i> QQKPGKAPKLLIY <i>SASTLA</i> SGVPSRFSGSGSGTDFLTITISLQPEDFATYYC <i>QSTYYGNDGNA</i> FGCGTKVTVL GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <i>GFSFSA</i> <i>NYYPCWVRQAPGKCLEWIGCIYGGSSDITYDANWTKGRFTISRDN</i> SKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYC <i>CARSAWYSGWGGDLWGQGLTVTVSS</i>

Примеры доменов связывания PDL1 по настоящему изобретению (остатки CDR показаны «жирным» шрифтом и курсивом)

SEQ ID номер	Область Ab	Последовательность
37-20-B03		
SEQ ID NO: 89	HCDR1 (H27-H42; нумерация AHo)	GFSFNSDYWIY
SEQ ID NO: 90	HCDR2 (H57-H76; нумерация AHo)	SIYGGSSGNTQYASWAQG
SEQ ID NO: 91	HCDR3 (H108-H138; нумерация AHo)	RGYVDYGGATDL
SEQ ID NO: 92	HCDR1 (Определение от AHo) (37-20-B03 sc01)	VSGFSFNSDYW
SEQ ID NO: 93	HCDR1 (Определение от AHo) (37-20-B03 sc02) (37-20-B03 sc09.1)	ASGFSFNSDYW
SEQ ID NO: 94	HCDR2 (Определение от AHo)	IYGGSSGNTQYASWAQGR
SEQ ID NO: 95	HCDR3 (Определение от AHo)	GYVDYGGATD
SEQ ID NO: 96	HCDR1 (Определение от Kabat)	SDYWIY
SEQ ID NO: 97	HCDR2 (Определение от Kabat)	SIYGGSSGNTQYASWAQG
SEQ ID NO: 98	HCDR3 (Определение от Kabat)	GYVDYGGATDL
SEQ ID NO: 99	HCDR1 (Определение от Chothia)	GFSFNSDY
SEQ ID NO: 100	HCDR2 (Определение от Chothia)	GGSSG

SEQ ID NO: 101	HCDR3 (Определение от Chothia)	YVDYGGATD
SEQ ID NO: 102	VH (VH4) (37-20-B03 sc01)	<i>QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFNSDYWYIWIRQPPGKGLEWIGSIYG GSSGNTQYASWAQGRVTISVDSSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGYVDYGG ATDLWGQGTLTVSS</i>
SEQ ID NO: 103	VH (VH1) (37-20-B03 sc02)	<i>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSFNSDYWYIWVRQAPGQGLEWMGSI YGGSSGNTQYASWAQGRVTMTRDTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYVDY GGATDLWGQGTLTVSS</i>
SEQ ID NO: 104	VH (VH3) (37-20-B03 sc09.1) Мутации: G56A; Y105F	<i>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFNSDYWYIWVRQAPGKGLEWIASIY GGSSGNTQYASWAQGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYFCARGYVDY GGATDLWGQGTLTVSS</i>
SEQ ID NO: 105	LCDR1 (L24-L42; нумерация AHo) (Определение от Kabat)	QASQSIGTYLA
SEQ ID NO: 106	LCDR2 (L58-L72; нумерация AHo) (Определение от Kabat)	RAFILAS
SEQ ID NO: 107	LCDR3 (L107-L138; нумерация AHo) (Определение от Kabat)	QSNFYSDSTTIGPNA
SEQ ID NO: 108	LCDR1 (Определение от AHo)	ASQSIGTY
SEQ ID NO: 109	LCDR2 (Определение от AHo)	RAFILASGVPSR
SEQ ID NO: 110	LCDR3 (Определение от AHo)	NFYSDSTTIGPN
SEQ ID NO: 111	LCDR1 (Определение от Chothia)	SQSIGTY
SEQ ID NO: 112	LCDR2 (Определение от Chothia)	RAF
SEQ ID NO: 113	LCDR3 (Определение от Chothia)	NFYSDSTTIGPN

SEQ ID NO: 114	VL (Vk1-sk17) (37-20-B03 sc01) (37-20-B03 sc02)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQSIGTYLAWYQQKPGKAPKLLIYRAFILE</i> <i>SGVPSRFSGSGSGTDFLT</i> TISSLQPEDFATYYC <i>QSNFYSDSTTIGPNA</i> FGTGTKVT VLG
SEQ ID NO: 115	VL (Vk1-sk17) (37-20-B03 sc09.1) Мутации: S9A; A51P	DIQMTQSPASLSASVGDRVTITC <i>QASQSIGTYLAWYQQKPGKPPKLLIYRAFILE</i> <i>SGVPSRFSGSGSGTDFLT</i> TISSLQPEDFATYYC <i>QSNFYSDSTTIGPNA</i> FGTGTKVT VLG
SEQ ID NO: 116	scFv (VL-линкер-VH) (37-20-B03 sc01) (PRO997)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQSIGTYLAWYQQKPGKAPKLLIYRAFILE</i> <i>SGVPSRFSGSGSGTDFLT</i> TISSLQPEDFATYYC <i>QSNFYSDSTTIGPNA</i> FGTGTKVT VLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGF <i>FSFN</i> <i>SDYWIY</i> WIRQPPGKGLEWIG <i>SIYGGSSGNTQYASWAQGR</i> VTISVDSSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYC <i>CARGYVDYGGATDLWGQ</i> GTLVTVSS
SEQ ID NO: 117	scFv (VL-линкер-VH) (37-20-B03 sc02) (PRO1013)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQSIGTYLAWYQQKPGKAPKLLIYRAFILE</i> <i>SGVPSRFSGSGSGTDFLT</i> TISSLQPEDFATYYC <i>QSNFYSDSTTIGPNA</i> FGTGTKVT VLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG <i>FS</i> <i>FNSDYWIY</i> WVRQAPGQGLEWMG <i>SIYGGSSGNTQYASWAQGR</i> VTMTRDTSIST AYMELSSLRSEDTAVYYC <i>CARGYVDYGGATDLWGQ</i> GTLVTVSS
SEQ ID NO: 118	scFv (VL-линкер-VH) (37-20-B03 sc09.1)	DIQMTQSPASLSASVGDRVTITC <i>QASQSIGTYLAWYQQKPGKPPKLLIYRAFILE</i> <i>ASGVPSRFSGSGSGTDFLT</i> TISSLQPEDFATYYC <i>QSNFYSDSTTIGPNA</i> FGTGTK VTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG <i>F</i> <i>SFNSDYWIY</i> WVRQAPGKGLEWIASIYGGSSGNTQYASWAQGRFTISRDN <i>SKN</i> TVYLQMNSLR AEDTAVYFCARGYVDYGGATDLWGQGTLVTVSS
33-03-G02		
SEQ ID NO: 119	HCDR1 (H27-H42; нумерация АНо)	GFSFSSGYDMC
SEQ ID NO: 120	HCDR2 (H57-H76; нумерация АНо)	CVVAGSVDITYYASWAKG
SEQ ID NO: 121	HCDR3 (H108-H138; нумерация АНо)	RKDAYSDAFNL
SEQ ID NO: 122	HCDR1 (Определение от АНо) (33-03-G02 sc01)	VSGFSFSSGYD

SEQ ID NO: 123	HCDR1 (Определение от AHo) (33-03-G02 sc03 Full) (33-03-G02 sc18)	ASGFSFSSGYD
SEQ ID NO: 124	HCDR2 (Определение от AHo)	VVAGSVDITYYASWAKGR
SEQ ID NO: 125	HCDR3 (Определение от AHo)	KDAYSDAFN
SEQ ID NO: 126	HCDR1 (Определение от Kabat)	SGYDMC
SEQ ID NO: 127	HCDR2 (Определение от Kabat)	CVVAGSVDITYYASWAKG
SEQ ID NO: 128	HCDR3 (Определение от Kabat)	KDAYSDAFNL
SEQ ID NO: 129	HCDR1 (Определение от Chothia)	GFSFSSGY
SEQ ID NO: 130	HCDR2 (Определение от Chothia)	AGSVD
SEQ ID NO: 131	HCDR3 (Определение от Chothia)	DAYSDAFN
SEQ ID NO: 132	VH (VH4) (33-03-G02 sc01)	<i>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVSGFSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVVAGSVDITYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYSDAFNLWGQGTTLTVSS</i>
SEQ ID NO: 133	VH (VH4) (33-03-G02 sc03 Full) (Мутации: V2S; V25A; I44V; G56A; V82K; F89V; Y105F)	<i>QSQLQESGPGLVKPSETLSLTCKASGFSFSSGYDMCWVRQPPGKGLEWIAICVVAGSVDITYYASWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLSSVTAADTAVYFCARKDAYSDAFNLWGQGTTLTVSS</i>
SEQ ID NO: 134	VH (VH4) (33-03-G02 sc18) Мутации VH: V25A; I44; G56A; V82K; F89V	<i>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKASGFSFSSGYDMCWVRQPPGKGLEWIAICVVAGSVDITYYASWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYSDAFNLWGQGTTLTVSS</i>

	(нумерация АНо)	
SEQ ID NO: 135	LCDR1 (L24-L42; нумерация АНо) (Определение от Kabat)	QASQSINDYLA
SEQ ID NO: 136	LCDR2 (L58-L72; нумерация АНо) (Определение от Kabat)	KASTLAS
SEQ ID NO: 137	LCDR3 (L107-L138; нумерация АНо) (Определение от Kabat)	QGGYITDIDNV
SEQ ID NO: 138	LCDR1 (Определение от АНо)	АНо: ASQSINDY
SEQ ID NO: 139	LCDR2 (Определение от АНо)	АНо: KASTLASGVPSR
SEQ ID NO: 140	LCDR3 (Определение от АНо)	АНо: GYITDIDN
SEQ ID NO: 141	LCDR1 (Определение от Chothia)	SQSINDY
SEQ ID NO: 142	LCDR2 (Определение от Chothia)	KAS
SEQ ID NO: 143	LCDR3 (Определение от Chothia)	GYITDIDN
SEQ ID NO: 144	VL (Vk1-sk17) (33-03-G02 sc01) (33-03-G02 sc18)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQSINDYLA</i> WYQQKPGKAPKLLIY <i>KASTLA</i> SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC <i>QGGYITDIDN</i> VFGTGTKVTVLG
SEQ ID NO: 145	VL (Vk1-sk17) (33-03-G02 sc03 Full) (Мутации VL: I2F; M4L; A51P)	DFQLTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQSINDYLA</i> WYQQKPGKSPKLLIY <i>KASTLA</i> SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC <i>QGGYITDIDN</i> VFGTGTKVTVLG

SEQ ID NO: 146	scFv (VL-линкер-VH) (33-03-G02 sc01) (PRO830)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLA</i> SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC <i>QGGYHITDIDNVFGTGTKVTVLG</i> GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSSGY <i>DMCWIRQPPGKGLEWIGCVVAGSV</i> <i>DITYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLS</i> VTAADTAVYYC <i>ARKDAYSDAFNLWGQGLTVTVSS</i>
SEQ ID NO: 147	scFv (VL-линкер-VH) (33-03-G02 sc03 Full)	DFQLTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQSINDYLAWYQQKPGKSPKLLIYKASTLA</i> SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC <i>QGGYHITDIDNVFGTGTKVTVLG</i> GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKASGFSFSSGY <i>DMCWVRQPPGKGLEWIA</i> <i>CVVAGSV</i> <i>DITYYASWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLS</i> SVTAADTAVYFC <i>ARKDAYSDAFNLWGQGLTVTVSS</i>
SEQ ID NO: 148	scFv (VL-линкер-VH) (33-03-G02 sc18)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLA</i> SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC <i>QGGYHITDIDNVFGTGTKVTVLG</i> GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKASGFSFSSGY <i>DMCWVRQPPGKGLEWIA</i> <i>CVVAGSV</i> <i>DITYYASWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLS</i> SVTAADTAVYYC <i>ARKDAYSDAFNLWGQGLTVTVSS</i>

ТАБЛИЦА 3

Примеры доменов связывания человеческого сывороточного альбумина по настоящему изобретению
(остатки CDR показаны «жирным» шрифтом и курсивом)

SEQ ID номер	Область Ab	Последовательность
19-01-H04 sc03		
SEQ ID NO: 149	HCDR1 (H27-H42; нумерация AHo)	GFSLSNAMG
SEQ ID NO: 150	HCDR2 (H57-H76; нумерация AHo)	IISVGGFTYYASWAKG
SEQ ID NO: 151	HCDR3 (H108-H138; нумерация AHo)	RDRHGGDSSGAFYL
SEQ ID NO: 152	HCDR1 (Определение от AHo)	ASGFSLSNA

SEQ ID NO: 153	HCDR2 (Определение от AHo)	ISVGGFTYYASWAKGR
SEQ ID NO: 154	HCDR3 (Определение от AHo)	DRHGGDSSGAFY
SEQ ID NO: 155	HCDR1 (Определение от Kabat)	SNAMG
SEQ ID NO: 156	HCDR2 (Определение от Kabat)	IISVGGFTYYASWAKG
SEQ ID NO: 157	HCDR3 (Определение от Kabat)	DRHGGDSSGAFYL
SEQ ID NO: 158	HCDR1 (Определение от Chothia)	GFSLSSN
SEQ ID NO: 159	HCDR2 (Определение от Chothia)	VGG
SEQ ID NO: 160	HCDR3 (Определение от Chothia)	RDRHGGDSSGAFY
SEQ ID NO: 161	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSLSSNAMGWVRQAPGK GLEYIG IISVGGFTYYASWAKGR FTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYFCAR DRHGGDSSGAFY LGWGQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 162	LCDR1 (L24-L42; нумерация AHo) (Определение от Kabat)	QSSESVYSNNQLS
SEQ ID NO: 163	LCDR2 (L58-L72; нумерация AHo) (Определение от Kabat)	DASDLAS
SEQ ID NO: 164	LCDR3 (L107-L138; нумерация AHo) (Определение от Kabat)	AGGFSSSSDTA
SEQ ID NO: 165	LCDR1 (Определение от AHo)	SSESVYSNNQ
SEQ ID NO: 166	LCDR2 (Определение от AHo)	DASDLASGVPSR

SEQ ID NO: 167	LCDR3 (Определение от AHo)	GFSSSSDT
SEQ ID NO: 168	LCDR1 (Определение от Chothia)	SESVYSNNQ
SEQ ID NO: 169	LCDR2 (Определение от Chothia)	DAS
SEQ ID NO: 170	LCDR3 (Определение от Chothia)	GFSSSSDT
SEQ ID NO: 171	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QSSESVYSNNQL</i> SWYQQKPGQPPKLLIY <i>DASD</i> <i>L</i> ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <i>AGGFSSSSDT</i> AFGGGTKLTV LG
SEQ ID NO: 172	scFv (VL-линкер-VH)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <i>QSSESVYSNNQL</i> SWYQQKPGQPPKLLIY <i>DASD</i> <i>L</i> ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <i>AGGFSSSSDT</i> AFGGGTKLTV LGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <i>GFSLSS</i> <i>NAMGW</i> VRQAPGKGLEYGIGIISVGGFTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYVYLMNS LRAEDTATYFCARDRHGGDSSGAFYLVWGQGTLLTVSS
23-13-A01 sc03		
SEQ ID NO: 173	HCDR1 (H27-H42; нумерация AHo)	GFSFSSSYWIC
SEQ ID NO: 174	HCDR2 (H57-H76; нумерация AHo)	CVFTGDGTTYASWAKG
SEQ ID NO: 175	HCDR3 (H108-H138; нумерация AHo)	RPVSVYYYGMDL
SEQ ID NO: 176	HCDR1 (Определение от AHo)	ASGFSFSSSYW
SEQ ID NO: 177	HCDR2 (Определение от AHo)	VFTGDGTTYASWAKGR
SEQ ID NO: 178	HCDR3 (Определение от AHo)	PVSVYYYGMD
SEQ ID NO: 179	HCDR1 (Определение от Kabat)	SSYWIC
SEQ ID NO: 180	HCDR2 (Определение от Kabat)	CVFTGDGTTYASWAKG

SEQ ID NO: 181	HCDR3 (Определение от Kabat)	PVSVYYYGMDL
SEQ ID NO: 182	HCDR1 (Определение от Chothia)	GFSFSSSYW
SEQ ID NO: 183	HCDR2 (Определение от Chothia)	TGDG
SEQ ID NO: 184	HCDR3 (Определение от Chothia)	VSVYYYGMD
SEQ ID NO: 185	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFSSSYW ICWVRQAPGKGLEWVGC V FTGDGTTYASWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMN SLRAEDTATYFCAR PVSVYY YGMDLWGQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 186	LCDR1 (L24-L42; нумерация AHo) (Определение от Kabat)	QASQIISRSA
SEQ ID NO: 187	LCDR2 (L58-L72; нумерация AHo) (Определение от Kabat)	QASKLAS
SEQ ID NO: 188	LCDR3 (L107-L138; нумерация AHo) (Определение от Kabat)	QCTYIDSNFGA
SEQ ID NO: 189	LCDR1 (Определение от AHo)	ASQIISR
SEQ ID NO: 190	LCDR2 (Определение от AHo)	QASKLASGVPSR
SEQ ID NO: 191	LCDR3 (Определение от AHo)	TYIDSNFG
SEQ ID NO: 192	LCDR1 (Определение от Chothia)	SQIISR
SEQ ID NO: 193	LCDR2 (Определение от Chothia)	QAS
SEQ ID NO: 194	LCDR3 (Определение от Chothia)	TYIDSNFG

SEQ ID NO: 195	VL	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTTTC <i>QASQI</i> SSRS <i>AWYQQKPGQPPKLLIYQASKLA</i> SGVPSRFSGSGSGTDFLT <i>ISSLQPEDFATYYCQCTYIDS</i> NFGAFGGGKLTVLG
SEQ ID NO: 196	scFv (VL-линкер-VH)	DVVMTQSPSSLSASVGDRVTTTC <i>QASQI</i> SSRS <i>AWYQQKPGQPPKLLIYQASKLA</i> SGVPSRFSGSGSGTDFLT <i>ISSLQPEDFATYYCQCTYIDS</i> NFGAFGGGKLTVLG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFSFSSSY <i>WICWVRQAPGKGLEWVGCVFTGDGTTYASWAKGRFTISRDN</i> SKNTVYLQMN SLRAEDTATYFC <i>ARPVSVYYYGMDL</i> WGQGLTVTVSS

ТАБЛИЦА 4

Другие последовательности, относящиеся к настоящему изобретению

SEQ ID номер	Область Ab	Последовательность
SEQ ID NO: 197	CD137 человека	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSS AGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQ GQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGP SPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGR KLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
SEQ ID NO: 198	PDL1 человека	MRIFAVFIFMTYWHLNNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALI VYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKL QDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVDPVTSEHELTCQAEG YPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRL DPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDV KCCGIQDTNSKKQSDTHLEET
SEQ ID NO: 199	FR4 на основе генеративной линии V λ (Sk17)	FGTGTKVTVLG
SEQ ID NO: 200	FR4 на основе генеративной линии V λ (Sk12)	FGGGTKLTVLG
SEQ ID NO: 201	FR4 на основе генеративной линии V λ	FGGGTQLIILG
SEQ ID NO: 202	FR4 на основе генеративной линии V λ	FGEGTELTVLG

SEQ ID NO: 203	FR4 на основе генеративной линии Vλ	FGSGTKVTVLG
SEQ ID NO: 204	FR4 на основе генеративной линии Vλ	FGGGTQLTVLG
SEQ ID NO: 205	FR4 на основе генеративной линии Vλ	FGGGTQLTALG
SEQ ID NO: 206	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
SEQ ID NO: 207	Линкер	GGGGS
SEQ ID NO: 208	Линкер	GGGGSGGGGS

ТАБЛИЦА 5

Примеры мультиспецифических молекул и IgG по настоящему изобретению

SEQ ID номер	Формат Ab	Последовательность
PRO885 (38-02-A04 sc01 scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o)		
SEQ ID NO: 209	scDb	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYITDIDNVFGTGTKVTVL GGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGLE WIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HPSDAVYGYANLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGTKVTVLGGGGGSQ VQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVVA GSVDITYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYSDA FNLWGQGLVTVSS

PRO951 (38-27-C05 sc02 scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o)		
SEQ ID NO: 210	scDb	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTVL GGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFNNDYDMCWVRQAPGKG LEWIGCIDTGDGSTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYC AREAASSSGYGMGYFDLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVYDNNWLAWYQQKPGKAPKLLIYRASNL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGTYLSSNWWAFGTGTKVT VLGGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSSGYDMCWIRQPPGKG LEWIGCVVAGSDITYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARKDAYSDAFNLWGQGLVTVSS
PRO1123 (38-02-A04 sc05 IF scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o)		
SEQ ID NO: 211	scDb	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTVL GGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSNSYWICWVRQPPGKGLE WIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQVSLKLSSVTAADTAVYFCAR HPSDAVYGYANNLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVPSRF SSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGTKVTVLGGGGGSQV QLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVVAGS VDITYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYSDAFN LWGQGLVTVSS

PRO1124 (38-02-A04 sc06 Full scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o)		
SEQ ID NO: 212	scDb	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTVL GGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKASGFSFSNSYWICWVRQPPGKGLE WIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLSSVTAADTAVYFCAR HPSDAVYGYANLWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLQMTQS PSSLSASVGDRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPGKPPKLLIYRASTLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGTKVTVLGGGGGSQV QLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVVAGS VDITYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYSDAFN LWGQGTLVTVSS
PRO1125 (38-02-A04 sc01 scDb-i/33-03-G02 sc02 IF scDb-o)		
SEQ ID NO: 213	scDb	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKSPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTVL GGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGLE WIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HPSDAVYGYANLWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGTKVTVLGGGGGSQ VQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSSGYDMCWVRQPPGKGLEWIACVVA GSVDITYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARKDAYSDA FNLWGQGTLVTVSS

PRO1126 (38-02-A04 sc01 scDb-i/33-03-G02 sc03 Full scDb-o)		
SEQ ID NO: 214	scDb	DFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKSPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTVL GGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGLE WIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HPSDAVYGYANLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGTKVTVLGGGGGSQS QLQESGPGLVKPSSETLSLTCKASGFSFSSGYDMCWVRQPPGKGLEWIACVVAG SVDITYYASWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLSSVTAADTAVYFCARKDAYSDAF NLWGQGLVTVSS
PRO1134 (38-02-A04 sc01 scDb-i/33-03-G02 sc07 GL VH3 scDb-o)		
SEQ ID NO: 215	scDb	DIQMTQSPSSLSASVGDAVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKSPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTVL GGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGLE WIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HPSDAVYGYANLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGTKVTVLGGGGGSEV QLVESGGGLVQPGLSLRSCAASGFSFSSGYDMCWVRQAPGKGLEWVGCVVA GSVDITYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCARKDAYSD AFNLWGPGTLVTVSS

PRO963 (= PRO1051) (38-02-A04 sc01 scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o/19-01-H04-sc03 scFv)		
SEQ ID NO: 216	scDb-scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTVL GGGGGSQVQLQESG PGLVKPSETLSLTCKVSGFSSNSYWICWIRQPPGKGLE WIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HPSDAVYGYANLWGQGLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGTKVTVL GGGGGSQ VQLQESG PGLVKPSETLSLTCKVSGFSS GYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVVA GSDITYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYSDA FNLWGQGLVTVSS GGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSES VY SNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCAGGFSSSSDTAFGGG TKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FSLSSNAMGWVRQAPGK GLEIIGIISVGGFTY YASWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYFCARDRHGGDSSGAFYL WGQGLVTVSS
PRO966 (= PRO1052) (38-27-C05 sc01 scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o/19-01-H04-sc03 scFv)		
SEQ ID NO: 217	scDb-scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTVL GGGGGSQVQLQESG PGLVKPSETLSLTCKVSGFSSFNNDYDMCWIRQPPGKGLE WIGCIDTGDG STYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARE AASSSGYGMGYFDLWGQGLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQ

		<p>SPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVYDNNWLAWYQQKPGKAPKLLIYRASNLASG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGTYLSSN WYWAFGTGTKVTVLG GGGGSQVQLQESG PGLVKPSETLSLTCKVSGFSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEW IGCVVAGSVDITYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARK DAYSDAFNLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QSSQSVYDNNWLAWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS SLQPEDFATYYCAGGFSSSDTAFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSNAMGWVRQAPGKLEYIGI ISVGGFTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTATYFCARDRHGG DSSGAFYLVWGQGLVTVSS</p>
PRO1057 (38-02-A04 sc01 scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o/23-12-A01-sc03, skl7sh4)		
SEQ ID NO: 218	scDb-scFv	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTVL GGGGGSQVQLQESG PGLVKPSETLSLTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGLE WIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR HPSDAVYGYANNLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQS PSSLSASVGDRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGTKVTVLGGGGGSQ VQLQESG PGLVKPSETLSLTCKVSGFSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVVA GSVDITYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYSDA FNLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQIIS SRSAWYQQKPGQPPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT</p>

		<p>YYCQCTYIDSNFGAFGGGKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSSSYWICWVRQAPGKGLEWVGCVFTGDGTT YYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARPVSVYYYGMDL WGQGTLVTVSS</p>
<p>PRO1058 (38-27-C05 sc01 scDb-i/33-03-G02 sc01 scDb-o/23-13-A01-sc03, sk17sh4)</p>		
<p>SEQ ID NO: 219</p>	<p>scDb-scFv</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTVL GGGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFNNDYDMCWIRQPPGKGLE WIGCIDTGDGSTYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARE AASSSGYGMGYFDLWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQ SPSSLSASVGDRVTITCQSSQSVYDNNWLAWYQQKPGKAPKLLIYRASNLASG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGTYLSSNWWAFGTGTKVTVLG GGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEW IGCVVAGSVDITYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARK DAYSDAFNLWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSSVMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQIISRSAWYQQKPGQPPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQCTYIDSNFGAFGGGKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSSSYWICWVRQAPGKGLEWVGCVF TGDGTTYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARPVSVYY YGMDLWGQGTLVTVSS</p>

PRO1175 (37-20-B03-sc01-o/38-02-A04 sc01-i/19-01-H04sc03 scFv)		
SEQ ID NO: 220	scDb-scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIGTYLAWYQQKPGKAPKLLIYRAFILE SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSNFYSDSTTIGPNAFGTGTKVT VLGGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGL EWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCA RHPSDAVYGYANLWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQ SPSSLSASVGDRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGTKVTVLGGGGGS QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVSGFSFNSDYWIYWIRQPPGKGLEWIGSIYG GSSGNTQYASWAQGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARGYVDYG GATDLWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSS VYSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCAGGFSSSDTA FGGGT KLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESSGGLVQPGSLRLSCAASGFSLSNAMGWVRQAPGKGLE YIGIISVGGF TYYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARDRHGGDSSGAF YLWGQGT LVTVSS
PRO1186 (38-02-A04 sc01 scDb-i/37-20-B03sc01 scDb-o/23-13-A01-sc03 scFv)		
SEQ ID NO: 221	scDb-scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIGTYLAWYQQKPGKAPKLLIYRAFILE SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSNFYSDSTTIGPNAFGTGTKVT VLGGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGL EWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCA RHPSDAVYGYANLWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMT

		<p>QSPSSLSASVGDRVITITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGTKVTVLGGGGGS QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVSGFSFNSDYWIYWIRQPPGKGLEWIGSIYG GSSGNTQYASWAQGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVDYG GATDLWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSVVMQSPSSLSASVGDRVITITCQASQ ISSRSAWYQQKPGQPPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQCTYIDSNFGAFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSSYWICWVRQAPGKGLEWVGCVFTGD GTTYASWAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTATYFCARPVSVYYYGM DLWGQGLTVTVSS</p>
<p>PRO1430 (38-02-A04 sc13 scDb-i/37-20-B03 sc01 scDb-o/19-01-H04 sc03 scFv)</p>		
<p>SEQ ID NO: 222</p>	<p>scDb-scFv</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQSIGTYLAWYQQKPGKAPKLLIYRAFILA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSNFYSDSTTIGPNAFGTGTKVT VLGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFNSYWICWVRQAPGK CLEWIGCTFVGSSTYYANWAKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVY YCARHPSDAVYGYANLWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGS MTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGCGTKVTVLGGGG GSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVSGFSFNSDYWIYWIRQPPGKGLEWIGSI YGGSSGNTQYASWAQGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYVD YGGATDLWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQSS ESVYSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ</p>

		<p>PEDFATYYCAGGFSSSSDTAFGGGKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNAMGWVRQAPGKGLLEYIGHSVG GFTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARDRHGGDSSG AFYLVGQGTLLTVSS</p>
PRO1479 (38-02-A04 sc13 scDb-i/37-20-B03 sc09.1 scDb-o/19-01-H04 sc03 scFv)		
SEQ ID NO: 223	scDb-scFv	<p>DIQMTQSPASLSASVGDRTITCQASQSIGTYLAWYQQKPGKPPKLLIYRAFI LAVGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSNFYSDSTTIGPNAFGTGTKV TSLVGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSNSYWICWVRQAPGK CLEWIGCTFVGSSTYYANWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVY YCARHPSDAVYGYANLWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQ MTQSPSSLSASVGDRTITCQASQINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGCGTKVTVLGGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFNSDYWIYWVRQAPGKGLEWIAS IYGGSSGNTQYASWAQGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGYV DYGGATDLWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQ SSESVYSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS LQPEDFATYYCAGGFSSSSDTAFGGGKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNAMGWVRQAPGKGLLEYIGHS VGGFTYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARDRHGGDS SGAFYLVGQGTLLTVSS</p>

PRO1482 (37-20-B03 sc09.1 scDb-i/38-02-A04 sc13 scDb-o//19-01-H04 sc03 scFv)		
SEQ ID NO: 224	scDb-scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGCGTKVTVLG GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSFNSDYWIYWVRQAPGKGLE WIASIYGGSSGNTQYASWAQGRFTISRDNKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFCAR GYVDYGGATDLWGQGLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQSPA SLSASVGDRVTITCQASQSIGTYLAWYQQKPGKPPKLLIYRAFILASGVPSRFSG SSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSNFYSDSTTIGPNAFGTGKTVTVLGGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSFSNSY WICWVRQAPGKCLEWIGCT FVGSSDSTYYANWAKGRFTISRDNKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARHPSD AVYGYANNLWGQGLVTVSS GGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QSSESVYSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCAGGFSSSDTAFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLSSNAMGWVRQAPGKGLE YIGI ISVGGFTYYASWAKGRFTISRDNKNTVY LQMNSLRAEDTATYFCARDRHGG DSSGAFYLVGQGLVTVSS
PRO1431 (38-02-A04 sc13 scDb-i/33-03-G02 sc18 scDb-o//19-01-H04 sc03 scFv)		
SEQ ID NO: 225	scDb-scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYIITDIDNVFGTGKTVTVL GGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSFNSYWICWVRQAPGKCL EWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRFTISRDNKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYC ARHPSDAVYGYANNLWGQGLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMT

		<p>QSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGCGTKVTVLGGGGGS QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKASGFSFSSGYDMCWVRQPPGKGLEWVACVV AGSVDITYYASWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYS DAFNLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSS VYSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCAGGFSSSDTAFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNAMGWVRQAPGKLEYIGIISVGGF TYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARDRHGGDSSGAF YLVWGQGLVTVSS</p>
<p>PRO1473 (38-02-A04 sc13 scDb-i/33-03-G02 sc03 scDb-o/19-01-H04 sc03 scFv)</p>		
<p>SEQ ID NO: 226</p>	<p>scDb-scFv</p>	<p>DFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKSPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGYIITDIDNVFGTGKTVTL GGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSNSYWICWVRQAPGKCL EWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYC ARHPSDAVYGYANNLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGCGTKVTVLGGGGGS QSQLQESGPGLVKPSETLSLTCKASGFSFSSGYDMCWVRQPPGKGLEWVACVV AGSVDITYYASWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLSSVTAADTAVYFCARKDAYS DAFNLWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSS VYSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE</p>

		FATYYCAGGFSSSDTAFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNAMGWVVRQAPGKGLYIGIISVGGFT YYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARDRHGGDSSGAFY LWGQGLTVTVSS
PRO1476 (33-03-G02 sc03 scDb-i/38-02-A04 sc13 scDb-o/19-01-H04 sc03 scFv)		
SEQ ID NO: 227	scDb-scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGCGTKVTVLG GGGS SQLQESGPGLVKPSETLSLTCKASGFSFSSGYDMCWVRQPPGKGLE WIACVVAGSVDITYYASWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLSSVTAADTAVYFCAR KDAYSDAFNLWGQGLTVTVSS GGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGFQLTQSPSSL SASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKSPKLLIYKASTLASGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGGYIITDIDNVFGTGTKVTVLGGGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSNSYWICWVRQAPGKCLEWIGCTFVGS SDSTYYANWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARHPSDAVYG YANNLWGQGLTVTVSS GGGS GGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSS VYSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCAGGFSSSDTAFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNAMGWVVRQAPGKGLYIGIISVGGF TYYASWAKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARDRHGGDSSGAF YLWGQGLTVTVSS

PRO1432 (33-03-G02 sc18 scDb-i/38-02-A04 sc13 scDb-o/19-01-H04 sc03 scFv)		
SEQ ID NO: 228	scDb-scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGCGTKVTVLG GGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKASGFSFSSGYDMCWVRQPPGKGLE WIACVVAGSVDITYYASWAKGRVTISKDSSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCA RKDAYSDAFNLWGQGLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSRFSG SSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTVLGGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSNSYWICWVRQAPGKCLEWIGCTFVG SSDSTYYANWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARHPSDAVY GYANNLWGQGLVTVSS GGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSE SVYSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ EDFATYYCAGGFSSSDTAFGGGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNAMGWVRQAPGKLEYIGIISVG GFTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYFCARDRHGGDSSG AFYLVGQGLVTVSS
PRO1480 (38-27-A11 sc02 scDb-i/37-20-B03 sc09.1 scDb-o/19-01-H04 sc03 scFv)		
SEQ ID NO: 229	scDb-scFv	DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCQASQSIGTYLAWYQQKPGKPPKLLIYRAFILE SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSNFYSDSTTIGPNAFGTGTKVT VLGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSANYYP CWVRQAPGK GLEWIGCIYGGSSDITYDANWTKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYY CARSAWYSGWGGDLWGQGLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMT

		<p>QSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIENRLAWYQQKPGKAPKLLIYSASTLASGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQSTYYGNDGNAFGTGTKVTVLGGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFNSDYWIYWVRQAPGKGLEWIAS IYGGSSGNTQYASWAQGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFCARGYV DYGGATDLWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQ SSESVYSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCAGGFSSSDTAFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNAMGWVRQAPGKGLE YIGIIS VGGFTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTATYFCARDRHGGDS SGAFYLWGQGT LVTVSS</p>
<p>PRO1481 (38-27-A11 sc03 scDb-i/37-20-B03 sc09.1 scDb-o/19-01-H04 sc03 scFv)</p>		
<p>SEQ ID NO: 230</p>	<p>scDb-scFv</p>	<p>DIQMTQSPASLSASVGDRVTITCQASQSIGTYLAWYQQKPGKPPKLLIYRAFILA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSNFYSDSTTIGPNAFGTGTKVT VLGGGGGSESQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSANYYP CWVRQAPGK GLEWIGCIYGGSSDITYDANWTKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYF CARSAWYSGWGGDLWGPGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SFQLTQ SPSSLSASVGDRVTITCQASQSIENRLAWYQQKPGKPPKLLIYSASTLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSTYYGNDGNAFGTGTKVTVLGGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFNSDYWIYWVRQAPGKGLEWIASI YGGSSGNTQYASWAQGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYFCARGYVD YGGATDLWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSS ESVYSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ</p>

		<p>PEDFATYYCAGGFSSSSDTAFGGGKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNAMGWVRQAPGKGLLEYIGIISVG</p> <p>GFTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARDRHGGDSSG</p> <p>AFYLVGQGT LVTVSS</p>
PRO1480diS (38-27-A11 sc07 scDb-i/37-20-B03 sc09.1 scDb-o/19-01-H04 sc03 scFv)		
SEQ ID NO: 231	scDb-scFv	<p>DIQMTQSPASLSASVGDRTITCQASQSIGTYLAWYQQKPGKPPKLLIYRAFI LA</p> <p>SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSNFYSDSTTIGPNAFGTGTKVT</p> <p>VLGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSANYYP CWVRQAPGK</p> <p>CLEWIGCIYGGSSDITYDANWTKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYY</p> <p>CARSAWYSGWGGDLWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMT</p> <p>QSPSSLSASVGDRTITCQASQSNRLAWYQQKPGKAPKLLIYSASTLASGVPS</p> <p>RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSTYYGNDGNAFGCGTKVTVLGGGG</p> <p>GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFNSDYWIYWVRQAPGKGLEWIAS</p> <p>IYGGSSGNTQYASWAQGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARGYV</p> <p>DYGGATDLWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQ</p> <p>SSESVYSNNQLSWYQQKPGQPPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL</p> <p>LQPEDFATYYCAGGFSSSSDTAFGGGKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGG</p> <p>GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNAMGWVRQAPGKGLLEYIGIIS</p> <p>VGGFTYYASWAKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTATYFCARDRHGGDS</p> <p>SGAFYLVGQGT LVTVSS</p>

PRO1059 (33-03-G02 IgG1 LC с заглушенным Моррисоном 38-02-A04 sc01 scFV, PDL1/CD137(scFv))		
SEQ ID NO: 232	Легкая цепь Моррисон-L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYITDIDNVFGTGTKVTVL GTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSITLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC GGGGSGGGG SIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAP KLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNVYDFG TGTKVTVL GGGGSGGGGSGGGGSGGGG SQVQLQESGPGLVKPSETLSLTC KVSGFSPNSYWICWIRQPPGKGLEWIGCTFVGSSTYYANWAKGRVTISVDS SKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHPSDAVYGYANLWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 233	Тяжелая цепь Моррисон-L	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCRVSGFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVV AGSVDITYYASWAKGRVTISVDSKLNQFSLKLSVTAADTAVYYCARKDAYSD AFNLWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
PRO1060 (33-03-G02 IgG1 HC с заглушенным Моррисоном 38-02-A04 sc01 scFV, PDL1/CD137(scFv))		
SEQ ID NO: 234	Легкая цепь Моррисон-H	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYITDIDNVFGTGTKVTVL

		GTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 235	Тяжелая цепь Моррисон-H	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVSGFSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVV AGSVDITYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYSD AFNLWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GGGGSGGGG SIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQSSYGNVYDFTGTGKVTVL GGGGSGGGGSGGGGSGG GG SQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGLEWIGC TFVGSSTSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHPSD AVYGYANLWGQGTLLTVSS
PRO1061 (33-03-G02 sc01 IgG1 LC с заглушенным Моррисоном 38-27-C05 sc01 scFv, PDL1/CD137(scFv))		
SEQ ID NO: 236	Легкая цепь Моррисон-L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTGKVTVL GTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC GGGGSGGGG SIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAP

		KLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFG TGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTC KVSGFSSNSYWICWIRQPPGKGLEWIGCTFVGSSDSTYYANWAKGRVTISVDS SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHPSDAVYGYANLWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO: 237	Тяжелая цепь Моррисон-L	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCVSGFSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVV AGSVDITYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYSD AFNLWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
PRO1062 (33-03-G02 sc01 IgG1 HC с заглушенным Моррисоном 38-27-C05 sc01 scFv, PDL1/CD137(scFv))		
SEQ ID NO: 238	Легкая цепь Моррисон-H	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYIITDIDNVFGTGTKVTVL GTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAVQWVKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDESTYLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 239	Тяжелая цепь Моррисон-H	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCVSGFSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVV AGSVDITYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYSD AFNLWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK

		VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRT TITCQASQSINNVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGKVTVLGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGLEWIGC TFVGSSDSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHPSD AVYGYANLWGQGLVTVSS
PRO1137 (33-03-G02-sc01 IgG1)		
SEQ ID NO: 240	IgG легкой цепи	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSINDYLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGYIITDIDNVFGTGKVTVL GTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 241	IgG тяжелой цепи	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSSGYDMCWIRQPPGKGLEWIGCVV AGSVDITYYASWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKDAYSD AFNLWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV

		KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
PRO1196 (37-20-B03 sc01 IgG1)		
SEQ ID NO: 242	IgG легкой цепи	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIGTYLAWYQQKPGKAPKLLIYRAFILE SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSNFYSDSTTIGPNAFGTGTKVT VLGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
SEQ ID NO: 243	IgG тяжелой цепи	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCKVSGFSFNSDYWIYWIRQPPGKGLEWIGSIYG GSSGNTQYASWAQGRVTISVDSSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGYVDYG GATDLWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
PRO1138 (38-02-A04 sc01 IgG4)		
SEQ ID NO: 244	IgG легкой цепи	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSIINVLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTL ASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSSYGNYGDFGTGTKVTVLG TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 245	IgG тяжелой цепи	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCKVSGFSFSNSYWICWIRQPPGKGLEWIGCTFV GSSDSTYYANWAKGRVTISVDSSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHPSDAVY GYANNLWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

В тексте настоящей заявки, в случае несоответствия между текстом спецификации (например, таблицы 1-5) и списком последовательностей, текст спецификации имеет преимущественную силу.

Следует принимать во внимание, что определенные признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предоставлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предусмотрены отдельно или в любой подходящей подкомбинации. Все комбинации вариантов осуществления, относящихся к изобретению, входят в объем настоящего изобретения и описаны в данной заявке, как если бы каждая комбинация была описана отдельно и в явной форме. Кроме того, все подкомбинации различных вариантов осуществления и их элементов также входят в объем настоящего изобретения и описаны в данной заявке, как если бы каждая такая подкомбинация была описана отдельно и в явной форме в настоящей заявке.

Объем настоящего изобретения не ограничивается описанными в настоящей заявке конкретными вариантами осуществления. В действительности, различные модификации изобретения в дополнение к описанным в настоящей заявке будут очевидны для специалистов в данной области техники из описания выше. Предполагается, что такие модификации включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

Насколько это возможно по соответствующему патентному законодательству, все патенты, заявки, публикации, методы испытаний, литература и другие материалы, цитируемые в данной заявке, настоящим включены посредством ссылки.

Следующие примеры иллюстрируют изобретение, описанное выше, но при этом никак не ограничивают объем изобретения. Другие модели тестирования, известные специалистам в данной области техники, также могут определять полезные эффекты заявленного изобретения.

Примеры

Пример 1: Аффинность к PDL1, CD137, HSA и MSA.

Методы:

Аффинность к PDL1 разных видов определяли измерениями SPR с использованием прибора Biacore T200 (GE Healthcare). Антитело, специфичное к области Fc человеческих антител класса IgG, иммобилизовали на сенсорной микросхеме (сенсорная микросхема CM5, GE Healthcare) по аминокгруппе. Для всех форматов, за исключением Fc, содержащего формат Моррисона, химерный белок PDL1-Fc из разных видов захватывался иммобилизованным антителом. В этом эксперименте Fc-меченный CD137 человека (R&D Systems, кат. 838-4B-100) и Fc-меченный PDL1 человека (Sino Biological,

кат. 10084-H02H) были захвачены с использованием набора для захвата антител человека от GE Healthcare (кат. BR-1008-39).

Трехкратные серийные разведения молекул, специфичных для PDL1 (0,12-90 нМ), вводили в проточные ячейки в течение трех минут и контролировали диссоциацию в течение 10 минут. После каждого цикла введения поверхности регенерировали одной инъекцией 3 М раствора $MgCl_2$. Кажущиеся константы скорости диссоциации (k_d) и ассоциации (k_a) и кажущуюся константу равновесия диссоциации (KD) рассчитывали с использованием модели связывания Ленгмюра один к одному. Аффинность к CD137 разных видов определяли с использованием таких же условий, как и для PDL1, за исключением того, что химерный белок CD137-Fc из разных видов захватывался иммобилизованным антителом.

Форматы, содержащие Fc, были непосредственно захвачены антителом, специфичным для области Fc человеческих антител класса IgG. Двухкратные серийные разведения внеклеточного домена PDL1 или внеклеточного домена CD137 в диапазоне от 90 до 0,35 нМ тестировали на связывание с IgG, захваченным на биосенсорной микросхеме. После каждого цикла введения поверхности регенерировали одной инъекцией 3 М раствора $MgCl_2$.

Аффинность молекул к сывороточному альбумину (СА) разных видов определяли измерениями SPR с использованием прибора Biacore T200 (GE Healthcare). СА был напрямую связан с сенсорной микросхемой CM5 (GE Healthcare) с использованием связывания по аминогруппе. После проведения изучения регенерации и испытания характеристик поверхности для определения наилучших условий количественного определения был измерен ответ на введение дозы, и полученные кривые связывания были дважды привязаны (пустой эталонный канал и инъекция нулевого аналита) и аппроксимированы с использованием модели Ленгмюра 1:1 для получения кинетических параметров. Анализ проводили в буфере 1 X PBS-Tween при pH 5,5.

Результаты:

Аффинность к PDL1 scDb-scFv человека представлена в таблице 6. Связывание с PDL1 человека было подтверждено для всех scDb-scFv. Измерения кинетики связывания для гуманизированных конструкций показывают разницу в аффинности связывания для PDL1 при сравнении CDR и структурных (STR) трансплантатов клона 33-03-G02. Трансплантат STR показывает 20-кратное улучшение аффинности связывания с трансплантатом CDR того же клона (сравнение PRO885 и PRO1126 в таблице 6). Трансплантат CDR, полученный из клона 37-20-B03 (PRO997), демонстрирует приблизительно в два раза более высокую аффинность по сравнению с трансплантатом

STR клона 33-03-G02. Аффинность связывания для трансплантата CDR 33-03-G02 сходна с аффинностью связывания родительского scFv, когда они объединены в различные мультиспецифичные форматы (сравните PRO830 с PRO885, PRO951, PRO1123, PRO1124, PRO963, PRO966, PRO1057, PRO1058, PRO1059 и PRO1060 в таблице 6). ScFv, полученный из обоих клонов, демонстрирует почти идентичную аффинность к PDL1 человека и яванского макака (см. PRO977 и PRO830 в таблице 6). При сравнении с соответствующими scFv аффинность мультиспецифических компонентов, содержащих фрагменты антитела к PDL1 33-03-G02 sc18, 37-20-B03 sc01 и 37-20-B03 sc09.1, была схожей (PRO1392, scFv 33-03-G02 sc18; $KD = 9,94E-12$ М; PRO908, scFv of 37-20-B03 sc01; $KD = 5,94E-12$ М; и PRO1347, scFv 37-20-sc09.1; $KD = 9,00E-12$ М, соответственно). Напротив, снижение аффинности к PDL1 человека наблюдалось для всех scDb-scFv, несущих анти-PDL1 фрагмент 33 03-G02 sc03, по сравнению с соответствующим scFv PRO1183 (scFv 33 03-G02 sc03: $KD < 2,09E-12$ М). Снижение аффинности этих конструкций в основном связано с увеличенной скоростью диссоциации, приводящей к увеличению константы диссоциации. Наивысшая аффинность к PDL1 наблюдалась для PRO1430 с анти-PDL1-связывающим фрагментом 37-20-B03 sc09.1.

Как показано в таблице 6, связывание с CD137 человека было подтверждено для всех scDb-scFv. Измерение кинетики связывания для трансплантатов CDR двух CD137-специфических гуманизированных конструкций, полученных из клона 38-02-A04 и 38-27-C05, показывает почти идентичную аффинность (сравните PRO885 и PRO951 в таблице 6). Для клона 38-02-04 описанные структурные остатки, трансплантированные в каркасные участки, приводили к улучшению аффинности более чем в 200 раз (сравните PRO885 и PRO1124 в таблице 6). Кроме того, для конструкций, полученных из клона 38-02-04, наблюдалось связывание с мышинным CD137, однако, с очень пониженной аффинностью. Интересно, что аффинность к CD137 человека была сходной для мультиспецифических молекул, которые содержат анти-CD137-связывающий фрагмент 38-02-A04 sc13 и 38-27-A11 sc03 по сравнению со аффинностью их соответствующих scFv (PRO1352, scFv из 38 -02-A04 sc13, $KD = 1,47E-09$ М и PRO1360, scFv 38-27-A11 sc03, $KD = 2,34E-10$ М соответственно), аффинность молекул scDb-scFv, несущих анти-CD137 фрагмент 38-27-A11 sc02 во внутренней части шпильки scDb (домен scDb-i, а именно PRO1480) была значительно лучше, чем аффинность соответствующего scFv (PRO1359, $KD = 3,24E-09$ М; PRO1359, $KD = 3,07E-09$ М). Напротив, когда анти-CD137 фрагмент 38-27-A11 sc02 был помещен во внешнюю часть шпильки scDb, аффинность была сравнима с аффинностью scFv PRO1359. Можно предположить, что это увеличение аффинности может быть вызвано повышенной стабилизацией домена, когда он находится во

внутренней части шпильки scDb. Как следствие, аффинность к CD137 человека мультиспецифического материала, содержащего анти-CD137 фрагмент 38-27-A11 sc02 во внутренней части шпильки scDb, практически идентична аффинности scDb-scFv с анти-CD137 фрагментом 38-27-A11 sc03 (сравните PRO1480 и PRO1481), что является неожиданным открытием.

Связывание scDb-scFv с сывороточным альбумином (СА) было подтверждено SPR. ScDb-scFv, содержащие домен связывания СА, полученный из клона 19-01-H04, демонстрируют высокую аффинность связывания с человеческим сывороточным альбумином, хотя связывания с СА грызунов не наблюдалось. В случае с scDb-scFv, содержащим клон 23-13-A01, наблюдали связывание HSA, кроме того, молекулы связываются с пониженной аффинностью с СА грызунов (см. таблицу 6). Было обнаружено, что связывание с HSA при pH 5,5 для PRO1430, PRO14379 и PRO1480 имеет высокую аффинность (значение KD низких наномолярных концентраций) и сопоставимо среди тестируемых молекул, что является ожидаемым результатом, поскольку тестируемые молекулы имеют идентичный домен антигена СА (клон IgG 19-01-H04). Более того, увеличение значения pH до 7,4 не оказало существенного влияния на аффинность молекул к HSA (данные не показаны).

Пример 2: Блокада взаимодействия PDL1 / PD-1 при анализе репортерного гена на клетках CHO, экспрессирующих PDL1 и молекулы-активатора TCR, и клетках Юрат, экспрессирующих PD-1 и содержащих ген люциферазы под элементом ответа NFAT.

Способ: В биолюминесцентном анализе репортерного гена инженерные Т-клетки Юрат, стабильно экспрессирующие репортер NFAT (ядерный фактор активированных Т-клеток)-люциферазы и PD-1 человека, действуют как эффекторные Т-клетки. Клетки, стабильно экспрессирующие PDL1 человека и активатор рецептора Т-клеток (TCR), действуют как антигенпредставляющие клетки. Совместное культивирование двух клеточных линий индуцирует активацию пути NFAT Юрат путем сшивания комплекса активатор TCR/TCR. После связывания клеток, экспрессирующих PDL1, передача сигналов PD-1 в эффекторных Т-клетках PD-1 ингибирует функцию Т-клеток и приводит к ингибированию пути NFAT. Блокада взаимодействия рецепторов PD-1 и PDL1 приводит к повторной активации пути NFAT. 35 000 клеток активатора CHO/PDL1/TCR (BPS Bioscience) в 100 мкл среды для культивирования клеток (DMEM/F12, 10 % FCS) добавляли во внутренние лунки планшета для культивирования белых клеток и инкубировали в течение 16-20 часов при 37°C и 5% CO₂. На следующий день из каждой лунки удаляли 95 мкл среды для

культивирования клеток и добавляли 50 мкл концентрированных серийных разведений двукратного сгущения соответствующих исследуемых молекул (от 3000 до 0,46 нг/мл), включая эталонный авелумаб. Затем в каждую лунку добавляли 50 мкл эффекторных клеток Юркат, экспрессирующих PD-1 (BPS Bioscience), разведенных при 400 000 клеток/мл в буфере для анализа (RPMI1640 с 10% FCS), и планшеты инкубировали в течение 6 ч при 37° С и 5% CO₂. Наконец, в каждую лунку добавляли 50 мкл субстрата люциферазы (BPS Bioscience), приготовленного в соответствии с протоколом производителя, и планшеты инкубировали 30 мин в темноте, измеряли люминесценцию с использованием Topcount.

ТАБЛИЦА 6

Аффинность разных форматов к PDL1, CD137 и сывороточному альбумину у разных видов

Ид. № белка PRO ID	Ид. № клона, PD-L1 Слон ШИ-31	Ид. № клона, CD137 Слон ШИ-137	Ид. № клона, Слон ШИ-5А	Формат формат	Аффинность к PD- L1 человека			Аффинность к PD- L1 яванского макака			Аффинность к CD137 человека			Аффинность к CD137 яванского макака			Аффинность к CD137 мыши			Аффинность к SA человека			Аффинность к SA мыши		
					k_D (M ⁻² s ⁻¹)	k_2 (s ⁻¹)	KD (M)	k_D (M ⁻² s ⁻¹)	k_2 (s ⁻¹)	KD (M)	k_D (M ⁻² s ⁻¹)	k_2 (s ⁻¹)	KD (M)	k_D (M ⁻² s ⁻¹)	k_2 (s ⁻¹)	KD (M)	k_D (M ⁻² s ⁻¹)	k_2 (s ⁻¹)	KD (M)	k_D (M ⁻² s ⁻¹)	k_2 (s ⁻¹)	KD (M)	k_D (M ⁻² s ⁻¹)	k_2 (s ⁻¹)	KD (M)
PRO885	33-03-G02 CDR	33-02-A04 CDR	NA	scDb	2.1E+06	1.4E-04	6.5E-11	ND	ND	ND	2.4E+05	7.0E-04	3.2E-09	3.8E+05	7.0E-04	2.1E-09	2.9E+05	1.8E-01	6.0E-07	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO851	33-03-G02 CDR	33-27-C05 CDR	NA	scDb	2.2E+06	1.5E-04	7.0E-11	ND	ND	ND	3.5E+06	6.3E-03	4.2E-09	1.5E+06	1.0E-02	6.9E-09	NE	NE	NE	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1123	33-03-G02 CDR	38-02-A04 IF	NA	scDb	2.3E+06	1.7E-04	7.5E-11	ND	ND	ND	3.1E+05	2.7E-04	8.8E-10	2.6E+05	3.3E-04	1.3E-02	6.5E+04	2.7E-02	4.1E-07	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1124	33-03-G02 CDR	38-02-A04 STR	NA	scDb	3.1E+06	2.0E-04	6.7E-11	ND	ND	ND	6.8E+05	1.0E-03	1.5E-11	5.6E+05	1.2E-04	5.7E-10	2.0E+05	2.2E-03	1.1E-08	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1125	33-03-G03 IF	38-02-A04 CDR	NA	scDb	1.7E+06	1.1E-04	6.7E-11	ND	ND	ND	2.0E+05	7.5E-04	3.7E-09	ND	ND	ND	5.4E+05	2.7E-01	5.1E-07	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1126	33-03-G02 STR	38-02-A04 CDR	NA	scDb	2.9E+06	1.1E-04	3.5E-12	ND	ND	ND	2.1E+05	7.5E-04	3.5E-09	ND	ND	ND	NE	NI	NE	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1134	33-03-G02 STR2, VH3	38-02-A04 CDR	NA	scDb	2.9E+06	7.6E-05	3.8E-11	ND	NI	ND	2.5E+05	8.4E-04	3.4E-09	ND	ND	ND	4.5E+05	1.9E-01	4.2E-07	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO963	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	13-01-H04 STR	scDb-scFv	2.0E+06	1.3E-04	4.0E-11	ND	ND	ND	2.0E+05	6.2E-04	3.0E-05	ND	ND	ND	NE	NE	NE	1.1E+05	3.0E-04	2.8E-09	NE	NE	NE
PRO966	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	13-01-H04 STR	scDb-scFv	1.6E+06	1.4E-04	8.3E-11	ND	ND	ND	1.0E+06	2.2E-03	2.2E-09	ND	ND	ND	5.1E+03	1.0E-03	2.0E-07	ND	ND	ND	NA	NA	NA
PRO1057	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	13-11-A01 STR	scDb-scFv	1.6E+06	1.7E-04	1.1E-10	ND	ND	ND	1.4E+05	7.0E-04	5.1E-05	1.6E+05	7.9E-04	4.8E-09	8.9E+04	8.5E-02	1.7E-16	2.4E+05	6.7E-04	2.8E-09	1.3E+05	6.5E-03	6.8E-08
PRO1056	33-03-G02 CDR	38-17-C05 CDR	13-11-A01 STR	scDb-scFv	1.2E+06	1.9E-04	1.9E-10	ND	NI	ND	1.7E+06	2.1E-03	1.2E-05	ND	ND	ND	1.1E+06	7.5E-04	7.0E-10	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1059	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-L	1.2E+06	1.5E-05	5.6E-11	NI	ND	ND	1.3E+05	4.2E-04	2.3E-05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1060	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-H	1.3E+05	4.5E-05	3.0E-11	ND	ND	ND	3.0E+05	3.9E-04	1.3E-05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1061	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	Morrison-L	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1062	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	Morrison-H	1.3E+06	5.0E-05	3.8E-11	ND	ND	ND	2.8E+05	3.7E-04	1.3E-05	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO997	37-20-B03 CDR	NA	NA	scFv	5.9E+06	<1.0E-05	1.7E-12	6.0E+06	<1.0E-05	<1.0E-12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1013	37-20-B03 CDR, VH1	NA	NA	scFv	6.0E+06	2.7E-04	4.5E-11	5.9E+06	3.2E-04	5.7E-11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO830	33-03-G02 CDR	NA	NA	scFv	2.1E+05	1.6E-04	7.6E-11	2.2E+06	1.0E-04	9.4E-11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PRO1186	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc01	13-11-A01 sc03	scDb-scFv	6.2E+06	1.3E-05	2.7E-12	TBD	TBD	TBD	1.9E+05	5.0E-04	2.6E-09	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	2.5E+05	7.2E-04	2.9E-09	2.2E+05	9.5E-03	4.3E-08
PRO1430	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc01	13-01-H04 sc03	scDb-scFv	5.3E+06	2.4E-05	4.5E-12	TBD	TBD	TBD	4.6E+05	7.1E-04	1.5E-09	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	2.9E+05	3.0E-04	1.0E-09	NA	NA	NA
PRO1479	37-20-B03 sc09.1	38-02-A04 sc01	13-01-H04 sc03	scDb-scFv	4.2E+06	3.9E-05	9.2E-12	TBD	TBD	TBD	3.3E+05	5.4E-04	1.7E-09	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	3.3E+05	3.31E-04	9.76E-10	NA	NA	NA
PRO1482	37-20-B03 sc09.1	38-02-A04 sc01	13-01-H04 sc03	scDb-scFv	3.9E+06	1.3E-05	9.8E-12	TBD	TBD	TBD	3.2E+05	1.8E-04	1.1E-05	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	TBD	TBD	TBD	NA	NA	NA
PRO1431	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc03	13-01-H04 sc04	scDb-scFv	3.9E+06	4.5E-05	1.4E-11	ND	ND	ND	4.5E+05	7.5E-04	1.7E-09	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA
PRO1473	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc03	13-01-H04 sc03	scDb-scFv	3.6E+06	2.9E-05	8.2E-12	ND	ND	ND	3.1E+05	6.0E-04	2.0E-09	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA
PRO1476	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc03	13-01-H04 sc03	scDb-scFv	3.4E+06	3.1E-05	9.0E-12	ND	ND	ND	3.5E+05	3.7E-04	1.1E-05	TBD	TBD	TBD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA
PRO1432	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc01	13-01-H04 sc03	scDb-scFv	4.2E+06	4.4E-05	1.1E-11	ND	NI	ND	6.0E+05	4.5E-04	7.5E-10	TBD	TBD	TBD	NI	ND	ND	ND	ND	ND	NA	NA	NA
PRO1480	37-20-B03 sc09.1	38-27-A11 sc03	13-01-H04 sc03	scDb-scFv	3.9E+06	3.1E-05	1.9E-11	4.0E+06	3.4E-05	8.5E-12	5.8E+05	2.2E-04	3.7E-10	6.4E+05	1.0E-04	4.7E-10	ND	ND	ND	1.27E+05	3.37E-04	1.03E-09	ND	NI	NI
PRO1481	37-20-B03 sc09.1	38-27-A11 sc03	13-01-H04 sc03	scDb-scFv	4.7E+06	4.3E-05	9.2E-11	ND	ND	ND	6.3E+05	2.0E-04	3.3E-10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

NA: не применимо
TBD: подлежит уточнению
NB: значимое связывание отсутствует
ND: не определено

Результаты:

Отдельные значения IC₅₀ на каждом планшете были откалиброваны по значению IC₅₀ эталонной молекулы авелумаба, которая была взята на каждом планшете (относительное значение IC₅₀: IC_{50, авелумаб}/IC_{50, тест scFv}). Значения активности суммированы в таблице 7, которая показывает, что IC₅₀ всех протестированных молекул превышает IC₅₀ авелумаба в 0,1 - 3,73 раза.

ТАБЛИЦА 7

Нейтрализация взаимодействия PDL1/PD-1 в анализе репортерного гена NF-AT

Ид. №	Ид. № клона. PD-	Ид. № клона,	Ид. № клона.	Формат	Нейтрализация PD-L1 человека в анализе активности NF-AT		
					IC ₅₀ (нг/мл)	отн. IC ₅₀	HSA
PRO885	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	scDb	137.20	0.28	no
PRO951	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	scDb	88.50	0.47	no
PRO963	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	19-01-H04 STR	scDb-scFv	274.80	0.25	yes
PRO1057	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	23-13-A01 STR	scDb-scFv	665.10	0.10	yes
PRO1059	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-L	93.76	0.52	no
PRO1060	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-H	132.70	0.44	no
PRO1062	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	Morrison-H	96.55	0.68	no
PRO997	37-20-B03 CDR	NA	NA	scFv	11.12	3.07	no
PRO1013	37-20-B03 CDR, VH1	NA	NA	scFv	21.29	1.60	no
PRO830	33-03-G02 CDR	NA	NA	scFv	42.88	0.73	no
PRO1186	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc01	23-13-A01 sc03	scDb-scFv	10.17	2.31	yes
PRO1430	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	16.19	1.45	yes
PRO1479	37-20-B03 sc09.1	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	50.36	1.04	yes
PRO1482	37-20-B03 sc09.1	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	54.79	0.68	yes
PRO1431	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	9.83	3.73	yes
PRO1473	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	35.17	1.11	yes
PRO1476	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	53.53	0.66	yes
PRO1432	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	18.51	1.98	yes
PRO1480	37-20-B03 sc09.1	38-27-A11 sc02	19-01-H04-sc03	scDb-scFv	84.84	0.61	yes
PRO1481	37-20-B03 sc09.1	38-27-A11 sc03	19-01-H04-sc03	scDb-scFv	40.58	0.92	yes

NA: не применимо

yes: да

no: нет

*: IC_{50, авелумаб} (нг/мл)/ IC_{50, тест. молекула} (нг/мл)

Чтобы оценить влияние набора CDR и выбора каркаса на активность нейтрализации связывания PDL1 с PD-1, три анти-PDL1 scFv были протестированы в анализе на основе клеток репортерного гена NFAT. PRO830 содержит набор CDR клона 33-03-G02, трансплантированный на каркасе VH4, а PRO997 и PRO1013 содержат набор CDR клона 37-20-B03, трансплантированный либо на каркасе VH4, либо на каркасе VH1, соответственно. PRO830 обладает самой низкой активностью из трех протестированных

scFv со значением IC_{50} 42,88 нг/мл и аналогичной активностью, что и авелумаб, со значением IC_{50} 34,09 нг/мл. PRO997 - самая активная молекула. Активность того же набора CDR была примерно в 2 раза выше при трансплантации на каркас VH4, чем на каркас VH1. Значения IC_{50} составляли 11,12 нг/мл и 21,29 нг/мл соответственно. (Фиг. 3 и Таблица 7).

Активность нейтрализации связывания PDL1 с PD-1 определяли для биспецифических молекул, обладающих доменом PDL1 33-03-G02 до (трансплантат CDR) и после оптимизации (структурный трансплантат) домена. Трансплантат CDR (PRO885) сравнивали со структурным трансплантатом (PRO1126). Оптимизация домена улучшила эффективность нейтрализации в три раза, при этом значения IC_{50} составляли 137,2 нг/мл для PRO885 и 48,15 нг/мл для PRO1126 (Фиг. 4 и Таблица 7).

Активность нейтрализации взаимодействия PDL1/PD-1 также оценивали для нескольких триспецифических молекул, обладающих доменом анти-CD137, полученным из клона 38-02-A04 или 38-27-A11, доменом анти-PDL1, полученным из клона 33-03-G02 или клона 37-20-B03, и двумя разными доменами связывания человеческого сывороточного альбумина, для продления периода полужизни (Фиг. 5 и Таблица 7). Домен HSA, полученный из клона 23-12-A01-sc03, также связывает мышинный сывороточный альбумин. Эксперименты проводили в присутствии 25 мг/мл HSA. Активность нейтрализации PRO1057 (IC_{50} = 665,1 нг/мл) была ниже, чем для авелумаба (Фиг. 5 и Таблица 7).

Другой формат, который продлевает период выведения в сыворотке, так называемый формат Моррисона, был протестирован в анализе активности репортерного гена на клетках. В этом формате одну специфичность несет фрагмент IgG (двухвалентность), и два scFv со специфичностями ко второй мишени связаны гибкими пептидными линкерами либо с тяжелой цепью (HC), либо с легкой цепью (LC) IgG. Все протестированные молекулы Моррисона несли домен анти-PDL1 трансплантата CDR клона 33-03-G02 на обоих плечах IgG. Две конструкции PRO1059 и PRO1060 отличаются слиянием двух scFv анти-CD137 либо с тяжелой цепью (HC), либо с легкой цепью (LC). PRO1062 имеет ту же архитектуру, что и PRO1060 с другим доменом CD137. Значения активности нейтрализации всех молекул были одинаковыми (Фиг. 6 и Таблица 7).

Пример 3: Блокада взаимодействия PDL1 с PD-1 и B7.1 с использованием ИФА (ELISA) конкуренции.

Эти анализы были выполнены для оценки способности ингибиторов PDL1 блокировать взаимодействие между PDL1 и PD-1 или PDL1 и B.71. Различные форматы,

включая scFvs, scDbs, scDb-scFv и Моррисон, анализировали методом ИФА конкуренции и сравнивали с эталонным авелумабом IgG.

ИФА конкуренции PDL1/PD-1

Метод

Микропланшеты для ИФА, покрытые накануне вечером 4 мкг/мл PD-1 человека при температуре 4°C, трижды промывали 450 мкл отмывочного буфера на лунку. Планшеты блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре путем добавления 300 мкл PBS с 1% BSA и 0,2% tween (буфер для разведения) в каждую лунку. Ингибиторы подвергали последовательному 3-кратному разведению до конечных концентраций в диапазоне от 300 до 0,005 нг/мл в буфере для разведения, содержащем 1 нг/мл биотинилированного PDL1 человека. Смеси предварительно инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, осторожно перемешивая на вращающемся смесителе (21 об/мин) и добавляли на микропланшеты после 3 циклов промывания 450 мкл отмывочного буфера на лунку. Планшеты инкубировали в течение 1,5 часов при комнатной температуре, осторожно перемешивая, затем 10 нг/мл стрептавидин-полиHRP40 добавляли в каждую лунку микропланшета после трех промывок 450 мкл отмывочного буфера на лунку. После 1 ч инкубации при комнатной температуре планшеты промывали три раза 450 мкл отмывочного буфера и добавляли раствор ТМВ субстрата. Ферментативную реакцию останавливали через 6 минут добавлением 1 М HCl и измеряли оптическую плотность при 450 нм, используя 690 нм в качестве контрольной длины волны. Для расчета значений IC₅₀ делали подбор логистической кривой с четырьмя параметрами (4PL) в программе Graph Pad Prism с использованием эталонных вычитаемых значений.

Результаты

Отдельные значения IC₅₀ на каждом планшете были откалиброваны по значению IC₅₀ эталонной молекулы авелумаба, которая была взята на каждом планшете (относительное значение IC₅₀: IC_{50, авелумаб}/IC_{50, тест.scFv}). Меры активности приведены в Таблице 8. Как показано на Фиг. 7 и в Таблице 8, все ингибиторы PDL1 блокировали взаимодействие PD-1 с PDL1 при тестировании методом ИФА конкуренции. PRO830 ScFv блокировал взаимодействие с аналогичной активностью, в то время как PRO997 и PRO1013 демонстрировали значительно более низкие значения IC₅₀, чем авелумаб, и, тем самым, являются более сильными ингибиторами. При объединении в мультиспецифичные форматы, т.е. scDbs или Моррисон, все молекулы сохраняют свои ингибирующие

свойства. PRO885 был менее эффективным, чем авелумаб, тогда как более низкое значение IC₅₀ было определено для PRO1126, содержащего улучшенный домен анти-PDL1. Форматы Моррисона были несколько менее активны по сравнению с авелумабом. Нейтрализующий эффект PRO1057 был также показан в присутствии человеческого сывороточного альбумина, где значения IC₅₀ были примерно в два раза выше.

ТАБЛИЦА 8

Блокада взаимодействия PDL1 с PD-1 и B7.1 с использованием ИФА конкуренции

Ид. №	Ид. № клона, PD-	Ид. № клона,	Ид. № клона,	Формат	Блокада взаимодействия PD-L1/PD-1		Блокада взаимодействия PD-L1/B7.1	
					IC ₅₀ (нг/мл)	отн. IC ₅₀	IC ₅₀ (нг/мл)	отн. IC ₅₀
PRO885	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	scDb	8.35	0.17	12.2	0.59
PRO951	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	scDb	9.50	0.15	9.30	0.78
PRO1126	33-03-G02 STR	38-02-A04 CDR	NA	scDb	1.28	1.59	TBD	TBD
PRO1057	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	23-13-A01 STR	scDb-scFv	8.61	0.20	16.29	0.53
PRO1059	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-L	4.54	0.37	28.98	0.30
PRO1060	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-H	5.67	0.30	17.42	0.49
PRO1062	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	Morrison-H	11.33	0.32	19.53	0.51
PRO997	37-20-B03 CDR	NA	NA	scFv	0.50	4.16	6.359	2.34
PRO1013	37-20-B03 CDR, VH1	NA	NA	scFv	0.57	3.67	4.05	3.68
PRO830	33-03-G02 CDR	NA	NA	scFv	3.40	0.61	12.87	1.16
PRO1186	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc01	23-13-A01 sc03	scDb-scFv	1.74	1.26	7.81	1.58
PRO1430	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	1.92	0.73	2.42	1.15
PRO1479	37-20-B03 sc09.1	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	2.65	0.86	10.71	1.38
PRO1482	37-20-B03 sc09.1	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	1.78	1.24	8.18	1.51
PRO1431	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	2.75	0.51	3.31	0.84
PRO1473	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	4.14	0.56	8.89	1.49
PRO1476	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	2.84	0.80	9.49	1.10
PRO1432	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	3.26	0.43	2.83	0.99
PRO1480	37-20-B03 sc09.1	38-27-A11 sc02	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	2.27	1	11.19	1.32
PRO1481	37-20-B03 sc09.1	38-27-A11 sc03	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	2.69	0.84	10.15	1.45

NA: не применимо

*: IC₅₀ авелумаб (нг/мл) / IC₅₀ тест. моноклона (нг/мл)

ИФА конкуренции PDL1/B7.1

Метод

Микропланшеты для ИФА, покрытые накануне вечером 4 мкг/мл B7.1 человека при температуре 4°C, трижды промывали 450 мкл отмывочного буфера на лунку. Планшеты блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре путем добавления 300 мкл PBS с 1% BSA и 0,2% Твина (tween) (буфер для разведения) в каждую лунку. Ингибиторы подвергали последовательному 3-кратному разведению до конечных концентраций в диапазоне от 900 до 0,015 нг/мл в буфере для разведения, содержащем 40 нг/мл биотинилированного PDL1. Смеси предварительно инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, осторожно перемешивая на вращающемся смесителе (21

об/мин) и добавляли на микропланшеты после 3 циклов промывания 450 мкл отмывочного буфера на лунку. Планшеты инкубировали в течение 1,5 часов при комнатной температуре, осторожно перемешивая, затем 10 нг/мл стрептавидин-полиHRP40 добавляли в каждую лунку микропланшета после трех промывок 450 мкл отмывочного буфера на лунку. После 1 ч инкубации при комнатной температуре планшеты промывали три раза 450 мкл отмывочного буфера и добавляли раствор ТМВ субстрата. Ферментативную реакцию останавливали через 6 минут добавлением 1 М HCl и измеряли оптическую плотность при 450 нм, используя 690 нм в качестве контрольной длины волны. Для расчета значений IC₅₀ делали подбор логистической кривой с четырьмя параметрами (4PL) в программе Graph Pad Prism с использованием эталонных вычитаемых значений.

Результаты

Отдельные значения IC₅₀ на каждом планшете были откалиброваны по значению IC₅₀ эталонной молекулы авелумаба, которая была взята на каждом планшете (относительное значение IC₅₀: IC_{50, авелумаб}/IC_{50, тест. scFv}). Меры активности приведены в Таблице 8. За исключением PRO1126 все ингибиторы PDL1 были также протестированы на их способность блокировать взаимодействие PD-1 с B7.1. PRO830 показал такую же активность, как и авелумаб, тогда как более низкие значения IC₅₀ были определены для PRO997 и PRO1013. Все scDbs и Моррисоны также ингибировали взаимодействие между PDL1 и B.7-1. ScDb PRO885 проявлял такую же активность, как и авелумаб, тогда как значения IC₅₀ для Моррисонов были примерно в 2-3,4 раза ниже. Данные показаны на фиг. 8 и в Таблице 8.

Пример 4: Ингибирование нейтрализации CD137 и CD137 гуманизированными доменами анти-CD137 отсутствует.

Методы:

Чтобы показать, что PRO885 не препятствует связыванию лиганда CD137 (CD137L) с CD137, использовали ИФА конкуренции. Коммерческие ингибирующие поликлональные козы антитела к CD137 (Antibodies online, кат. № ABIN636609) служили эталонами. Вкратце, CD137 наносили на планшет для ИФА накануне вечером, и последовательные разведения PRO885 добавляли на планшет для ИФА. После этого добавляли биотинилированный CD137L и детектировали связанный лиганд путем добавления стрептавидина-HRP. Наконец, добавляли ТМВ субстрат HRP. После проявления в течение 5 минут реакцию останавливали с помощью 1 М раствора HCl. Оптическую плотность измеряли при 450 нм и 690 нм в качестве эталона.

Результаты:

Кривые титрования, полученные для PRO885, содержащего домен CD137, полученный из клона 38-02-A04, представлены на Фиг. 9А, а кривые связывания, полученные для PRO951, содержащего домен CD137, полученный из клона 38-27-C05, представлены на Фиг. 9В. Кривые титрования, полученные для PRO1359 и PRO1360, содержащих домен CD137, полученный из клона 38-27-A11, представлены на Фиг. 9С. В то время как эталонное антитело полностью предотвращало связывание CD137L с CD137, PRO885, PRO951, PRO1359 и PRO1360 значительно не ингибировали связывание CD137L с CD137 и поэтому были определены как ненейтрализующие.

Пример 5: Эпитоп-специфическая сортировка 38-02-A04 и 38-27-C05 при сравнении с урелумабом и утомилумабом.

Методы:

Эпитопы связывания на CD137 белков PRO885 (scDb, содержащий трансплантат CDR 38-02-A04), PRO951 (scDb, содержащий трансплантат CDR 38-27-C05), кроличьих IgG, полученных из клона 38-27-A11, и молекулы-конкуренты урелумаб (BMS) и утомилумаб (Pfizer) сравнивали методом эпитоп-специфической сортировки SPR с использованием устройства MASS-1 (Sierra Sensors). Чтобы проверить, блокируют ли молекулы связь друг друга с CD137, использовали двухсайтовый метод. Таким образом, PRO885, PRO951, IgG кролика, полученные из клона 38-27-A11, урелумаб и утомилумаб были иммобилизованы по аминокислотной группе на сенсорных чипах высокой емкости (HCA, Sierra Sensors). Затем вводили 90 нМ антигена CD137 (PeproTech, кат. 310-15) и захватывали на scDbs, IgG кролика 38-27-A11, урелумабе или утомилумабе, с последующим немедленным введением 22,5 нМ второго антитела (PRO885, PRO951, IgG кролика 38-27-A11, урелумаба или утомилумаба). Были определены уровни захвата CD137 для каждого белка и уровни ответа второго связующего (единицы ответа, RU). Вычисляя теоретический максимальный ответ (R_{max}), который зависит от молекулярной массы вовлеченных белков и уровней захвата, определяли относительный уровень связывания (%) белков на захваченном антигене. Если молекулы связывают одинаковые, перекрывающиеся (например, структурно подобные или пространственно проксимальные) или сходные эпитопы на CD137, связывания антитела, введенного поверх захваченного CD137, происходить не должно. Следовательно, когда наблюдается связывание антитела, две пары антител связывают неперекрывающиеся эпитопы. Относительные уровни связывания (в %) определяли для каждой пары антител. По определению, уровень

связывания ниже 10% указывает на то же самое или наложение (например, структурно подобное или пространственно проксимальное) на CD137, а уровень выше 30% относится к неперекрывающимся эпитопам.

Результаты:

При иммобилизации PRO885 на сенсорном чипе все 3 антитела PRO951, урелумаб и утомилумаб показали связывание с CD137, захваченным PRO885. Как и ожидалось, связывания с PRO885, который использовался в качестве контроля, не наблюдалось (Фиг. 10 и Фиг. 11). При иммобилизации PRO951 на сенсорном чипе, урелумаб и PRO885 показали связывание, тогда как утомилумаб и PRO951, которые использовались в качестве контроля, не показали значительного связывания (Фиг. 10 и Фиг. 12). Эти результаты показывают, что PRO885, полученный из клона 38-02-A04, связывается с эпитопами на CD137, отличными от тех, с которыми связывается урелумаб, утомилумаб и PRO951, полученные из 38-27-C05. Напротив, RO951 связывается с эпитопом, который перекрывается с утомилумабом, но не с урелумабом и PRO885.

IgG 38-27-A11 не конкурировал с утомилумабом за связывание с CD137, что указывает на неперекрывающиеся эпитопы, но конкурировал при этом за связывание с CD137 с урелумабом, что указывает на либо одинаковые, либо перекрывающиеся эпитопы (Фиг. 10).

Пример 6: Оценка агонистического действия CD137 на молекулы антитела к PDL1xCD137 с помощью клеточного анализа трансгеной репортерной клеточной линии Юркат NFkB, экспрессирующей CD137.

Введение.

В этом анализе оценивали активацию передачи сигналов CD137 в клетках Юркат. Активность передачи сигналов CD137 регистрируют путем измерения экспрессии люциферазы, которая обусловлена индуцированной CD137 активацией NF-kB в репортерной клеточной линии Юркат. Экспрессия люциферазы напрямую коррелирует с активностью CD137. Кроме того, кластеризация CD137, которая необходима для активации сигнального пути, облегчается благодаря формированию иммунологического синапса между клетками Юркат и клеточной линией, экспрессирующей PDL1. Следовательно, экспрессия PDL1 необходима для кластеризации и активации CD137 на репортерной клеточной линии.

Методы.

Клетки CHO (клон A2), экспрессирующие PDL1, и клетки HCC827, нестимулированные или стимулированные в течение 24 ч 10 нг/мл IFN γ для повышения экспрессии PDL1, высевали из расчета 25 000 клеток на лунку в 96-луночные культуральные планшеты. В качестве отрицательного контроля клетки CHO WT без экспрессии PDL1 высевали при той же плотности. Затем готовили добавляли к клеткам серийные разведения молекул антител к PDL1xCD137, а также конкурентного урелумаба. Затем репортерные клетки Юркат готовили в среде для количественного определения, содержащей или не содержащей HSA в концентрации 25 мг/мл, и добавляли из расчета 40000 клеток на лунку. Экспрессию люциферазы определяли добавлением реагента люциферазы и считывали с помощью люминесцентного считывателя через 6 или 24 часа после добавления клеток Юркат. Данные анализировали путем нормализации относительных единиц люминесценции (RLU) исследуемых образцов к RLU, измеренным для урелумаба (Фиг. 13-18, Фиг. 19А) или PRO885 (Фиг. 19В), получая значения относительной активации передачи сигналов CD137.

Клетки HCC827, экспрессирующие PDL1, стимулированные в течение 24 ч 10 нг/мл IFN γ для повышения экспрессии PDL1, высевали в 50 мкл среды для культивирования клеток из расчета 25 000 клеток (RPMI, 10% FCS) на лунку на 96-луночных культуральных планшетах. В качестве отрицательного контроля клетки CHO-K1 WT без экспрессии PDL1 высевали при той же плотности. Затем добавляли 25 мкл концентрированных серийных пятикратных разведений двукратного сгущения соответствующих исследуемых молекул и эталонов PRO1186 и PRO885 в концентрации от 40 000 до 0,02 нг/мл. Затем в каждую лунку добавляли 25 мкл эффекторных клеток Юркат, экспрессирующих CD137 (Promega), разведенных при $1,6E + 06$ клеток/мл в буфере для анализа (RPMI1640 с 10 % FCS и 100 мг/мл HSA), что приводило к конечной концентрации HSA 25 мг/мл. Затем планшеты инкубировали в течение 6 часов и 24 часов при температуре 37°C и 5% CO $_2$. Наконец, в каждую лунку добавляли 50 мкл субстрата люциферазы (BPS Bioscience), приготовленного в соответствии с протоколом производителя, и планшеты инкубировали 15 мин в темноте, измеряли люминесценцию с использованием Flexstation III. Отдельные значения EC $_{50}$, IC $_{10}$ / EC $_{90}$ и AUC на каждом планшете были откалиброваны по соответствующим значениям эталонной молекулы PRO1186, которая была взята на каждом планшете (Таблица 16С). Значения EC $_{50}$ и EC $_{90}$ кривой дозовой зависимости были получены путем подбора точек логистической кривой с четырьмя параметрами с увеличением относительных единиц люминесценции (RLU), и, с другой стороны, точки с уменьшением RLU были подобраны с использованием подбора логистической кривой с четырьмя параметрами с ограниченным нижним пределом для

расчета значения IC₁₀. Площадь под кривой (AUC) была рассчитана для всех образцов с использованием нормализованных данных PRO885. Все параметры были получены с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Результаты

I. Тест PRO885 и PRO951 с использованием клеток CHO-PDL1:

Как показано на Фиг. 13, PRO885 и PRO951 активировали передачу сигналов CD137 в присутствии экспрессирующих PDL1 клеток CHO эффективнее, чем урелумаб. PRO885 показал лучшую активность и самый высокий сигнал активации (PRO885, EC₅₀ = 11,72 нг/мл, PRO951: EC₅₀ = 33,68 нг/мл; урелумаб: EC₅₀ = 79,11 нг/мл, Таблица 9). В отсутствие PDL1 ни PRO885, ни PRO951 не могли активировать CD137 в репортерных клетках, в то время как урелумаб показал активацию передачи сигналов CD137 независимо от PDL1.

ТАБЛИЦА 9

Значения EC₅₀ для молекул антител к PDL1xCD137 с использованием клеток CHO-PDL1

	Урелумаб	PRO885	PRO951
Нижний предел	-0,4628	-8,1	-4,066
Верхний предел	101,5	491,2	411,4
EC ₅₀ в нг/мл	79,11	11,72	33,68
R-квадрат	0,995	0,9922	0,9899

II. Тестирование STR-трансплантированных scDbs с использованием клеток CHO-PDL1:

Как показано на Фиг. 14 и в Таблице 10, молекулы scDb к PDL1xCD137 стимулировали передачу сигналов CD137 эффективнее, чем урелумаб. В отличие от урелумаба, стимулирующий эффект наблюдался только для scDb, в присутствии экспрессирующих PDL1 клеток-мишеней. Все scDb показали одинаковую активность стимуляции активации репортерного гена Nf-kB в присутствии клеток CHO, экспрессирующих PDL1 на высоких уровнях. Затем те же молекулы были протестированы в присутствии клеток, экспрессирующих меньшее количество PDL1.

III. Тестирование STR-трансплантированного scDb с использованием клеток HCC827 без IFN γ :

Как показано на Фиг. 15 и в Таблице 11, молекулы scDb к PDL1xCD137 стимулировали передачу сигналов CD137 эффективнее, чем урелумаб. ScDbs с

улучшенным по аффинности доменом CD137 (STR-трансплантаты 38-02-A04, PRO1120 и PRO1124) показали улучшенную активность при активации CD137 по сравнению с CDR7-трансплантированным доменом CDR (например, PRO885, $EC_{50} = 13,02$ нг/мл, PRO1124: $EC_{50} = 5,62$ нг/мл, Таблица 11). Следует отметить, что повышенная аффинность к PDL1, обнаруженная в отношении трансплантата STR домена PDL1 (Pro1126), также приводила к повышенной активности по сравнению с родительской молекулой PRO885 (PRO885, $EC_{50} = 13,02$ нг/мл, PRO1126: $EC_{50} = 6.97$ нг/мл, Таблица 11). При высоких концентрациях STR-трансплантированный scDb показал тенденцию к снижению сигнала активации. Это было более выражено в случае с молекулами, имеющими STR-трансплантированный домен CD137 (PRO1120 и PRO1126). Интересно, что при объединении трансплантата STR домена PDL1 с трансплантатом CDR CD137, снижения сигнала при высоких концентрациях не наблюдалось (сравните PRO885 и PRO1124 на Фиг. 15). Так, активность немного увеличилась с увеличением аффинности к CD137 и PDL1. Уменьшение сигнала при высоких концентрациях (кривая нормального распределения) было более явным при увеличении аффинности к CD137, при этом увеличение аффинности к PDL1 не способствовало этому эффекту. Так, представляется, что решающее значение для расширения окна концентрации максимальной активности имеет скорее отношение между аффинностью к CD137 и PDL1, чем абсолютная аффинность каждого домена.

Ид. номер Белка	Наименование Белка	Аффинность к CD137 человека: данные SPR				Аффинность к CD137 мыши: данные SPR				Аффинность к PD-L1 человека: данные SPR			
		K_d [M ⁻¹ s ⁻¹]	K_i [s ⁻¹]	K_D [M]	Уровень связывания, нормализованный по теоретическому	K_d [M ⁻¹ s ⁻¹]	K_i [s ⁻¹]	K_D [M]	Уровень связывания, нормализованный по теоретическому	K_d [M ⁻¹ s ⁻¹]	K_i [s ⁻¹]	K_D [M]	Уровень связывания, нормализованный по теоретическому
PRO1118	38-07-A04 scDb CD8-1/33_02_1-02 scD137-0	2,79E+03	7,23E-04	2,85E-03	79,2	8,29E+04	2,27E-03	1,73E-09	11,5	1,34E+06	1,00E-05	7,49E-12	79,2
PRO1119	38-02-A04 scDb scDb-1/33_02_302 scD137-0	3,81E+05	2,76E-04	7,24E-10	79,1	1,40E+05	2,48E-02	1,77E-07	81,0	1,50E+06	1,40E-05	6,67E-12	77,5
PRO1120	38-02-A04 scDb Full scDb-1/33_02_602 scD137-0	5,78E+03	1,00E-03	1,73E-11	74,7	2,12E+03	3,25E-03	1,54E-08	87,3	1,27E+06	1,00E-05	7,87E-12	76,8

IV. Тестирование STR-трансплантированного scDb с использованием клеток HCC827 с IFN γ :

Стимуляция HCC827 с помощью IFN γ приводила к увеличению сигнала активации без изменения активности молекул scDb. Следует отметить, что падение сигнала при высокой концентрации тестируемого scDb было менее выраженным в этих условиях, что указывает на корреляцию с экспрессией PDL1 (Фиг. 16 и Таблица 12).

V. Тестирование молекул с большим периодом полужизни с использованием клеток CHO-PDL1:

Как показано на Фиг. 17 и 18, в Таблицах 13 и 14, протестированные молекулы антител к PDL1xCD137 с большим периодом полужизни стимулировали передачу сигналов CD137 в той же степени, что и урелумаб. Разница была в том, что форматы Моррисона (PRO1060, PRO1062) сравнивали с форматами scDb-scFv (PRO1057, PRO1058). В то время как форматы Моррисона показали более высокую активность, максимальный сигнал активации был значительно повышен при тестировании scDb-scFv. Следует отметить, что после 24 ч инкубации PRO1057 показал особенно высокий сигнал активации. Все протестированные молекулы с большим периодом полужизни активировали передачу сигналов CD137 только в присутствии экспрессирующих PDL1 клеток. Интересно, что несмотря на аналогичную аффинность к обоим мишеням, PRO1057 показал значительно более высокий максимальный сигнал, чем PRO1058. Кроме того, одновалентный PRO1057 scDb-scFv показал более сильную активацию, чем соответствующий двухвалентный PRO1060 в формате Моррисона.

VI. Тестирование молекул с большим периодом полужизни с использованием клеток HCC827 без и с IFN γ :

Как показано на Фиг. 19A и в Таблице 15, протестированные молекулы с большим периодом полужизни антител к PDL1xCD137 стимулировали передачу сигналов CD137 в той же степени, что и урелумаб, в присутствии клеток, экспрессирующих более низкие количества PDL1. Максимальная активация тестируемых молекул дополнительно увеличивалась, когда клетки-мишени стимулировались IFN γ , что указывает на прямую корреляцию активации CD137 с уровнями экспрессии PDL1 на клетках-мишенях. Как было отмечено выше, PRO1057 показал более высокий уровень активации репортерного гена по сравнению с форматами Моррисона (PRO1060).

На Фиг. 19B представлены результаты тестирования триспецифических молекул scDb-scFv PRO1430, PRO1431, PRO1432, PRO1473, PRO1476, PRO1479, PRO1480, PRO1481 и PRO1482 при количественном определении активности CD137 в присутствии HCC827, стимулированного IFN γ (10 нг/мл), в течение 6 ч и 24 ч.

Данные по активации репортерного гена NF-kB мультиспецифическими конструкциями PDL1 x CD137 приведены в Таблицах 16A, 16B и 16C.

Чтобы сравнить форму кривых активности для кандидатных молекул, была рассчитана площадь под кривой (AUC, представляющая комбинированный показатель амплитуды сигнала и ширины колоколообразной кривой, величины эффекта) и ширина плато

(отношение EC90/IC10, указывающее на терапевтическое окно) (см. Таблицу 16С). Наилучшие относительные значения AUC (по меньшей мере выше 1 в одну временную точку при нормализации к PRO1186) были получены для PRO1430, PRO1479, PRO1480 и PRO1481. Следует отметить, что высокое отношение EC90/IC10 тестируемого образца указывает на широкую колоколообразную кривую дозовой зависимости и, как следствие, обеспечивает более широкий диапазон концентраций полной активности. Таким образом, лучшие кандидаты показывают полную активность в диапазоне концентраций в несколько сотен раз.

Исходя из этих параметров, наиболее эффективными scDb-scFv при количественном определении с использованием репортерного гена NF-κB были PRO1430, PRO1479 и PRO1480.

ТАБЛИЦА 10. Значения EC_{50} для молекул антител к PDL1xCD137 с использованием клеток CHO-PDL1.

	Урелумаб	PRO885	PRO1118	PRO1119		Урелумаб	PRO885	PRO1120	PRO1123		Урелумаб	PRO885	PRO1124	PRO1126
Верх. предел	-0.5169	-6.408	-2.387	2.039	Верх. предел	-0.6273	0.5392	6.497	-1.816	Верх. предел	-0.499	-11.51	2.552	-2.922
Ниж. предел	99.99	249.1	245.3	238.9	Ниж. предел	100	222.1	201.1	219.2	Ниж. предел	100	253.8	228.6	242.1
EC_{50} в нг/мл	79.47	5.135	4.596	4.22	EC_{50} в нг/мл	104.2	4.856	4.689	5.753	EC_{50} в нг/мл	86.51	6.299	3.681	5.997
R-квадрат	0.9637	0.9708	0.9761	0.9726	R-квадрат	0.9677	0.9769	0.963	0.9568	R-квадрат	0.979	0.9714	0.9561	0.9467

ТАБЛИЦА 11. Значения EC_{50} для молекул антител к PDL1xCD137 с использованием клеток HCC827 без IFN γ .

	Урелумаб	PRO885	PRO1118	PRO1119		Урелумаб	PRO885	PRO1120	PRO1123		Урелумаб	PRO885	PRO1124	PRO1126
Верх. предел	-2.035	-0.5477	-0.3666	0.1789	Верх. предел	-1.986	-0.2298	0.0807	-0.8367	Верх. предел	-1.384	-0.3237	-1.084	-8.28
Ниж. предел	100	96.45	81.98	74.91	Ниж. предел	99.96	111.1	126.5	123.2	Ниж. предел	99.98	118.7	113.2	135.1
EC_{50} в нг/мл	212.5	11.5	8.559	5.045	EC_{50} в нг/мл	109.9	13.06	6.685	16.12	EC_{50} в нг/мл	111.7	13.02	5.616	6.966
R-квадрат	0.9815	0.9852	0.995	0.9725	R-квадрат	0.9895	0.9759	0.9609	0.96	R-квадрат	0.9941	0.9816	0.9875	0.9577

ТАБЛИЦА 12. Значения EC_{50} для STR-трансплантационного scDb с использованием клеток HCC827, стимулированных IFN γ .

	Урелумаб	PRO885	PRO1118	PRO1119		Урелумаб	PRO885	PRO1120	PRO1123		Урелумаб	PRO885	PRO1124	PRO1126
Верх. предел	-1.208	-1.446	-1.564	0.1399	Верх. предел	-1.009	-2.023	0.1813	-3.584	Верх. предел	-1.28	-0.7258	1.572	-1.561
Ниж. предел	100	167.4	146.5	139.9	Ниж. предел	99.98	134.2	117.3	154.4	Ниж. предел	100	165.8	188.5	207.7
EC_{50} в нг/мл	114.2	9.266	7.965	4.855	EC_{50} в нг/мл	144.8	8.883	5.15	11.87	EC_{50} в нг/мл	108.2	9.229	4.833	5.48
R-квадрат	0.9939	0.9803	0.996	0.9767	R-квадрат	0.9811	0.9795	0.9554	0.9883	R-квадрат	0.9976	0.9764	0.9906	0.9825

ТАБЛИЦА 13. Значения EC_{50} для молекул с большим периодом полужизни с использованием экспрессирующих PDL1 клеток CHO (6 ч).

	Урелумаб	PRO885	PRO1060	PRO1062		Урелумаб + HSA	PRO885 + HSA	PRO1057 + HSA	PRO1058 + HSA
Верх. предел	-0.09762	6.019	-5.304	-1.947	Верх. предел	-0.8837	6.69	-7.721	-0.5282
Ниж. предел	99.96	337.5	220.4	199.1	Ниж. предел	106.3	492.8	462.9	40.06
EC_{50} в нг/мл	56.45	7.843	56.42	52.16	EC_{50} в нг/мл	77.72	7.916	111.5	70.93
R-квадрат	0.9848	0.9474	0.9874	0.993	R-квадрат	0.9957	0.9457	0.9943	0.6132

ТАБЛИЦА 14. Значения EC_{50} для молекул с большим периодом полужизни с использованием экспрессирующих PDL1 клеток CHO (24 ч).

	Урелумаб	PRO885	PRO1060	PRO1062		Урелумаб + HSA	PRO885 + HSA	PRO1057 + HSA	PRO1058 + HSA
Верх. предел	0.2207	-11.83	-5.151	-3.914	Верх. предел	-0.3454	-5.805	-7.71	-0.4289
Ниж. предел	88.59	196.1	141.1	130.5	Ниж. предел	90.45	258.5	744.9	20.53
EC_{50} в нг/мл	46.63	13.75	80.85	86.87	EC_{50} в нг/мл	78.17	14.85	792.4	121.4
R-квадрат	0.9739	0.9869	0.991	0.9737	R-квадрат	0.9893	0.9812	0.9955	0.6294

ТАБЛИЦА 15. Значения EC₅₀ для молекул с большим периодом полужизни с использованием клеток HCC827, стимулированных IFN γ .

	HCC827 без стимуляции IFN γ				HCC827 со стимуляцией IFN γ			
	Урелумаб	PRO885	PRO1057 (+HSA)	PRO1060	Урелумаб	PRO885	PRO1057 (+HSA)	PRO1060
Верх. предел	-0.7119	-5.806	0.08644	-0.6993	-2.649	-3.386	-3.323	-1.177
Ниж. предел	85.16	136.6	63.18	43.56	91.62	140.2	136.6	83.61
EC ₅₀ в нг/мл	47.49	9.518	76.61	13.57	52.77	7.515	115	17.51
R-квадрат	0.975	0.9838	0.9478	0.9255	0.9743	0.9901	0.9911	0.972

ТАБЛИЦА 16А Активация репортерного гена NF- κ B мультиспецифическими конструкциями PDL1 x CD137.

Ид. № белка	Ид. № клона, PD-L1	Ид. № клона, CD137	Ид. № клона, SA	Формат	Активация репортерного гена NF- κ B с помощью CHO-PD-L1				Активация репортерного гена NF- κ B с помощью HCC827 -IFN γ				Активация репортерного гена NF- κ B с помощью HCC827 -IFN γ			
					IC ₅₀ (нг/мл)	отн. IC ₅₀ [*]	макс. активация (%)	HSA	IC ₅₀ (нг/мл)	отн. IC ₅₀ [*]	макс. активация (%)	HSA	IC ₅₀ (нг/мл)	отн. IC ₅₀ [*]	макс. активация (%)	HSA
PRO885	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	scDb	11.72	6.75	499.42	no	13.06	8.42	111.10	8.88	16.30	134.20	no	
PRO951	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	scDb	33.68	2.35	431.70	no	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
PRO1123	33-03-G02 CDR	38-02-A04 IF	NA	scDb	5.75	18.11	219.20	no	16.12	6.82	123.20	11.87	12.20	154.40	no	
PRO1124	33-03-G02 CDR	38-02-A04 STR	NA	scDb	3.68	23.50	228.60	no	5.62	19.89	113.20	4.83	22.39	188.50	no	
PRO1126	33-03-G07 STR	38-02-A04 CDR	NA	scDb	6.00	14.43	242.10	no	6.97	16.04	135.10	5.48	19.74	207.70	no	
PRO963	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	19-01-H04 STR	scDb-scFv	ND	ND	368.67	yes, 24h	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
PRO1057	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	23-13-A01 STR	scDb-scFv	792.40	0.10	662.79	yes, 24h	76.61	0.62	68.99	115.00	0.46	135.34	yes, 24h	
PRO1058	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	23-13-A01 STR	scDb-scFv	121.40	0.64	36.23	yes, 24h	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
PRO1059	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-I	289.10	0.09	189.09	no, 24h	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
PRO1060	33-03-G02 CDR	38-02-A04 CDR	NA	Morrison-H	80.85	0.58	144.13	no, 24h	13.57	3.50	54.94	17.51	3.01	97.04	no, 24h	
PRO1061	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	Morrison-L	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
PRO1062	33-03-G02 CDR	38-27-C05 CDR	NA	Morrison-H	86.87	0.54	133.52	no, 24h	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
PRO1186	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc01	23-13-A01 sc03	scDb-scFv	50.96	0.97	152.06	yes, 24h	ND	ND	ND	16.68	1.88	128.88	yes, 24h	

NA: не применимо

ND: не определено

yes: да

no: нет

*: IC₅₀, урелумаб (нг/мл) / IC₅₀, тест-молекула (нг/мл)

ТАБЛИЦА 16В Активация репортерного гена NF-κB мультиспецифическими конструкциями PDL1 x CD137.

Ид. № белка	Ид. № клона. PD-	Ид. № клона,	Ид. № клона, SA	Формат	Активация репортерного гена NF-κB с помощью HCC827 +IFNγ				
					Врем. точка (ч)	IC ₅₀ (нг/мл)	отн. IC ₅₀ [*]	макс. активация (%)	HSA
PRO1430	37-20-B03 sc01	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	6	9.80	1.31	110.1	yes
					24	4.42	1.51	98.6	yes
PRO1479	37-20-B03 sc09.1	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	6	7.38	1.74	108.2	yes
					24	7.61	0.87	118.6	yes
PRO1482	37-20-B03 sc09.1	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	6	20.05	0.55	108.6	yes
					24	7.24	1.23	92.7	yes
PRO1431	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	6	21.02	0.68	55.3	yes
					24	18.39	1.02	68.6	yes
PRO1473	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	6	2.40	2.30	36.2	yes
					24	0.91	3.55	67.4	yes
PRO1476	33-03-G02 sc03	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	6	5.97	2.02	36.4	yes
					24	3.90	1.83	76.1	yes
PRO1432	33-03-G02 sc18	38-02-A04 sc013	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	6	19.36	0.67	63.4	yes
					24	21.89	0.75	83.8	yes
PRO1480	37-20-B03 sc09.1	38-27-A11 sc02	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	6	6.44	1.93	114.3	yes
					24	4.67	1.00	120.9	yes
PRO1481	37-20-B03 sc09.1	38-27-A11 sc03	19-01-H04 sc03	scDb-scFv	6	7.22	1.04	147.3	yes
					24	5.51	0.58	116.8	yes

NA: не применимо

ND: не определено

yes: да

*: IC_{50, антиген} (нг/мл) / IC_{50, белок} (нг/мл)

ТАБЛИЦА 16С Значения способности scDb-scFv активировать CD137 при количественном определении репортерного гена NF-kB. Домены антител CD137 получают из клонов IgG 38-02-A04 и 38-27-A11; домены антител PDL1 получают из клонов IgG 37-20-B03 и 33-03-G02; домен антител SA получают из клона IgG 19-01-H04.

Идентификационный номер белка	домен scDb-i	Домен scDb-o	Домен scFv	Временная точка [ч]	EC ₅₀ [нг/мл]	отн. EC ₅₀ (EC ₅₀ , PRO186/EC ₅₀ , образце)	Максимальная активация NF-kB (отн. к PRO186) [%]	Отношение IC ₁₀ / EC ₉₀	отн. IC ₁₀ / EC ₉₀ (отношение образцы / отношение PRO1186)	Площадь под кривой (рассчитывается с использованием нормализованных данных PRO885)	отн. Площадь под кривой (AUC _{образец} / AUC _{PRO186})
PRO1430	38-02-A04-sc13	37-20-B03-sc01	19-01-H04-sc03	6 24	9,80 4,42	1,31 1,51	110,08 98,57	72,42 1240,89	0,22 3,94	196,40 179,90	1,03 0,87
PRO1431	38-02-A04-sc13	33-03-G02 sc18	19-01-H04-sc03	6 24	21,02 18,39	0,68 1,02	55,29 68,62	5,03 16,07	0,30 1,74	83,15 118,70	0,40 0,54
PRO1432	33-03-G02-sc18	38-02-A04 sc13	19-01-H04-sc03	6 24	19,36 21,89	0,67 0,75	63,36 83,76	26,84 3,57	0,36 0,16	111,40 149,60	0,59 0,81
PRO1473	38-02-A04-sc13	33-03-G02 sc03	19-01-H04-sc03	6 24	2,40 0,91	2,30 3,55	36,19 67,40	53,87 15,73	1,01 0,12	52,34 187,90	0,31 0,73
PRO1476	33-03-G02-sc03	38-02-A04 sc13	19-01-H04-sc03	6 24	5,97 3,90	2,02 1,83	36,35 76,14	34,24 35,73	2,66 1,63	93,49 134,60	0,39 0,59
PRO1479	38-02-A04-sc13	37-20-B03-sc09.1	19-01-H04-sc03	6 24	7,38 7,61	1,74 0,87	108,25 118,64	81,94 522,81	0,25 1,66	191,10 206,60	1,11 1,37
PRO1480	38-27-A11-sc02	37-20-B03-sc09.1	19-01-H04-sc03	6 24	6,44 4,67	1,93 1,00	114,29 120,91	42,99 359,55	0,54 1,86	232,10 261,20	1,20 1,29
PRO1481	38-27-A11-sc03	37-20-B03-sc09.1	19-01-H04-sc03	6 24	7,22 5,51	1,04 0,58	147,28 116,81	23,74 40,98	1,71 5,72	291,90 253,80	1,37 1,00

Индукция секреции IL-2 Т-клетками при обработке PRO885

мкг/мл антитела к CD3	2			1		
	50 000	100 000	200 000	50 000	100 000	200 000
Клетки CHO- A1/лунка						
EC50 (нг/мл)	52,01	41,85	30,05	12,85	86,22	80,62

Пример 7: Оценка стимулирующего действия Т-клеток на сопутствующую блокаду PDL1 и стимуляцию CD137 в анализе на основе клеток с использованием моноцеллярных клеток периферической крови человека и трансгенных клеток CHO, экспрессирующих PDL1.

Метод

Клетки CHO-A2, экспрессирующие PDL1, высевали с тремя различными плотностями в диапазоне от 50 000 до 200 000 клеток на лунку на 96-луночных культуральных планшетах, предварительно покрытых антителом к CD3 человека. Планшеты инкубировали в течение ночи при температуре 37°C, 5% CO₂. На следующий день моноцеллярные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из свежей цельной крови человека с помощью центрифугирования в градиенте плотности. 100000 PBMC на лунку добавляли в 96-луночный планшет с последующим добавлением scDb PRO885 к PDL1xCD137 в концентрациях 500, 50 и 5 нг/мл. После 76 часов инкубации собирали надосадочные жидкости клеток. Уровни интерлейкина-2 (IL-2) человека в культуральных надосадочных жидкостях определяли количественно методом твердофазного иммуноферментного анализа IL-2 human ELISA MAX от компании Biolegend, в соответствии с инструкциями к набору. Концентрации IL-2 интерполировали по стандартной кривой IL-2, рассчитывали по результатам измерений и откладывали в зависимости от концентраций PRO885 для расчета значений EC50.

Результаты

Как показано на Фиг. 20, IL-2 секретировался Т-клетками после сопутствующей блокады взаимодействия PD-1/PDL1 и стимуляции CD137 путем добавления биспецифичной молекулы PRO885. Уровни секретируемого IL-2 увеличивались с увеличением плотности антител к CD3 и клеток CHO-A2 и повышением концентраций PRO885. В отсутствие антител к CD3 уровни IL-2 были сопоставимы с базальной секрецией IL-2. PRO885 активировал только Т-клетки, совместно стимулированные

антителом к CD3. Отсутствие дозозависимой выработки IL-2 без стимулирования антителом CD3 подтверждает селективную активацию антиген-специфичных Т-клеток. Это открытие демонстрирует, что PRO885 стимулирует только активированные Т-клетки, и что указывает на то, что PRO885 *in vivo* исключительно стимулирует опухолеспецифичные Т-клетки.

Пример 8: Оценка стимулирующего эффекта сопутствующей блокады PDL1 и стимуляции CD137 в анализе на клетках с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека, стимулированных суперантигеном SEA.

В этом эксперименте оценивали синергетический эффект ингибирования PD-1/PDL1 и агонизма CD137. В анализе использовали мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), которые стимулировали суперантигенным стафилококковым энтеротоксином А (SEA) для индукции экспрессии PDL1 на антиген-представляющих клетках (APC) и Т-клетках соответственно и CD137 на Т-клетках. Применение молекул антител к PDL1xCD137 одновременно было нацелено два регуляторных сигнальных пути Т-клеток: ингибирование ингибирующего пути PD-1/PDL1, а также активация пути CD137 путем образования иммунологического синапса, опосредованного биспецифической молекулой PRO88 к PDL1xCD137 или триспецифической молекулой PRO1175, PRO1430, PRO1479 или PRO1480 к PDL1xCD137xHSA. Оценивали активацию Т-клеток биспецифической молекулой антитела к PDL1xCD137 PRO885 (SEQ ID NO: 209) или триспецифической молекулой антитела к PDL1xCD137xHSA PRO1175 (SEQ ID NO: 220), PRO1430 (SEQ ID NO: 222), PRO1479 (SEQ ID NO: 223) или PRO1480 (SEQ ID NO: 229). Активацию Т-клеток оценивали по секреции интерлейкина-2 (IL-2) и сравнивали с эффектом, опосредованным ингибированием PDL1, опосредованным авелумабом в качестве антитела эталонного сравнения. Кроме того, scFv к PDL1, PRO997, был протестирован и сопоставлен с авелумабом с использованием той же экспериментальной модели. Кроме того, активацию Т-клеток биспецифической молекулой антитела к PDL1xCD137 PRO885 (SEQ ID NO: 209) или триспецифической молекулой антитела к PDL1xCD137xHSA PRO1175 (SEQ ID NO: 220), PRO1430 (SEQ ID NO: 222), PRO1479 (SEQ ID NO: 223) или PRO1480 (SEQ ID NO: 229) сравнивали с действием эталонного антитела авелумаба или урелумаба или их комбинации.

Метод

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из свежей цельной крови человека с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Затем из PBMC элиминировали NK-клетки с использованием антитела к CD56 и набора для разделения клеток MACS (Miltenyi Biotec). Затем в 96-луночный планшет добавляли 100 000 PBMC на лунку с последующим добавлением серийных разведений PRO885, PRO997, PRO1175, PRO1430, PRO1479 или PRO1480, авелумаба, урелумаба и комбинации авелумаба и урелумаба в аналитическом буфере, содержащем SEA в концентрации 10 нг/мл. После 96 часов инкубации при температуре 37°C и 5% CO₂ собирали надосадочные жидкости клеток и количественно определяли уровни интерлейкина-2 (IL-2) человека в культуральных надосадочных жидкостях с методом твердофазного иммуноферментного анализа IL-2 human ELISA MAX от компании Biolegend, в соответствии с инструкциями к набору. Концентрации IL-2 интерполировали по стандартной кривой IL-2, рассчитывали по результатам измерений и откладывали в зависимости от концентраций авелумаба, комбинации концентраций авелумаба и урелумаба и PRO885 для расчета значений EC₅₀ (Фиг. 21 и Таблица 18) или откладывали в зависимости от концентраций авелумаба, урелумаба, комбинации концентраций авелумаба и урелумаба, PRO885 и PRO1175 или PRO1186 для расчета значений EC₅₀ (Фиг. 23 и Таблица 19).

Результаты

ТАБЛИЦА 18

Значения EC₅₀ для PRO885 и PRO997 при количественном определении PBMC с использованием стимуляции SEA

	Авелумаб	PRO885		Авелумаб	PRO997
Верх. предел	2479	7463	Верх. предел	2117	3226
Ниж. предел	8687	20663	Ниж. предел	8588	9480
EC ₅₀ в	69.89	39.92	EC ₅₀ в	90.18	40.86
	0.8589	0.9052		0.8783	0.867

Как показано на Фиг. 21, IL-2 секретировался Т-клетками после сопутствующей блокады взаимодействия PD-1/PDL1 и стимуляции CD137 путем добавления биспецифичной молекулы PRO885. По сравнению с авелумабом PRO885 показал более высокую активацию Т-клеток и лучшую активность (PRO885, EC₅₀ = 39,92 нг/мл; авелумаб, EC₅₀ = 69,89 нг/мл, Таблица 18). Этот результат показывает, что биспецифичный scDb PRO885 к PDL1xCD137 способен вызывать более сильную стимуляцию Т-клеток, чем простая блокада PDL1 с помощью авелумаба. Кроме того,

было установлено, что характеризующийся высокой аффинностью scFv PRO997 к PDL1 является более мощным стимулятором Т-клеток, чем авелумаб (PRO997, $EC_{50} = 40,86$ нг/мл; авелумаб, $EC_{50} = 90,18$ нг/мл, Таблица 18).

Кроме того, было показано, что биспецифичный scDb PRO885 к PDL1xCD137: (i) способен вызывать более сильную стимуляцию Т-клеток, чем урелумаб (Фиг. 23), и (ii) более эффективен в стимуляции Т-клеток, чем урелумаб (PRO885, $EC_{50} = 55,21$ нг/мл, урелумаб, $EC_{50} = 278,3$ нг/мл, Таблица 19).

ТАБЛИЦА 19

Значения EC_{50} для авелумаба, урелумаба, комбинации авелумаба и урелумаба, PRO885 и PRO1175 в количественном определении РМБС с использованием стимуляции SEA

	Планшет 1		Планшет 2		Планшет 3	
	Авелумаб + Урелумаб	Авелумаб	Урелумаб	PRO885	Авелумаб + Урелумаб	PRO1175
Верх. предел	5974	747,6	5005	4453	3912	5300
Ниж. предел	53127	N.A	21739	77855	53626	87743
EC_{50} в нг/мл	174,1	N.A	278,3	55,21	318,6	31,11
R-квадрат	0,9594	0,9315	0,8602	0,9875	0,976	0,9832

Кроме того, в то время как комбинация авелумаба и урелумаба могла вызывать более сильное стимулирование Т-клеток, чем один авелумаб (Фиг. 23), scDb-scFvs PRO1175, PRO1186, PRO1430, PRO1479 и PRO1480 усиливали выработку IL-2 (Фиг. 21 и 23), вероятно, из-за его способности к гиперкластеризации CD137. ScDb-scFv PRO1175 (i) способен вызывать значительно более сильную стимуляцию Т-клеток, чем комбинация авелумаба и урелумаба (Фиг. 23), и (ii) более эффективен в стимуляции Т-клеток, чем комбинация авелумаба и урелумаба (PRO1175, $EC_{50} = 31,11$ нг/мл, авелумаб + урелумаб, $EC_{50} = 318,6$ нг/мл, Таблица 19). Кроме того, PRO1430, PRO1479, PRO1482 и PRO1480 продемонстрировали превосходную способность стимулировать выработку IL-2 в РМБС по сравнению с другими молекулами scDb-scFv (Фиг. 21 и 23). ScDb-scFv PRO1480 показал наивысшую способность стимулировать IL-2 в РМБС по сравнению с другими протестированными молекулами scDb-scFv (Фиг. 21).

Пример 9: Передача сигналов дополнительной стимуляции происходит только в сочетании со стимулом TCR и более выражена с scDb-scFv PDL1xCD137, чем с комбинацией IgG1 PDL1 и IgG4 CD137.

В этом эксперименте оценивали синергетический эффект ингибирования PD-1/PDL1 и агонизма CD137. В анализе использовали мононуклеарные клетки периферической крови (РМБС) в присутствии PDO1, экспрессирующего клетки CHO,

антитела к CD3, чтобы индуцировать экспрессию CD137 на Т-клетках. Применение молекул антител к PDL1xCD137 одновременно было нацелено два регуляторных сигнальных пути Т-клеток: ингибирование ингибирующего пути PD-1/PDL1, а также активация пути CD137 путем образования иммунологического синапса, опосредованного триспецифической молекулой PRO1186 к PDL1xCD137xHSA. Активацию Т-клеток триспецифической молекулой PRO1186 антитела к PDL1xCD137xHSA оценивали по секреции интерлейкина-2 (IL-2) или IFN γ и сравнивали с эффектом, опосредованным ингибированием PDL1, опосредованным авелумабом в качестве антитела эталонного сравнения, перекрестным сшиванием CD137, опосредованным урелумабом, или их комбинацией.

Метод

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из свежей цельной крови человека с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Затем 100 000 PBMC на лунку добавляли в 96-луночный планшет, содержащий антитело к CD3 (BD Pharmingen, кат. 551916) в концентрации 2 мкг/мл и 10 000 клеток CHO, экспрессирующих PDL1 человека, на лунку, с последующим добавлением серийных разведений PRO1186, авелумаба, урелумаба и комбинации авелумаба и урелумаба в буфере для анализа. После 72 часов инкубации при температуре 37°C и 5% CO $_2$ собирали надосадочные жидкости клеток и количественно определяли уровни интерлейкина-2 (IL-2) и IFN γ человека в культуральных надосадочных жидкостях. Уровни интерлейкина-2 (IL-2) человека определяли количественно методом твердофазного иммуноферментного анализа IL-2 human ELISA MAX от компании Biolegend, в соответствии с инструкциями к набору. Концентрации IL-2 интерполировали по стандартной кривой IL-2 (Фиг. 23E). Уровни IFN γ человека определяли количественно методом твердофазного иммуноферментного анализа Human IFN- γ DuoSet ELISA от компании R&D Systems, в соответствии с инструкциями к набору (Фиг. 23F).

Результаты

Как показано на Фиг. 23 (E) и (F), IL-2 и IFN γ секретировались Т-клетками после сопутствующей блокады взаимодействия PD-1/PDL1 и стимуляции CD137 путем добавления триспецифической молекулы PRO1186. Этот результат показывает, что триспецифичный scDb-scFv PRO1186 к PDL1xCD137xHSA способен вызывать более сильную стимуляцию Т-клеток, чем простая блокада PDL1 с помощью авелумаба или блокада CD137 с помощью урелумаба или их комбинации. PRO1186 был более активен в

плане стимулирования выработки IL-2 (Фиг. 23E) и IFN γ (Фиг. 23F), чем авелумаб или урелумаб или их комбинация. В отсутствие антител к CD3 уровни IL-2 и IFN γ были сопоставимы с секрецией базальных цитокинов при всех протестированных концентрациях, что свидетельствует о необходимости передачи сигналов TCR или связывания CD3 для продуктивной передачи сигналов CD137.

Пример 10: Оценка противоопухолевой эффективности блокады PDL1 и сопутствующей локализованной стимуляции CD137 в модели ксенотрансплантата рака легкого, полученной с использованием линии клеток человека HCC827

Противоопухолевую активность мультиспецифического антитела по настоящему изобретению сравнивали с терапией антителами к PDL1 и CD137 в ксенотрансплантатах HCC827 NSCLC человека с использованием иммунодефицитных мышей линии NOG от компании Taconic и аллогенных мононуклеарных клеток периферической крови человека. Трансплантированные Т-лимфоциты человека проявляют ксеногенную реактивность к чужеродному главному комплексу гистосовместимости (MHC) I и II классов и другим антигенам из клеток мышей. В результате Т-лимфоциты вызывают воспалительный инфильтрат в различных органах, который приводит к гибели животных через несколько недель, процесс, известный как реакция «ксенотрансплантат против хозяина» (РкТПХ). Было показано, что лечение иммуномодулирующими антителами, такими как антитела к PDL1 и CD137, усиливает РкТПХ (Sanmamed MF et al. Nivolumab and urelumab enhance antitumor activity of human T lymphocytes engrafted in Rag2^{-/-}IL2R^{gnull} immunodeficient mice. *Cancer Res* 2015;75(17):3466-3478). Влияние PRO1057 (scDb-scFv; SEQ ID NO: 218) и PRO1060 (IgG-scFv с scFv CD137, слитым с C-концом тяжелой цепи IgG; SEQ ID NO: 234 и 235) на объем опухоли сравнивали с лечением IgG1, содержащими тот же PDL1-специфичный переменный домен, что и мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению (например, PRO1137), и с лечением IgG4 с таким же CD137-специфичным переменным доменом (PRO1138). Для получения дополнительных доказательств локализованного противоопухолевого иммунного ответа с помощью проточной цитометрии была проанализирована частота противоопухолевых эффекторных лимфоцитов, таких как CD8⁺, CD4⁺ и регуляторные Т-клетки. Для изучения модуляции иммунной системы системно после лечения анти-CD137/анти-PDL1 частоту Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ в печени и селезенке анализировали с помощью проточной цитометрии.

Кроме того, системные уровни IFNg были проанализированы с использованием количественного метода ИФА.

Популяция исследования и схема лечения

Самки мышей линии NOG получали односторонние инъекции 5×10^6 клеток HCC827. Клетки вводили в смесь 50% клеточной суспензии в фосфатном буфере и 50% матригеля в общем объеме инъекции 100 мкл. После инъекции опухолевых клеток мышам линии NOG и успешного приживания опухоли (медианный объем опухоли в группе составлял 80-100 мм³) объем опухоли заменили 5×10^6 РВМС человека путем внутривенной инъекции. В день рандомизации объемы опухолей четырех мышей из каждой группы повторно растворили с РВМС от донора А и еще четырех мышей - с РВМС от донора В. Обработку проводили через 1-2 часа после инъекции РВМС следующим образом:

Ид. № группы	Соединение	Общая суточная доза [мг]	Относительные единицы (г.У)	Дни дозирования	Путь	Кол-во мышей
1	Основа	н/о	н/о	0,3,7,10	в/б	8
2	PRO1057, низкая доза	0,08 мг	0,04 г.У	0,3,7,10	в/б	8
3	PRO1057, средняя доза	0.4 мг	0,2 г.У	0,3,7,10	в/б	8
4	PRO1057, высокая доза	2 мг	1 г.У	0,3,7,10	в/б	8
5	PRO1137	0,2 мг	1 г.У	0,3,7,10	в/б	8
6	PRO1138	0,2 мг		0,3,7,10	в/б	8
7	PRO1060	0,2 мг	1 г.У	0,3,7,10	в/б	8

Высокая доза (HD) PRO1057, а также дозы 0,2 мг PRO1060 и PRO1137 были установлены для достижения одинаковой относительной активности, моделируемой для дозы авелумаба 0,1 мг (на мыш), на основе активности антител *in vitro* для блокады взаимодействие PD-1/PDL1 в количественном определении с использованием репортерного гена NF-AT. Таким образом, доза 2 мг PRO1057, или 0,2 мг PRO1060, или

0,2 мг PRO1137 может быть представлена как одна относительная единица (1 r.U) по отношению к дозе 0,1 мг авелумаба.

Измерения массы тела и измерения объема опухоли с помощью циркуля проводили два раза в неделю. Животных умерщвляли в определенные временные точки в зависимости от результатов исследования. Все животные, кроме 3, были умерщвлены в одну и ту же временную точку (в день 17 и день 18). Три животных были подвергнуты эвтаназии уже на день 14 из-за начала реакции «ксенотрансплантат против хозяина» (РкТНХ). Сбор образцов и обработка первой половины каждой группы были выполнены в первый день, а сбор образцов и обработка второй половины каждой группы были выполнены на следующий день по причинам вместимости. Животные, объемы опухолей которых повторно растворили с РВМС от двух разных доноров, были в равной степени представлены в двух когортах выборки. Опухоли, селезенки и печени от всех животных собирали в конце исследования и обрабатывали для проточной цитометрии, при которой анализировали следующие человеческие маркеры: живые/фиксированные, CD4, CD8, CD25, FOXP3, TIM3, PD-1 и Гранзим В. Образцы сыворотки крови анализировали на уровне IFNg методом ИФА с использованием системы DuoSet® ELISA Development System от компании R&D Systems в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

Противоопухолевую активность мультиспецифических антител PRO1057 (scDb-scFv к PDL1xCD137xHSA) и PRO1060 (антитела к PDL1xCD137 формата Моррисона), антител к PDL1 (PRO1137) и к CD137 (PRO1138 или урелумаб) в ксенотрансплантатах HCC827 NSCLC человека с использованием иммунодефицитных мышей линии NOG и аллогенных мононуклеарных клеток периферической крови человека (hPBMC) оценивали путем измерения объемов опухолей (Фиг. 24). Объемы опухолей измеряли два раза в неделю до тех пор, пока мышью не умертвили в день 17 или день 18. Объемы опухолей нормализовали к объему опухоли в начале лечения (относительный объем опухоли). Как показано на Фиг. 24, мыши с опухолями HCC827, получавшие моноклональные антитела к CD137 (PRO1138 или урелумаб) или к PDL1 (PRO1137), показали рост опухоли, сходный с контрольной группой основы. Напротив, лечение биспецифическими антителами к PDL1xCD137, такими как scDb-scFv (PRO1057) и IgG-scFv (PRO1060), привело к выраженной стабилизации роста опухоли. Кроме того, лечение биспецифическими молекулами антител к PDL1xCD137 у мышей, объемы опухолей

которых повторно растворили с РВМС от донора В, привело к регрессу опухоли (Фиг. 24В и 24D). То есть лечение биспецифичными молекулами не привело к потере медианной массы тела, а это означает, что молекулы хорошо переносятся при исследованных уровнях дозы, тогда как лечение урелумабом приводит к снижению медианной массы тела через 17 дней после начала лечения (Фиг. 25).

Кроме того, частоты Т-лимфоцитов, а именно регуляторных Т-клеток человека (CD4+, FoxP3+; фиг. 26А) и CD8+ Т-клеток человека, были проанализированы в опухолях на 17 или 18 день лечения (Фиг. 26). Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, исследовали методом проточной цитометрии, и определяли соотношение частоты CD8 + Т-клеток человека и частоты регуляторных Т-клеток человека (Treg) в микроокружении опухоли (TME) (Фиг. 26В).

Лечение только урелумабом приводило к снижению частоты регуляторных Т-клеток в микроокружении опухоли, тогда как лечение антителами к PDL1 (PRO1137) приводило к росту регуляторных Т-клеток (фиг. 26А). Интересно, что блокада PD1/PDL1 и одновременный запуск CD137 (предположительно на одной и той же клетке) в группах лечения PRO1057 и PRO1060 предотвращали рост регуляторных Т-клеток, наблюдаемый в группе лечения антителами к PDL1 (Фиг. 26А).

Кроме того, лечение биспецифическими антителами к PDL1xCD137 (PRO1057 и PRO1060) показало более чем двукратное улучшение в соотношении внутриопухолевых CD8+ Т-клеток человека/Treg человека (CD4+FoxP3+) по сравнению с группами лечения монотерапией или группой контроля основой (Фиг. 26В). Повышенное соотношение CD8+/Treg, наблюдаемое в группах, получавших PRO1057 и PRO1060, указывает на то, что эффективный противоопухолевый ответ был вызван биспецифическими антителами к PDL1xCD137 в микроокружении опухоли. Снижение частоты регуляторных Т-клеток и увеличение внутриопухолевых соотношений Т-клеток CD8+ человека/Treg человека (CD4+FoxP3+) после лечения биспецифическими антителами к PDL1xCD137 указывают на то, что ответ противоопухолевого эффектора/Т-клеток памяти был успешно достигнут.

Кроме того, для оценки процента активированных Т-клеток в микроокружении опухоли была определена частота PD1-положительных клеток CD4+ и CD8+ (фиг. 27). Дозозависимое увеличение PD1-положительных Т-клеток CD8+ и CD4+ наблюдалось для PRO1057 и при высокой дозе достигало уровней PD1-положительных Т-клеток, аналогичных уровням лечения PRO1060 и PRO1037, подтверждая равную дозировку трех соединений с точки зрения активности блокирования PDL1 (Фиг. 27А и В). Два антитела к

CD137 PRO1038 и урелумаб, по-видимому, не влияли на процент PD1-положительных Т-клеток CD4+ или CD8+.

Пример 11: Оценка противоопухолевой эффективности блокады PDL1 и одновременной локализованной стимуляции CD137 у мышей NOG, которым трансплантировали гематопозитические стволовые клетки CD34+, полученные из пуповинной крови человека (HSC UCB)

Противоопухолевую активность мультиспецифического антитела по настоящему изобретению сравнивали с моно- и комбинированной терапией антителами к PDL1 и CD137 в ксенотрансплантатах HCC827 NSCLC человека с использованием мышей линии NOG, которым трансплантировали гематопозитические стволовые клетки CD34+, полученные из пуповинной крови человека (HSC UCB). Влияние PRO1186 (scDb-scFv; SEQ ID NO: 221) на объем опухоли сравнивали с лечением IgG1, содержащими тот же PDL1-специфичный переменный домен, что и мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению (например, PRO1196, SEQ ID NO: 242 и 243), авелумаб, урелумаб. Кроме того, влияние PRO1186 (scDb-scFv; SEQ ID NO: 221) на объем опухоли сравнивали с комбинированным лечением IgG1, содержащими тот же PDL1-специфичный переменный домен, что и мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению (PRO1196, SEQ ID NO: 242 и 243), и IgG4, содержащими тот же CD137-специфичный переменный домен (PRO1138, SEQ ID NO: 244 и 245). Для получения дополнительных доказательств локализованного противоопухолевого иммунного ответа с помощью проточной цитометрии была проанализирована частота противоопухолевых эффекторных лимфоцитов, таких как CD8+, CD4+ и регуляторные Т-клетки. Для изучения модуляции иммунной системы системно после лечения анти-CD137/анти-PDL1 частоту Т-клеток CD4+ и CD8+ в печени и селезенке анализировали с помощью проточной цитометрии. Кроме того, системные уровни IFN γ были проанализированы с использованием количественного метода ИФА.

Популяция исследования и схема лечения

Самкам мышей линии NOG, которым имплантировали гематопозитические стволовые клетки CD34+, полученные из пуповинной крови человека (UCB HSC), подкожно вводили клетки HCC827 NSCLC. Мыши получали односторонние инъекции 5×10^6 клеток HCC827. Клетки вводили в смесь 50% клеточной суспензии в фосфатном буфере и 50% матригеля в общем объеме инъекции 100 мкл. После введения опухолевых

клеток мышам линии NOG и успешного приживления опухоли (медианный объем опухоли в группе 80-100 мм³) мышей (n = 10) рандомизировали в группы лечения:

Ид. № группы	Соединение	Общая суточная доза [мг]	Дни дозирования	Путь	Кол-во мышей
1	Основа (паливизумаб)	0,1 мг	0,5,10,15, 20	в/б	10
2	IgG1 к PDL1 (PRO1196)	0,1 мг	0,5,10,15, 20	в/б	10
3	авелумаб	0,1 мг	0,5,10,15, 20	в/б	10
4	урелумаб	0,1 мг	0,5,10,15, 20	в/б	10
5	PRO1186, низкая доза	0,02 мг	0,5,10,15, 20	в/б	10
6	PRO1186, средняя доза	0,1 мг	0,5,10,15, 20	в/б	10
7	PRO1186, высокая доза	0,5 мг	0,5,10,15, 20	в/б	10
8	Комбинация IgG1 к PDL1 (PRO1196) и IgG4 к CD137 (PRO1138)	0,1 мг каждый	0,5,10,15, 20	в/б	10

Измерения массы тела и измерения объема опухоли с помощью циркуля проводили два раза в неделю. Опухоли собирали в конце исследования и оценивали на инфильтрацию Т-клеток человека методом проточной цитометрии. Опухоли, селезенки и печени от всех животных собирали в конце исследования и обрабатывали для проточной цитометрии, при которой анализировали следующие человеческие маркеры: живые/фиксированные, CD4, CD8, CD25, FOXP3, TIM3, PD-1 и Гранзим В. Образцы сыворотки крови анализировали на уровне IFN γ методом ИФА с использованием системы DuoSet® ELISA Development System от компании R&D Systems в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

Противоопухолевую активность мультиспецифических антител PRO1186 (scDb-scFv к PDL1xCD137xHSA), антител к PDL1 (PRO1196 или авелумаб) и CD137 (урелумаб) в ксенотрансплантатах HCC827 NSCLC человека с использованием иммунодефицитных мышей линии NOG с имплантированными гематопозитическими стволовыми клетками CD34+, полученными из пуповинной крови человека (UCB HSC), оценивали путем измерения объемов опухоли (Фиг. 28 и 29). Объемы опухолей измеряли два раза в неделю

до тех пор, пока мышей не умертвили в день 25, 29 и 30. Объемы опухолей нормализовали к объему опухоли в начале лечения (относительный объем опухоли). Как показано на фиг. 28 и 29, лечение триспецифическими антителами к PDL1xCD137xHSA, такими как scDb-scFv (PRO1186) и комбинацией антител к PDL1 (PRO1196) и CD137 (PRO1138) привело к выраженной стабилизации роста опухоли. То есть лечение триспецифическими молекулами (PRO1186) не приводило к снижению медианной массы тела, а это означает, что молекулы хорошо переносятся при исследованных уровнях дозы, тогда как лечение комбинацией антител к PDL1 (PRO1196) и CD137 (PRO1138) приводит к увеличению количества животных со снижением массы тела более чем на 10% или 15%, соответственно, через 24 дня после начала лечения (Фиг. 30). Терапия антителами к PDL1xCD137xHSA (PRO1186) приводила к более сильному снижению роста опухоли, чем терапия IgG к PDL1 (PRO1196) или IgG к CD137 (урелумаб). Терапия антителами к PDL1xCD137xHSA (PRO1186) приводила к более высоким показателям ответа (30% против 20%) и, как правило, переносилась лучше, чем комбинированная терапия антителами к PDL1 и CD137. Это коррелирует с более высокой частотой цитотоксических Т-клеток (CD8+ и CD8+, GrB+) и повышенным соотношением CD8+/CD4+ и CD8+, GrB+/Treg в опухоли (Фиг. 31 и 32). Частоты Т-лимфоцитов, а именно цитотоксических Т-клеток (CD8+, GrB+), Т-клеток CD4+ и регуляторных Т-клеток (Фиг. 31 и 32), анализировали в опухолях в день 24, день 29 и день 30 лечения.

Кроме того, был проведен фармакокинетический анализ для количественного определения антител к PDL1xCD137xHSA (PRO1186) в образцах сыворотки животных в исследовании ксенотрансплантата HCC827 с использованием мышей NOG с замещением стволовыми клетками CD34+ человека (Фиг. 33, Таблица 20). Планшеты для ИФА покрывали накануне вечером CD137 и добавляли серийные разведения антитела к PDL1xCD137xHSA (PRO1186) для получения калибровочной кривой. Связанное антитело к PDL1xCD137xHSA (PRO1186) выявляли биотинилированным PDL1 человека, за которым следовал стрептавидин-полипероксидаза хрена. Концентрации PRO1186 в разведенных образцах сыворотки интерполировали по калибровочной кривой. Фармакокинетические параметры оценивали с помощью программы-надстройки PK solver с использованием некомпартментального подхода. Периоды полужизни 41,7 часа, 36,8 часа и 38,4 часа определяли путем анализа первой фазы элиминации после дозирования для групп PRO1186-HD (0,5 мг), PRO1186-MD (0,1 мг) и PRO1186-LD (0,02 мг) соответственно.

ТАБЛИЦА 20

Фармакокинетический анализ антител к PDL1xCD137xHSA (PRO1186) в образцах сыворотки животных в исследовании ксенотрансплантата HCC827 с использованием мышей NOG с замещением стволовыми клетками CD34+ человека

Молекула	Доза / мышь / случай [мг]	Путь	T _{1/2} [ч]	AUC _{0-5д} [мг/мл*ч]	Отношение AUC высокая/низкая доза
PRO1186	0,5	в/б	41,6	16'978'964	
	0,1	в/б	36,8	2'475'621	6,9
	0,02	в/б	38,4	331'269	7,5

Пример 12: Оценка противоопухолевой эффективности блокады PDL1 и сопутствующей локализованной стимуляции CD137 на модели сингенного рака толстой кишки MC38

Кроме того, противоопухолевая активность мультиспецифического антитела по настоящему изобретению будет проверена на модели карциномы ободочной кишки MC38 у сингенных мышей C57BL/6 с интактной иммунной системой. Эта модель использовалась другими для демонстрации повышенной противоопухолевой активности в результате комбинированного лечения агонистами CD137 и антагонистами PD-1/PDL1 (Chen S et al. Combination of 4-1BB agonist and PD-1 antagonist promotes antitumor effector/memory CD8 T cells in a poorly immunogenic tumor model. *Cancer Immunol Res* 2014;3(2):149-160 and Rodriguez-Ruiz ME et al. Abscopal effects of radiotherapy are enhanced by combined immunostimulatory mAbs and are dependent on CD8 T cells and crosspriming. *Cancer Res* 2016;76(20):5994-6005).

Поскольку и домен анти-CD137, и домен анти-PDL1 мультиспецифического антитела по настоящему изобретению не является перекрестным по отношению к мышинному PDL1, будет использована рекомбинантная модель с нокином CD137 человека, созданная компанией CrownBio. В этой модели внеклеточный и трансмембранный домен мышинного CD137 был заменен соответствующей последовательностью CD137 человека с сопутствующим мышинным C57BL/6 с использованием системы CRISPR/Cas9. Кроме того, будет использована модифицированная линия опухолевых клеток MC38, экспрессирующая PDL1 человека под контролем промотора CMV вместо мышинного PDL1. Влияние мультиспецифического антитела по настоящему изобретению на объем

опухоли будут сравнивать с комбинированным лечением гуманизированным IgG1, содержащим тот же PDL1-специфичный переменный домен, что и ND021, и с лечением гуманизированным IgG4 с таким же CD137-специфичным переменным доменом. Для получения дополнительных доказательств локализованного противоопухолевого иммунного ответа методом проточной цитометрии будет проанализирована частота противоопухолевых эффекторных лимфоцитов, таких как CD8⁺, CD4⁺ и регуляторные Т-клетки. Для изучения модуляции иммунной системы системно после лечения анти-CD137/анти-PDL1 частота Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ в печени и селезенке будет проанализирована методом проточной цитометрии и, возможно, с помощью иммуногистохимического исследования. Кроме того, системные уровни IFN γ могут быть проанализированы с использованием количественного метода ИФА. Чтобы дополнительно охарактеризовать профиль безопасности комбинированной терапии антителами к CD137/PDL1, могут быть оценены клинико-лабораторные показатели, связанные в первую очередь с токсичностью для печени (наблюдаемые при терапии антителами к CD137 в клинике), такие как повышенные уровни аланинаминотрансферазы, глутаматдегидрогеназы и аспартатаминотрансферазы.

Пример 13: Типичные мультиспецифичные антитела по настоящему изобретению

Общее описание scDb

Одноцепочечные диатела (scDb) представляют собой небольшие фрагменты двухвалентных антител, состоящие из одной цепи, включающей два домена VH и два домена VL от двух разных антител (Holliger et al. PNAS, 1993 Jul 15;90(14):6444-8). В формате scDb компании Numab переменные домены связаны в ориентации VLA-VHB-VLB-VHA GS-линкерами. Линкеры в этих одноцепочечных диателах (scDbs) вызывают правильную сборку доменов и улучшают стабильность без изменения антигенсвязывающей активности. Короткие линкеры G₄S, соединяющие VLA с VHB и VLB с VHA, значительно короче, чем те, которые необходимы для сборки смежных доменов и поддержания доменов в открытой конформации, обеспечивающей возможность правильного парного связывания соответствующих доменов. Плечи диател VLA-VHB и VLB-VHA связаны длинным (G₄S)₄-линкером между доменами VHB и VLB, что обеспечивает возможность димеризации в ориентации «голова-хвост» с образованием компактной биспецифической молекулы с молекулярной массой ~ 50 кДа. ScDb может быть экспрессирован рекомбинантно в клетках-хозяевах E. coli или CHO-S. См. Фиг. 22А.

PRO885

PRO885 представляет собой молекулу scDb, содержащую внешний (VLA/VHA) PDL1-связывающий домен (33-03-G02 sc01) и внутренний (VHB/VLB) CD137-специфичный домен (38-02-A04 sc01), соединенные двумя короткими фланкирующими линкеры G₄S-линкерами и длинным центральным (G₄S)₄-линкером. Оба домена состоят из CDR кролика, которые были трансплантированы на каркас акцептора VH4 человека.

PRO951

PRO951 представляет собой молекулу scDb, содержащую внешний (VLA/VHA) PDL1-связывающий домен (33-03-G02 sc02) и внутренний (VHB/VLB) CD137-специфичный домен (38-27-C05 sc02), соединенные двумя короткими фланкирующими линкеры G₄S-линкерами и длинным центральным (G₄S)₄-линкером. Оба домена состоят из CDR кролика, которые были трансплантированы на консенсусный каркасы акцепторов. PDR1-специфичные CDR были имплантированы на консенсусный каркас акцептора VH4 человека, а CD137-специфичные CDR были имплантированы на каркас акцептора VH3 человека.

PRO1123

PRO1123 представляет собой молекулу scDb, содержащую внешний (VLA/VHA) PDL1-связывающий домен (33-03-G02 sc01) и внутренний (VHB/VLB) CD137-специфичный домен (38-02-A04 sc05), соединенные двумя короткими фланкирующими линкеры G₄S-линкерами и длинным центральным (G₄S)₄-линкером. Оба домена состоят из CDR кролика, которые были трансплантированы на консенсусный каркас акцептора VH4 человека. Кроме того, домен CD137 содержит несколько остатков кролика, участвующих в формировании интерфейса VL-VH.

PRO1124

PRO1124 представляет собой молекулу scDb, содержащую внешний (VLA/VHA) PDL1-связывающий домен (33-03-G02 sc01) и внутренний (VHB/VLB) CD137-специфичный домен (38-02-A04 sc06), соединенные двумя короткими фланкирующими линкеры G₄S-линкерами и длинным центральным (G₄S)₄-линкером. Оба домена состоят из CDR кролика, которые были трансплантированы на консенсусный каркас акцептора VH4

человека. Кроме того, домен CD137 содержит несколько остатков кролика, участвующих в формировании интерфейса VL-VH и потенциально взаимодействующие с антигеном.

PRO1125

PRO1125 представляет собой молекулу scDb, содержащую внешний (VLA/VHA) PDL1-связывающий домен (33-03-G02 sc02) и внутренний (VHB/VLB) CD137-специфичный домен (38-02-A04 sc01), соединенные двумя короткими фланкирующими линкеры G₄S-линкерами и длинным центральным (G₄S)₄-линкером. Оба домена состоят из CDR кролика, которые были трансплантированы на консенсусный каркас акцептора VH4 человека. Кроме того, домен PDL1 содержит несколько остатков кролика, участвующих в формировании интерфейса VL-VH.

PRO1126

PRO1126 представляет собой молекулу scDb, содержащую внешний (VLA/VHA) PDL1-связывающий домен (33-03-G02 sc03) и внутренний (VHB/VLB) CD137-специфичный домен (38-02-A04 sc01), соединенные двумя короткими фланкирующими линкеры G₄S-линкерами и длинным центральным (G₄S)₄-линкером. Оба домена состоят из CDR кролика, которые были трансплантированы на консенсусный каркас акцептора VH4 человека. Кроме того, домен PDL1 содержит мутировавшие к первоначальному виду остатки кролика, участвующих в формировании интерфейса VL-VH и потенциально взаимодействующие с антигеном.

PRO1134

PRO1134 представляет собой молекулу scDb, содержащую внешний (VLA/VHA) PDL1-связывающий домен (33-03-G02 sc07) и внутренний (VHB/VLB) CD137-специфичный домен (38-02-A04 sc01), соединенные двумя короткими фланкирующими линкеры G₄S-линкерами и длинным центральным (G₄S)₄-линкером. Оба домена состоят из CDR кролика, которые были трансплантированы на консенсусный каркас акцептора VH4 человека. Кроме того, домен PDL1 содержит остатки генеративной линии кролика, участвующих в формировании интерфейса VL-VH и потенциально взаимодействующие с антигеном.

Общее описание scDb-scFv

ScDb-scFv) - это формат, разработанный в компании Numab, который добавляет третью пару одноцепочечных переменных доменов (VLC/VHC), соединенных через линкер $(G_4S)_2$, с высокостабильным форматом одноцепочечного диатела (scDb), как описано выше (ориентация доменов VLA-VHB-VLB-VHA с короткими основными линкерами G_4S и длинным центральным линкером $(G_4S)_4$). Таким образом, формат scDb-scFv состоит из тандемного расположения scDb с частицей scFv на одной цепочке белка и молекулярной массой ~80 кДа. Фрагмент антитела scDb-scFv можно экспрессировать рекомбинантно в клетках млекопитающих. См. Фиг. 22В.

PRO963

PRO963 представляет собой молекулу scDb-scFv, состоящую из ядра scDb анти-PDL1 (33-03-G02 sc01, VLA/VHA) и анти-CD137 (38-02-A04 sc01, VHB/VLB), слитого на C-конце с частицей scFv к HSA (19-01-H04-sc03, VLC/VHC). Специфичные для PDL1 и CD137 домены представляют собой консенсусные каркасы акцептора VH4 человека с трансплантированными CDR кролика, в то время как домен HSA состоит из CDR кролика, трансплантированных в каркас акцептора на основе VH3 человека, содержащий дополнительные остатки кролика, поддерживающие сохранение характеристик связывания родительского IgG кролика.

PRO966 (PRO1052)

PRO966 представляет собой молекулу scDb-scFv, состоящую из ядра scDb анти-PDL1 (33-03-G02 sc01, VLA/VHA) и анти-CD137 (38-27-C05 sc01, VHB/VLB), слитого на C-конце с частицей scFv к HSA (19-01-H04-sc03, VLC/VHC). Специфичные для PDL1 и CD137 домены представляют собой консенсусные каркасы акцептора VH4 человека с трансплантированными CDR кролика, в то время как домен HSA состоит из CDR кролика, трансплантированных в каркас акцептора на основе VH3 человека, содержащий дополнительные остатки кролика, поддерживающие сохранение характеристик связывания родительского IgG кролика.

PRO1057

PRO1057 представляет собой молекулу scDb-scFv, состоящую из ядра scDb анти-PDL1 (33-03-G02 sc01, VLA/VHA) и анти-CD137 (38-02-A04 sc01, VHB/VLB), слитого на C-конце с частицей scFv к HSA (23-13-A01-sc03, VLC/VHC). Специфичные для PDL1 и CD137 домены представляют собой консенсусные каркасы акцептора VH4 человека с трансплантированными CDR кролика, в то время как домен HSA состоит из CDR кролика,

трансплантированных в каркас акцептора на основе VH3 человека, содержащий дополнительные остатки кролика, поддерживающие сохранение характеристик связывания родительского IgG кролика, включая перекрестную реактивность на мышинный сывороточный альбумин.

PRO1058

PRO1058 представляет собой молекулу scDb-scFv, состоящую из ядра scDb анти-PDL1 (33-03-G02 sc01, VLA/VHA) и анти-CD137 (38-27-C05 sc01, VHB/VLB), слитого на C-конце с частицей scFv к HSA (23-13-A01-sc03, VLC/VHC). Специфичные для PDL1 и CD137 домены представляют собой консенсусные каркасы акцептора VH4 человека с трансплантированными CDR кролика, в то время как домен HSA состоит из CDR кролика, трансплантированных в каркас акцептора на основе VH3 человека, содержащий дополнительные остатки кролика, поддерживающие сохранение характеристик связывания родительского IgG кролика, включая перекрестную реактивность на мышинный сывороточный альбумин.

PRO1186

PRO1186 представляет собой молекулу scDb-scFv, состоящую из ядра scDb анти-PDL1 (37-20-B03 sc01, VLA/VHA) и анти-CD137 (38-02-A04 sc01, VHB/VLB), слитого на C-конце с частицей scFv к HSA (23-13-A01-sc03, VLC/VHC). Специфичные для PDL1 и CD137 домены представляют собой консенсусные каркасы акцептора VH4 человека с трансплантированными CDR кролика, в то время как домен HSA состоит из CDR кролика, трансплантированных в каркас акцептора на основе VH3 человека, содержащий дополнительные остатки кролика, поддерживающие сохранение характеристик связывания родительского IgG кролика, включая перекрестную реактивность на мышинный сывороточный альбумин.

PRO1430

PRO1430 представляет собой молекулу scDb-scFv, состоящую из ядра scDb анти-PDL1 (37-20-B03 sc01, VLA/VHA) и анти-CD137 (38-02-A04 sc13, VHB/VLB), слитого на C-конце с частицей scFv к HSA (19-01-H04-sc03, VLC/VHC). Специфичный домен PDL1 представляет собой консенсусный каркас акцептора VH4 человека с трансплантированными CDR кролика, в то время как домены CD137 и HSA состоят из CDR кролика, трансплантированных на каркасы акцептора на основе VH3 человека. Домен HSA содержит дополнительные каркасные остатки кролика, поддерживающие

сохранение характеристик связывания родительского IgG кролика, а специфичный домен CD137 содержит стабилизирующую междоменную дисульфидную связь VL/VH.

PRO1479

PRO1479 представляет собой молекулу scDb-scFv, состоящую из ядра scDb анти-PDL1 (37-20-B03 sc09.1, VLA/VHA) и анти-CD137 (38-02-A04 sc13, VHB/VLB), слитого на C-конце с частицей scFv к HSA (19-01-H04-sc03, VLC/VHC). Все домены представляют собой консенсусные каркасы акцептора VH3 человека с трансплантированными CDR кролика. Специфичные домены PDL1 и HSA содержат дополнительные каркасные остатки кролика, поддерживающие сохранение характеристик связывания родительского IgG кролика, а специфичный домен CD137 содержит стабилизирующую междоменную дисульфидную связь VL/VH.

PRO1482

PRO1482 представляет собой молекулу scDb-scFv, состоящую из ядра scDb анти-CD137 (38-02-A04-sc13) и анти-PDL1 (37-20-B03 sc03, VHB/VLB), слитого на C-конце с частицей scFv к HSA (19-01-H04-sc03, VLC/VHC). Специфичный домен PDL1 представляет собой консенсусный каркас акцептора VH4 человека с трансплантированными CDR кролика, в то время как специфичные домены CD137 и HSA состоят из CDR кролика, трансплантированных на каркасы акцептора на основе VH3 человека. Все домены содержат дополнительные каркасные остатки кролика, поддерживающие сохранение характеристик связывания родительского IgG кролика.

PRO1431

PRO1431 представляет собой молекулу scDb-scFv, состоящую из ядра scDb анти-PDL1 (33-03-G02 sc18, VLA/VHA) и анти-CD137 (38-02-A04 sc13, VHB/VLB), слитого на C-конце с частицей scFv к HSA (19-01-H04-sc03, VLC/VHC). Специфичный домен PDL1 представляет собой консенсусный каркас акцептора VH4 человека с трансплантированными CDR кролика, в то время как специфичные домены CD137 и HSA состоят из CDR кролика, трансплантированных на каркасы акцептора на основе VH3 человека. Домен HSA содержит дополнительные каркасные остатки кролика, поддерживающие сохранение характеристик связывания родительского IgG кролика, а специфичный домен CD137 содержит стабилизирующую междоменную дисульфидную связь VL/VH.

PRO1473

PRO1473 представляет собой молекулу scDb-scFv, состоящую из ядра scDb анти-PDL1 (33-03-G02 sc03, VLA/VHA) и анти-CD137 (38-02-A04 sc13, VHB/VLB), слитого на C-конце с частицей scFv к HSA (19-01-H04-sc03, VLC/VHC). Специфичный домен PDL1 представляет собой консенсусный каркас акцептора VH4 человека с трансплантированными CDR кролика, в то время как специфичные домены CD137 и HSA состоят из CDR кролика, трансплантированных на каркасы акцептора на основе VH3 человека. Специфичные домены PDL1 и HSA содержат дополнительные каркасные остатки кролика, поддерживающие сохранение характеристик связывания родительского IgG кролика, а домен CD137 содержит стабилизирующую междоменную дисульфидную связь VL/VH.

PRO1476

PRO1476 представляет собой молекулу scDb-scFv, состоящую из ядра scDb анти-CD137 (38-02-A04-sc13) и анти-PDL1 (33-03-G02 sc03, VHB/VLB), слитого на C-конце с частицей scFv к HSA (19-01-H04-sc03, VLC/VHC). Специфичный домен PDL1 представляет собой консенсусный каркас акцептора VH4 человека с трансплантированными CDR кролика, в то время как специфичные домены CD137 и HSA состоят из CDR кролика, трансплантированных на каркасы акцептора на основе VH3 человека. Специфичные домены PDL1 и HSA содержат дополнительные каркасные остатки кролика, поддерживающие сохранение характеристик связывания родительского IgG кролика, а специфичный домен CD137 содержит стабилизирующую междоменную дисульфидную связь VL/VH.

PRO1432

PRO1432 представляет собой молекулу scDb-scFv, состоящую из ядра scDb анти-CD137 (38-02-A04-sc13) и анти-PDL1 (33-03-G02 sc18, VHB/VLB), слитого на C-конце с частицей scFv к HSA (19-01-H04-sc03, VLC/VHC). Специфичный домен PDL1 представляет собой консенсусный каркас акцептора VH4 человека с трансплантированными CDR кролика, в то время как специфичные домены CD137 и HSA состоят из CDR кролика, трансплантированных на каркасы акцептора на основе VH3 человека. Специфичные домены PDL1 и HSA содержат дополнительные каркасные остатки кролика, поддерживающие сохранение характеристик связывания родительского IgG кролика, а специфичный домен CD137 содержит стабилизирующую междоменную дисульфидную связь VL/VH.

PRO1480

PRO1480 представляет собой молекулу scDb-scFv, состоящую из ядра scDb анти-PDL1 (37-20-B03 sc09.1, VLA/VHA) и анти-CD137 (38-27-A11sc02, VHB/VLB), слитого на С-конце с частицей scFv к HSA (19-01-H04-sc03, VLC/VHC). Все домены представляют собой консенсусные каркасы акцептора VH3 человека с трансплантированными CDR кролика. PDL1- и HSA-специфичные домены содержат дополнительные каркасные остатки кролика, поддерживающие сохранение характеристик связывания родительского IgG кролика.

PRO1481

PRO1481 представляет собой молекулу scDb-scFv, состоящую из ядра scDb анти-PDL1 (37-20-B03 sc09.1, VLA/VHA) и анти-CD137 (38-27-A11sc03, VHB/VLB), слитого на С-конце с частицей scFv к HSA (19-01-H04-sc03, VLC/VHC). Все домены представляют собой консенсусные каркасы акцептора VH3 человека с трансплантированными CDR кролика. PDL1-, CD137- и HSA-специфичные домены содержат дополнительные каркасные остатки кролика, поддерживающие сохранение характеристик связывания родительского IgG кролика.

PRO1480 c DiS

PRO1480 c DiS представляет собой молекулу scDb-scFv, состоящую из ядра scDb анти-PDL1 (37-20-B03 sc09.1, VLA/VHA) и анти-CD137 (38-27-A11sc07, VHB/VLB), слитого на С-конце с частицей scFv к HSA (19-01-H04-sc03, VLC/VHC). Все домены представляют собой консенсусные каркасы акцептора VH3 человека с трансплантированными CDR кролика. Специфичные домены PDL1 и HSA содержат дополнительные каркасные остатки кролика, поддерживающие сохранение характеристик связывания родительского IgG кролика, а специфичный домен CD137 содержит стабилизирующую междоменную дисульфидную связь VL/VH.

Общее описание IgG-scFv

Молекулы IgG-scFv представляют собой биспецифичные антитела, состоящие из фрагментов scFv, слитых с моноспецифичным IgG (Coloma M.J., Morrison S.L. Nat. Biotechnol. 1997;15:159–163.). Либо амино- или карбокси-конец каждой легкой или тяжелой цепи может быть присоединен к доменам scFv даже разной специфичности, что приводит к разнообразному репертуару типов IgG-scFv-биспецифичных антител. Молекулы, полученные в компании Numab, имеют тип IgG (H)-scFv или IgG(L)-scFv, два

scFv с одинаковой специфичностью, связанные с С-концом тяжелой цепи (HC) или легкой цепи (LC) полноразмерного IgG, содержащий заглушенную Fc-часть и (G₄S)₂-линкер, соединяющий IgG-часть с scFv-частью. Общая молекулярная масса обоих типов составляет ~200 кДа, и молекулы могут экспрессироваться рекомбинантно в клетках млекопитающих. См. Фиг. 22C и 22D.

PRO1059 (IgG(L)-scFv)

Заглушенный hIgG1 к PDL1 (33-03-G02-sc01) с доменом scFv к CD137 (38-02-A04 sc01), слитым с С-концом LC. Линкер (G₄S)₂ соединяет часть IgG с частью scFv, которая сама состоит из домена VL, соединенного через линкер (G₄S)₄ с соответствующим доменом VH.

PRO1060 (IgG(H)-scFv)

Заглушенный hIgG1 к PDL1 (33-03-G02-sc01) с доменом scFv к CD137 (38-02-A04 sc01), слитым с С-концом HC. Линкер (G₄S)₂ соединяет часть IgG с частью scFv, которая сама состоит из домена VL, соединенного через линкер (G₄S)₄ с соответствующим доменом VH.

PRO1061 (IgG(L)-scFv)

Заглушенный hIgG1 к PDL1 (33-03-G02-sc01) с доменом scFv к CD137 (38-27-C05 sc01), слитым с С-концом LC. Линкер (G₄S)₂ соединяет часть IgG с частью scFv, которая сама состоит из домена VL, соединенного через линкер (G₄S)₄ с соответствующим доменом VH.

PRO1062 (IgG(H)-scFv)

Заглушенный hIgG1 к PDL1 (33-03-G02-sc01) с доменом scFv к CD137 (38-27-C05 sc01), слитым с С-концом HC. Линкер (G₄S)₂ соединяет часть IgG с частью scFv, которая сама состоит из домена VL, соединенного через линкер (G₄S)₄ с соответствующим доменом VH.

Пример 14: Биофизическая характеристика

Биофизическая характеристика выбранных доменов

Выбранные домены получали в большем масштабе (объем экспрессии 0,2 л-1,2 л) и после очистки концентрировали до >10 мг/мл с использованием пробирок для центрифугирования (Таблица 21).

Проводили исследования стабильности scFv, такие как четырехнедельное исследование стабильности, в котором scFv получали в водном буфере (50 мМ фосфатно-цитратный буфер с 150 мМ NaCl при pH 6,4) при 10 мг/мл и хранили при температуре < -80°C, 4°C и 40°C в течение четырех недель. Как минимум, фракцию мономеров и олигомеров в лекарственной форме оценивали путем интеграции площадей пиков эксклюзионной ВЭЖХ через одну неделю, две недели и в конце каждого исследования. Для некоторых молекул были записаны дополнительные временные точки. В Таблице 22 представлено сравнение измерений в день 7 и в конечной точке, полученные в день 28 исследования.

Кроме того, совместимость молекул scFv оценивали в отношении циклов замораживания-оттаивания (З/О) (коллоидная стабильность). Для оценки стабильности З/О были использованы те же аналитические методы и параметры (% содержания мономера и % потери содержания мономера), что и в исследовании стабильности при хранении (эксклюзионная ВЭЖХ (SE-HPLC), электрофорез белков в полиакриламидном геле (SDS-PAGE)), для контроля качества молекул в течение пяти циклов З/О. В Таблице 23 показано изменение содержания мономеров в % за пять повторных циклов З/О. Ни одна из молекул не потеряла >4% мономерного содержания после повторных циклов З/О.

Термическое разворачивание молекул оценивали с использованием флуоресцентного красителя SYPRO orange. Были подготовлены образцы с использованием соответствующих вспомогательных веществ и проведен анализ на аппарате количественной ПЦР. Флуоресцентное излучение определяли с помощью специальной программы калибровки красителя. Планшет для ПЦР, содержащий исследуемые образцы, выдерживали при изменении температуры от 25 до 96°C с шагом 1°C. Середину перехода для термического разворачивания (T_m) рассчитывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism при помощи математического метода второй производной для расчета точки перегиба кривой. Сообщенный T_m представляет собой среднее значение трех измерений. В Таблице 24 приведены температуры плавления молекул, полученных в универсальном буфере (фосфатно-цитратный буфер при pH 6,4, 150 мМ NaCl).

Выбранные молекулы были подвергнуты исследованию стабильности при кратковременном снижении показателя pH, в котором молекулы scFv были получены в концентрации 1 мг/мл в наборе водных (фосфатно-цитратных) буферных систем со значениями pH между 3,5 и 7,5. Содержание мономеров в % и % потери мономеров

анализировали после хранения в течение 2 недель при температуре 40 °С в соответствующих буферных системах (данные не показаны). Сводная данные по мономерному содержанию, мономерной потере, концентрации и снижению концентрации в ходе исследования показана в Таблице 25.

Биофизическая характеристика мультиспецифических антител

Выбранные мультиспецифические молекулы были подвергнуты исследованиям стабильности, таким как четырехнедельное исследование стабильности, в котором мультиспецифические молекулы были получены в следующем буфере: 25 мМ фосфатно-цитратный буфер с 150 мМ NaCl, 1 М сахарозы при pH 5,5 в концентрации 10 мг/мл, с последующим хранением при температуре < -20°C, 4°C, 20°C и 40°C в течение четырех недель. Как минимум, долю мономеров и олигомеров в составе оценивали через один день, 4 дня, одну неделю и каждую неделю в течение 12 недель с использованием эксклюзионной ВЭЖХ. Результаты приведены в Таблице 26.

Таблица 21 Изготовление доменов для исследования стабильности

Идентификационный номер клона	Идентификационный номер белка	Стратегия трансплантации	Объем экспрессии [мл]	Экспрессирующая система	Количество белка после protein L [мг]	Выход после protein L [мг/л]	ГПХ Да/Нет?	Конечный выход [мг]	Выход на л экспрессии [мг/л]	Чистота (экслюзивная ВЭЖХ) [% мономеров]	Содержание мономеров при концентрации 10 мг/мл [%]	Потеря мономеров при достижении концентрации 10 мг/мл
38-02-A04-sc05	PRO1181	IF	1200	BL21	9,3	7,8	Да	4,7	3,9	88	77,8	10,2
38-02-A04-sc06	PRO1182	ПОЛНЫЙ	1200	BL21	19,8	16,5	Да	5,6	4,7	95	72,9	22,1
38-02-A04-sc09	PRO1348	CDR	200	CHO	16,6	83,1	Нет	8	39,8	97	94,3	2,7
38-02-A04-sc13	PRO1352	CDR с diS	200	CHO	12,2	61	Да	3,9	19,3	99,1	99,0	0,1
38-27-A11 sc02	PRO1359	CDR	200	CHO	13,7	68,5	Да	6,8	34,2	99	99,0	0,0
38-27-A11 sc03	PRO1360	ПОЛНЫЙ	200	CHO	12,9	64,7	Да	6,2	30,8	99,1	98,7	0,4

Идентификационный номер клона	Идентификационный номер белка	Каркас	Объем экспрессии [мл]	Выход после Capto L [мг]	Выход после захвата [мг/л]	Очистка методом ГПХ?	Конечный выход [мг]	Конечный выход на л экспрессии [мг/л]	Чистота (экслюзивная ВЭЖХ) [% мономеров]	Tm [°C]	Содержание мономеров при концентрации 10 мг/мл [% мономеров]	Потеря содержания мономеров при достижении указанной концентрации [%]
33-03-G02-sc01	PRO830*	VH4	300	2,0	6,7	НЕТ	2,0	6,7	99,0	80,0	98,3	-0,7
33-03-G02-sc03	PRO1183*	VH4	1200	16,9	14,1	ДА	4,0	3,3	100,0	Н/о	99,7	-0,3
33-03-G02-sc18	PRO1392	VH4	200	9,3	46,7	НЕТ	7,4	37,2	97,0	72,4	97,4	0,4
37-20-B03-sc01	PRO908*	VH4	1200	18,6	15,5	ДА	5,3	4,4	89,0	Н/о	75,4	-15,3
37-20-B03-sc09	PRO1347	VH3	200	8,0	38,9	ДА	2,3	11,5	98,1	74,8	98,5	0,4

*бактериальная экспрессия

Таблица 22А Четырехнедельное исследование стабильности доменов scFv к CD137

Идентификационный номер клона	Идентификационный номер белка	Темп. [°C]	Начальное содержание мономеров [%]	содержание мономеров [%]			уменьшение содержания мономеров [%]		концентрация белка [мг/мл]			уменьшение содержания белка [%]	
				d0	d7	d28	d7	d28	d0	d7	d28	d7	d28
38-02-A04-sc05	PRO1181	-80		N/o	N/o	N/o	N/o	N/o	N/o	N/o	N/o	N/o	N/o
		4	77,8	N/o	N/o	N/o	N/o	N/o	N/o	N/o	N/o	N/o	N/o
		40		77,8	78,2	77,8	-0,5	0,1	10,4	10,4	9,6	0,2	7,7
38-02-A04-sc06	PRO1182	-80		72,9	72,8	72,9	0,1	0,0	20,6	21,0	24,8	-2,0	-20,5
		4	72,9	72,9	72,8	73,5	0,1	-0,8	20,6	20,7	19,9	-0,7	3,3
		40		72,9	72,8	72,1	0,1	1,1	20,6	20,5	20,7	0,3	-0,6
38-02-A04-sc09	PRO1348	-80		94,3	93,2	91,2	1,1	3,3	10,0	11,0	11,2	-10,3	-11,8
		4	94,3	94,3	84,6	83,4	10,3	11,5	10,0	11,2	11,3	-12,1	-13,2
		40		94,3	85,7	84,5	9,1	10,4	10,0	11,5	12,0	-15,2	-20,5
38-02-A04-sc13	PRO1352	-80		99,0	99,1	99,1	0,0	-0,1	11,4	11,8	11,7	-3,6	-2,7
		4	99,0	99,0	99,1	99,1	-0,1	-0,1	11,4	11,9	11,8	-4,3	-3,7
		40		99,0	99,1	99,0	-0,1	0,0	11,4	12,5	12,9	-9,3	-13,2
38-27-A11 sc02	PRO1359	-80	99,0	99,0	98,8	98,8	0,2	0,2	10,5	11,2	11,6	-7,0	-11,0
		4		99,0	98,8	97,9	0,2	1,2	10,5	11,2	11,1	-6,6	-5,5
		40		99,0	80,1	79,1	19,1	20,1	10,5	10,8	11,1	-3,2	-6,3
38-27-A11 sc03	PRO1360	-80	98,7	98,7	98,6	97,4	0,1	1,3	10,9	9,7	10,3	11,1	5,6
		4		98,7	97,7	93,1	1,0	5,7	10,9	10,6	9,3	2,8	14,6
		40		98,7	79,0	77,4	20,0	21,6	10,9	12,0	11,2	-9,9	-2,7

Таблица 22В Четырехнедельное исследование стабильности доменов scFv к PDL1

Идентификационный номер клона	Идентификационный номер белка	Темп. [°C]	Содержание мономеров [%]			Уменьшение содержания мономеров [%]		концентрация белка [мг/мл]			Уменьшение содержания белка [%]	
			d0	d7	d28	d7	d28	d0	d7	d28	d7	d28
33-03-G02-sc01	PRO830	-80	98,3	98,5	98,4	-0,2	-0,1	10,5	12,0	11,4	-14,2	-9,2
		4	98,3	97,9	96,8	0,4	1,6	10,5	12,4	12,0	-18,6	-14,5
		40	98,3	93,3	84,9	5,0	13,6	10,5	10,4	11,6	0,6	-10,6
33-03-G02-sc03	PRO1183	-80	99,7	H/o	99,4	H/o	0,3	20,6	20,8	21,1	H/o	-2,6
		4	99,7	H/o	87,9	H/o	11,8	20,6	20,8	21,0	H/o	-1,9
		40	99,7	H/o	71,0	H/o	28,8	20,6	21,0	22,0	H/o	-7,1
33-03-G02-sc18	PRO1392	-80	97,4	97,4	97,2	0,0	0,2	10,6	9,4	11,0	11,7	-3,9
		4	97,4	97,1	96,9	0,2	0,5	10,6	10,7	10,7	-0,9	-1,3
		40	97,4	94,2	84,7	3,2	13,0	10,6	10,7	11,2	-0,8	-5,9
37-20-B03-sc09	PRO1347	-80	H/o	H/o	H/o	H/o	H/o	H/o	H/o	H/o	H/o	H/o
		4	98,5	97,1	94,6	1,4	4,0	10,6	11,4	11,5	-7,6	-8,0
		40	98,5	83,1	75,6	15,6	23,3	10,6	11,9	11,7	-12,1	-10,0
37-20-B03-sc01	PRO908	-80	75,4	74,4	73,5	1,4	2,5	10,4	10,3	9,9	1,1	4,8
		4	75,4	74,1	<u>73,8</u>	1,7	2,1	10,4	9,9	9,9	4,9	4,7
		40	75,4	75,4	73,2	0,0	3,0	10,4	11,5	11,4	-11,0	-9,6

Таблица 23 Оценка стабильности при циклах З/О в течение 28 дней

Идентификационный номер клона	Идентификационный номер белка	З/О-1*	З/О-2*	З/О-3*	З/О-4*	З/О-5*
38-02-A04-sc13	PRO1352	0,0	0,1	Н/о	Н/о	Н/о
38-27-A11 sc02	PRO1359	0,0	-0,2	-0,1	-0,1	-0,2
38-27-A11 sc03	PRO1360	-0,1	-0,1	-0,3	-0,2	-1,3

* мономерные потери в % при З/О

Идентификационный номер клона	Стратегия трансплантации	Каркас	Идентификационный номер белка	З/О-1*	З/О-2*	З/О-3*	З/О-4*	З/О-5*
37-20-B03-sc01	CDR	VH4	PRO908	-0,8	-1,0	-1,1	-0,4	-1,9
33-03-G02-sc03	ПОЛНЫЙ	VH4	PRO1183	-0,1	-0,4	-0,3	-0,4	-0,3
33-03-G02-sc18	PRO1183 опт.	VH4	PRO1392	-0,1	0,0	0,0	-0,2	-0,2
33-03-G02-sc01	CDR	VH4	PRO830	0,2	0,1	0,1	Н/о	Н/о
33-02-G02-sc09	ПОЛНЫЙ	VH3	PRO1400	0,0	0,0	-0,1	Н/о	Н/о

* мономерные потери в % при цикле X З/О

Н/о: оценка не проводилась

Таблица 24 Дифференциальная сканирующая флуориметрия доменов scFv

Идентификационный номер клона	Идентификационный номер белка	Стратегия трансплантации	Tm [°C]	Tonset [°C]
38-02-A04-sc09	PRO1348	CDR (*)	61,1	56,7
38-02-A04-sc13	PRO1352	CDR c diS (*)	55,2	50,0
38-02-A04-sc13	PRO1352	CDR c diS (**)	62,6	58,0
38-27-A11 sc02	PRO1359	CDR (*)	64,4	61,0
38-27-A11 sc02	PRO1359	CDR (**)	68,3	64,3

(*) Результаты экспериментов с использованием стандартной концентрации белка 100 мкг/мл.

(**) Результаты экспериментов с использованием концентрации белка 50 мкг/мл (эксперимент повторен из-за неидеальной формы кривой таяния при стандартной концентрации).

Идентификационный номер клона	Идентификационный номер белка	Tm [°C]	Tonset [°C]
33-03-G02-sc18	PRO1392	72,40	67,00
37-20-B03-sc01	PRO997	64,39	59,00
37-20-B03-sc09	PRO1347	74,85	67,33

Таблица 25 Результаты оценки стабильности рН в табличном виде

Идентификационный номер клона	Идентификационный номер белка	Температура	Окончательный буфер	Содержание мономеров [%]			Мономерные потери [%]		Концентрация белка [мг/мл]			Потеря содержания [%]		
				д0	д7	д14	д7	д14	д0	д7	д14	д7	д14	
38-02-A04 sc13	PRO1352	4°C	pH 3.5	98,2	98,4	98,2	0,2	-0,2	1,1	1,0	1,1	-3,3	3,0	
			pH 4.5	98,2	98,4	98,3	0,2	-0,2	0,9	1,0	1,0	10,1	-0,5	
			pH 5.5	98,1	98,4	98,2	0,4	-0,2	1,0	1,0	1,1	-0,6	9,5	
			pH 6.5	H/o	98,0	98,1	H/o	0,1	1,0	0,8	1,0	-	14,1	26,5
			pH 7.5	H/o	98,0	98,2	H/o	0,2	1,0	1,0	1,0	1,1	6,7	
		40°C	pH 3.5	98,2	98,0	98,2	-0,2	0,2	1,1	1,1	1,1	6,5	-6,6	
			pH 4.5	98,2	98,0	98,1	1,1	0,1	0,9	1,1	1,0	18,4	-4,1	
			pH 5.5	98,1	98,0	98,1	1,3	0,1	1,0	1,0	1,1	3,6	3,3	
			pH 6.5	H/o	98,0	98,2	1,4	0,2	1,0	1,0	1,1	6,7	2,8	
			pH 7.5	H/o	98,0	98,1	1,4	0,1	1,0	1,0	1,1	4,1	6,3	
38-27-A11 sc02	PRO1359	4°C	pH 3.5	H/o	96,9	96,8	H/o	-0,1	1,0	1,0	1,0	-8,6	0,8	
			pH 4.5	96,9	97,0	97,0	0,1	0,0	1,0	1,0	1,0	-7,3	3,8	
			pH 5.5	96,7	97,0	96,8	0,3	-0,2	1,0	0,9	1,0	-6,7	7,7	
			pH 6.5	96,7	97,0	96,9	0,3	-0,1	1,0	1,0	1,0	4,0	-3,2	
			pH 7.5	96,6	97,0	96,7	0,4	-0,3	1,0	1,0	1,0	4,0	-2,4	
		40°C	pH 3.5	H/o	97,2	97,3	H/o	0,1	1,0	1,0	1,0	-5,8	4,1	
			pH 4.5	96,9	97,0	97,3	0,1	0,3	1,0	0,9	1,0	-9,0	8,9	
			pH 5.5	96,7	97,0	97,4	0,3	0,4	1,0	0,9	1,0	-7,9	10,8	
			pH 6.5	96,7	97,5	97,5	0,9	0,0	1,0	0,9	1,0	-4,6	7,0	
			pH 7.5	96,6	98,0	97,6	1,4	-0,4	1,0	1,0	1,0	-0,2	4,5	
38-27-A11 sc03	PRO1360	4°C	pH 3.5	94,1	94,0	93,9	-0,1	-0,1	1,1	1,0	1,2	-	11,1	21,1
			pH 4.5	93,8	94,0	93,7	0,3	-0,3	1,0	1,0	1,1	2,5	7,7	
			pH 5.5	93,7	94,0	93,7	0,4	-0,3	0,9	1,0	1,1	10,5	4,8	
			pH 6.5	H/o	94,0	93,7	H/o	-0,3	1,0	1,0	1,0	5,8	2,8	
		40°C	pH 7.5	H/o	94,0	93,9	H/o	-0,1	1,0	1,0	1,1	3,1	4,2	
			pH 3.5	94,1	97,0	97,3	3,1	0,3	1,1	1,0	1,0	-8,7	1,6	
			pH 4.5	93,8	97,0	96,9	3,5	-0,1	1,0	1,0	1,1	-0,5	6,6	
			pH 5.5	93,7	97,0	96,9	3,6	-0,1	0,9	1,0	1,1	8,1	9,4	
pH 6.5	H/o	97,0	96,9	H/o	-0,1	1,0	1,0	1,1	2,1	8,1				

pH 7.5	Н/о	Н/о	97.0	Н/о	Н/о	1.0	Н/о	1.1	Н/о	Н/о
--------	-----	-----	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Таблица 26 Содержание мономеров

4°C	Содержание мономеров по данным эксклюзионной ВЭЖХ [%]														
	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
PRO1430	98.96	98.8	98.6	98.56	98.4	98.47	98.35	98.17	98.11	98.11	98.25	97.942	0	98.28	0
PRO1431	98.88	97.94	98.13	97.95	98.23	98.29	98.25	98.59	97.69	98.08	97.87	98.08	97.71	0	0
PRO1432	98.62	97.82	97.96	97.7	97.82	97.86	97.9	96.95	97.37	97.66	97.58	97.81	97.35	0	0
PRO1473	99.55	99.51	99.47	99.17	99.2	99.14	98.9	98.99	99.22	99.18	99.09	98.86	98.28	0	98.82
PRO1476	99.33	99.28	99.31	99.07	98.99	98.99	98.82	98.98	98.98	98.74	98.9	98.71	0	0	97.78
PRO1479	99.28	99.25	99.2	98.83	98.77	98.87	98.82	98.84	98.8	98.77	98.84	98.65	98.07	98.511	97.75
PRO1480	99.56	99.12	99.09	99.13	98.86	98.69	98.63	98.74	98.75	98.57	98.21	98.28	98.232	97.75	97.93
PRO1481	99.42	98.86	98.83	98.82	98.47	98.23	98.47	98.43	98.55	98.26	97.87	97.92	97.906	97.61	97.57
PRO1482	98.70	98.7	98.55	98.19	98.14	98.23	98.02	98.16	98.01	98.02	97.86	97.88	0	97.799	97

20°C	Содержание мономеров по данным эксклюзионной ВЭЖХ [%]														
	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
PRO1430	98.96	98.74	98.53	98.48	97.53	98.01	97.35	97.53	97.18	97.04	96.992	96.197	0	96.64	0
PRO1431	98.88	97.96	98.03	98.07	97.59	97.25	97.21	96.26	96.01	96.24	95.61	95.77	95.49	95.66	0
PRO1432	98.62	97.81	97.76	97.46	97.28	96.98	96.86	96.18	95.98	96.09	95.74	95.79	95.42	95.35	0
PRO1473	99.55	99.48	99.38	98.99	98.88	98.75	97.84	97.56	97.58	97.41	96.96	96.6	0	0	95.66
PRO1476	99.33	99.23	98.99	98.73	98.56	98.52	98.19	97.72	97.66	97.59	97.3	96.93	0	0	95.7
PRO1479	99.28	99.21	99.12	98.63	98.33	98.26	97.95	97.59	97.1	97.3	97.03	96.56	0	96.162	95.67
PRO1480	99.56	99.03	98.9	98.59	97.88	97.15	96.84	95.93	96.26	95.7	95.17	95.27	94.179	93.86	94.15
PRO1481	99.42	98.71	98.6	98.16	97.23	96.57	96.42	96.47	95.67	95.07	94.47	94.37	93.562	93.05	93.4
PRO1482	98.70	98.63	98.31	97.9	97.63	97.42	97.14	96.71	96.26	96.31	96.07	95.67	0	95.063	94.46

40°C	Содержание мономеров по данным эксклюзионной ВЭЖХ [%]														
	0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	84
PRO1430	98.96	98.11	96.72	94.32	93.19	93.23	92.47	92.33	91.77	91.43	89.837	89.533	0	88.3	0
PRO1431	98.88	97.04	95.43	94.05	93.36	92.66	92.35	91.16	90.38	89.86	88.02	87.54	87.35	87.15	0
PRO1432	98.62	96.79	95.24	93.81	93.28	92.6	92.41	91.15	90.81	90.63	89.27	88.82	87.98	0	0
PRO1473	99.55	98.4	96.92	95.61	94.71	94.29	93.069	92.52	91.88	91.4	90.69	89.92	0	82.315	87.16
PRO1476	99.33	98.25	96.99	95.49	94.4	93.94	93.29	92.93	92.36	91.99	91.45	90.9	0	89.808	88.78
PRO1479	99.28	98.41	96.98	95.28	94.46	93.94	93.35	93.02	92.23	92.07	91.44	90.87	0	89.586	89.08
PRO1480	99.56	97.46	96.12	94.48	93.49	92.87	92.34	91.46	91.06	89.89	89.12	88.49	87.102	86.12	85.71
PRO1481	99.42	96.75	95.29	94.01	93	92.53	92.02	91.15	90.71	89.5	88.78	88.02	86.489	85.67	85.08
PRO1482	98.70	97.45	96.02	94.41	93.41	93.03	92.61	92.29	91.56	91.59	91.06	90.56	0	89.586	88.85

Содержание мономеров по данным эксклюзионной ВЭЖХ [%]				
-20°C	0	28	56	84
PRO1430	98.96	98.42	98.385	0
PRO1431	98.88	98.37	98.2	98.935
PRO1432	98.62	98.2	97.95	98.579
PRO1473	99.55	98.67	99.32	98.99
PRO1476	99.33	98.96	99.16	98.97
PRO1479	99.28	98.88	99.15	98.18
PRO1480	99.56	99.18	99	99.38
PRO1481	99.42	98.98	98.86	99.16
PRO1482	98.70	98.15	98.34	97.44

Формула изобретения

1. Мультиспецифическое антитело, включающее в себя:
 - a) по меньшей мере один CD137 связывающий домен (CD137-BD) и
 - b) по меньшей мере один PDL1 связывающий домен (PDL1-BD),в котором указанный CD137-BD связывается с человеческим CD137 с константой диссоциации (КД), которая по меньшей мере в 5 раз, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз, например, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 200 раз, по меньшей мере в 300 раз, по меньшей мере в 400 раз, более предпочтительно по меньшей мере в 500 раз, например, по меньшей мере в 600 раз, по меньшей мере в 700 раз, по меньшей мере в 800 раз, по меньшей мере в 900 раз, по меньшей мере в 1000 раз выше константы диссоциации (КД) связывания с человеческим PDL1 указанного PDL1-BD.
2. Мультиспецифическое антитело по п.1, в котором указанное антитело является одновалентным, двухвалентным или мультивалентным для специфичности к CD137, предпочтительно одновалентным, и необязательно в котором указанное антитело является одновалентным, двухвалентным или мультивалентным для специфичности PDL1, предпочтительно одновалентным.
3. Мультиспецифическое антитело по любому из п.п.1-2, в котором указанное антитело дополнительно содержит по меньшей мере один домен, связывающий человеческий сывороточный альбумин (HSA-BD), предпочтительно один домен, связывающий человеческий сывороточный альбумин.
4. Мультиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, в котором указанный CD137-BD является агонистом CD137.
5. Мультиспецифическое антитело по п.4, в котором указанный CD137-BD:
 - a) связывается с человеческим CD137 с константой диссоциации (КД) менее 50 нМ, в частности менее 10 нМ, в частности менее 5 нМ, в частности менее 1 нМ, в частности менее 500 пМ, более конкретно менее 100 пМ, более конкретно менее 50 пМ, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv (одновалентную аффинность);
 - b) связывается с CD137 человека со скоростью K_{off} , равной 10^{-3} с^{-1} или менее или 10^{-4} с^{-1} или менее, или 10^{-5} с^{-1} или менее, при измерении с помощью SPR, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv;
 - c) связывается с CD137 человека со скоростью K_{on} равной по

меньшей мере $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или более, по меньшей мере $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или более, по меньшей мере $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ или более при измерении с помощью SPR, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv;

- d) необязательно не конкурирует перекрестно с урелумабом;
- e) необязательно не конкурирует перекрестно с утомилумабом и/или
- f) является перекрестно-реактивным с CD137 Macaca fascicularis (Cynomolgus).

6. Мультиспецифическое антитело по п.4 или п.5, в котором указанный CD137-BD включает в себя

(i) последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3:

- a) SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно, или
- b) SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно, и

(ii) каркасные последовательности FR1-FR4 доменов VH3 или VH4, предпочтительно каркасные последовательности FR1-FR4 домена VH3, и

(iii) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасы V_K FR1, FR2 и FR3, в частности V_{K1} или V_{K3} FR1-FR3, предпочтительно V_{K1} FR1-FR3, и каркас FR4, который выбран из V_K FR4, в частности V_{K1} FR4, V_{K3} FR4, и V_λ FR4, в частности V_λ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, более конкретно V_λ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, предпочтительно V_λ FR4, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 199.

7. Мультиспецифическое антитело по п.4 или п.5, в котором указанный CD137-BD включает в себя последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 59, 60 и 61, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 74, 75 и 76, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 71, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 83, предпочтительно в котором

указанная VH содержит мутацию G51C (нумерация АНо), и указанная VL содержит мутацию T141C (нумерация АНо).

8. Мультиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором PDL1-BD является блокатором PDL1.

9. Мультиспецифическое антитело по п.8, в котором указанный PDL1-BD:

а) связывается с человеческим PDL1 с константой диссоциации (KD) менее 50 нМ, в частности менее 10 нМ, в частности менее 5 нМ, в частности менее 1 нМ, в частности менее 500 пМ, более конкретно менее 100 пМ, предпочтительно менее 10 пМ, более предпочтительно 5 пМ, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv (одновалентную аффинность);

б) связывается с человеческим PDL1 со скоростью K_{off} , равной 10^{-3} с^{-1} или менее или 10^{-4} с^{-1} или менее, или 10^{-5} с^{-1} или менее, при измерении с помощью SPR, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv;

в) связывается с человеческим PDL1 со скоростью K_{on} , равной по меньшей мере $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ или более, по меньшей мере $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ или более, по меньшей мере $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ или более, по меньшей мере $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ или более, при измерении с помощью SPR, в частности в котором указанное антитело представляет собой scFv;

г) является перекрестно-реактивным с PDL1 *Macaca fascicularis* (*Cynomolgus*) и/или

е) не является перекрестно реагирующим на PDL1 *Mus musculus*.

10. Мультиспецифическое антитело по п.8 или п.9, в котором указанный PDL1-BD включает в себя:

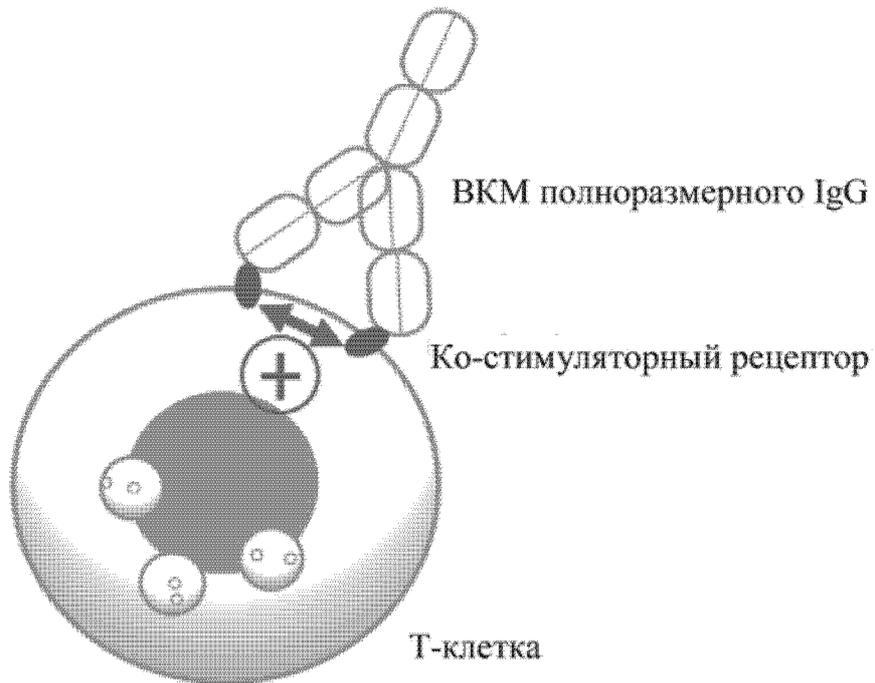
а) последовательности HCDR1, HCDR2, и HCDR3 SEQ ID NO: 89, 90 и 91, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 105, 106 и 107, соответственно;

б) каркасные последовательности FR1-FR4 доменов VH3 или VH4; предпочтительно каркасные последовательности FR1-FR4 домена VH3, и

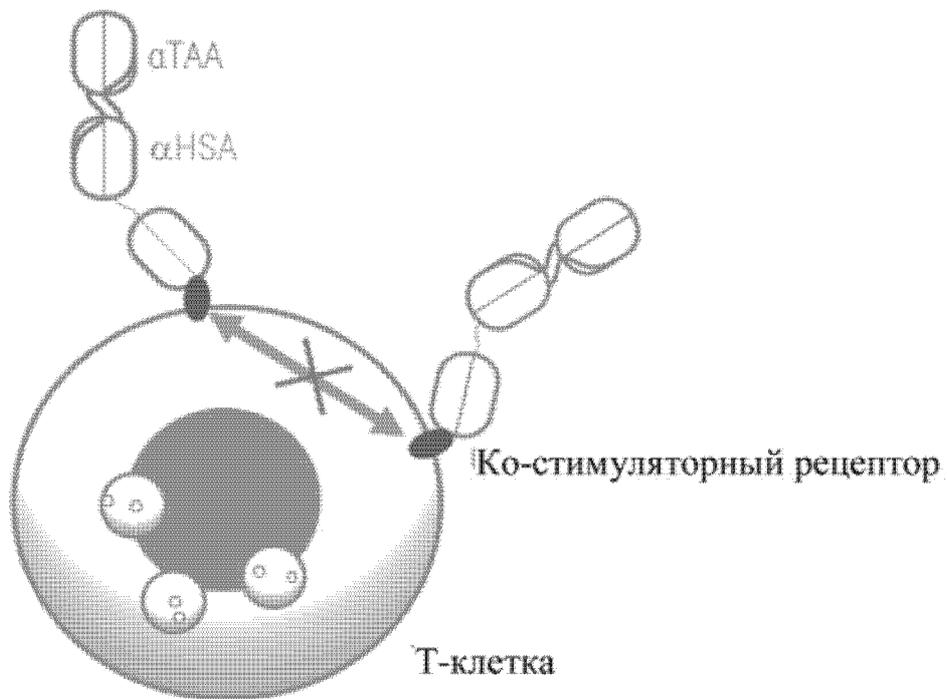
в) домен VL, содержащий каркас VL, содержащий каркасы V_k FR1, FR2 и FR3, в частности V_{k1} или V_{k3} FR1-FR3, предпочтительно V_{k1} FR1-FR3, и каркас FR4, который выбран из V_k FR4, в частности V_{k1} FR4, V_{k3} FR4, и V_λ FR4, предпочтительно V_λ FR4, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 процентов совпадает с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205,

предпочтительно Vλ FR4, указанный в SEQ ID NO: 199 – SEQ ID NO: 205, более предпочтительно Vλ FR4, указанный в SEQ ID NO: 199.

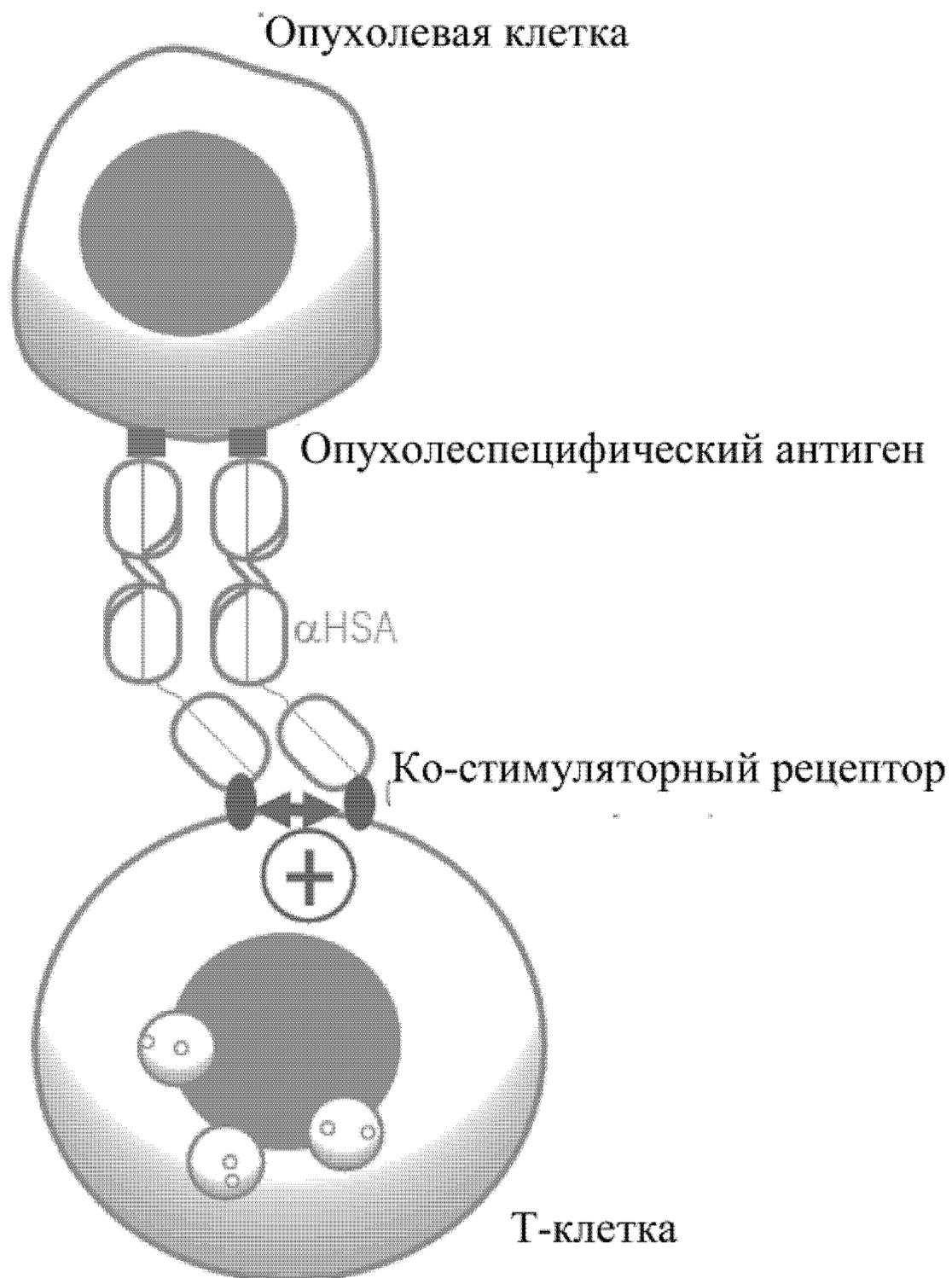
11. Мультиспецифическое антитело по п.8 или п.9, в котором указанный PDL1-BD включает в себя последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3: SEQ ID NO: 92, 93 и 94, соответственно, и последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 108, 109 и 110, соответственно, последовательность VH, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 104, и последовательность VL, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов совпадает с SEQ ID NO: 115, предпочтительно в котором указанная VH содержит мутации G56A и Y105F (нумерация AHo) и указанная VL содержит мутации S9A и A51P (нумерация AHo).
12. Мультиспецифическое антитело по любому из п.п. 3-11, в котором указанный HSA-BD содержит: (a) последовательность VH SEQ ID NO: 161 и последовательность VL SEQ ID NO: 171 или (b) последовательность VH SEQ ID NO: 185 и последовательность VL SEQ ID NO: 195.
13. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель.
14. Применение мультиспецифического антитела по любому из п.п.1-12 или фармацевтической композиции по п.13 в качестве лекарственного средства.
15. Способ получения мультиспецифического антитела по любому из п.п.1-12, который включает в себя этап культивирования клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту или вектор, кодирующий мультиспецифическое антитело по любому из п.п.1-12 или его связывающий домен, или его фрагмент.



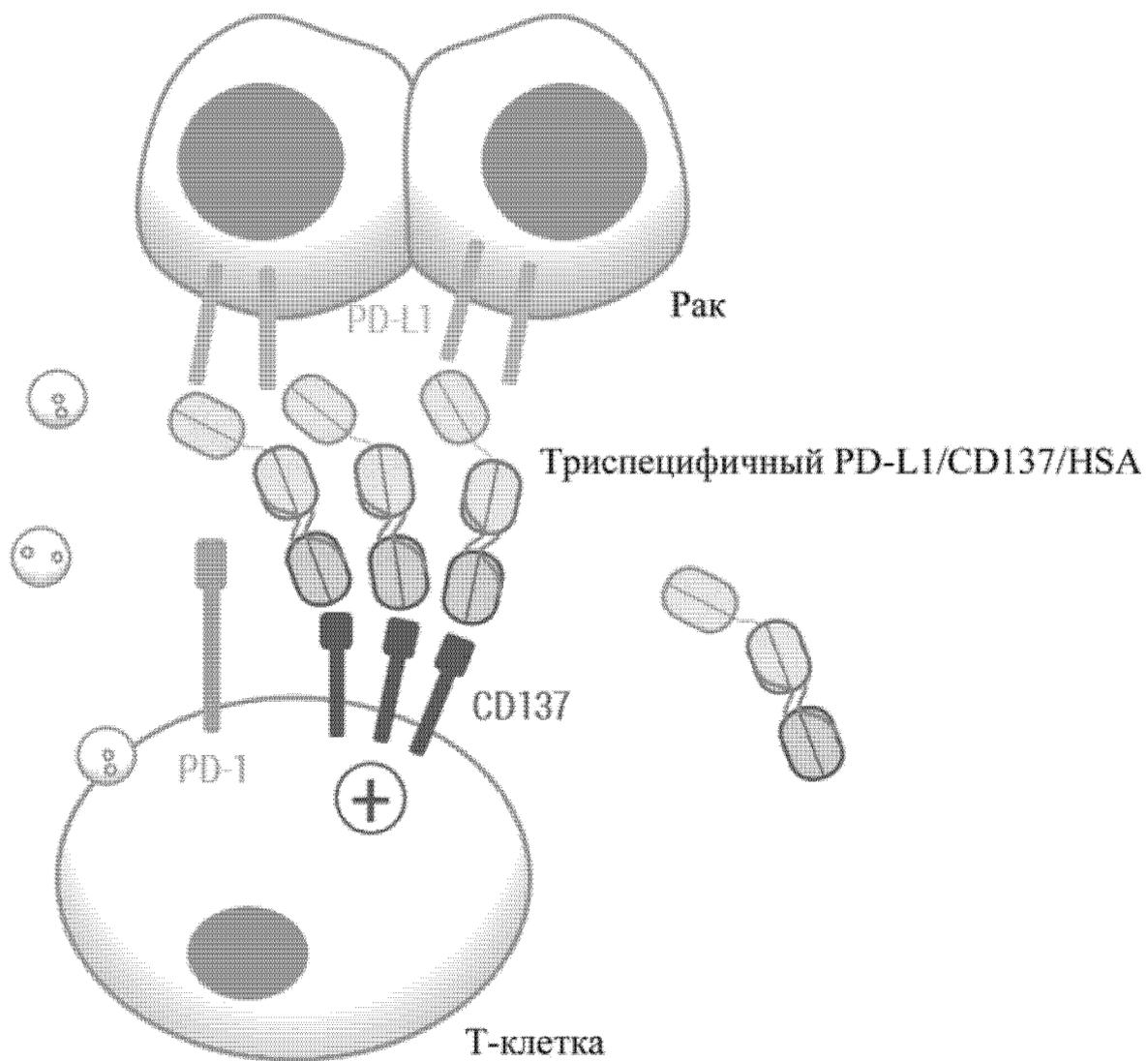
Фиг. 1А



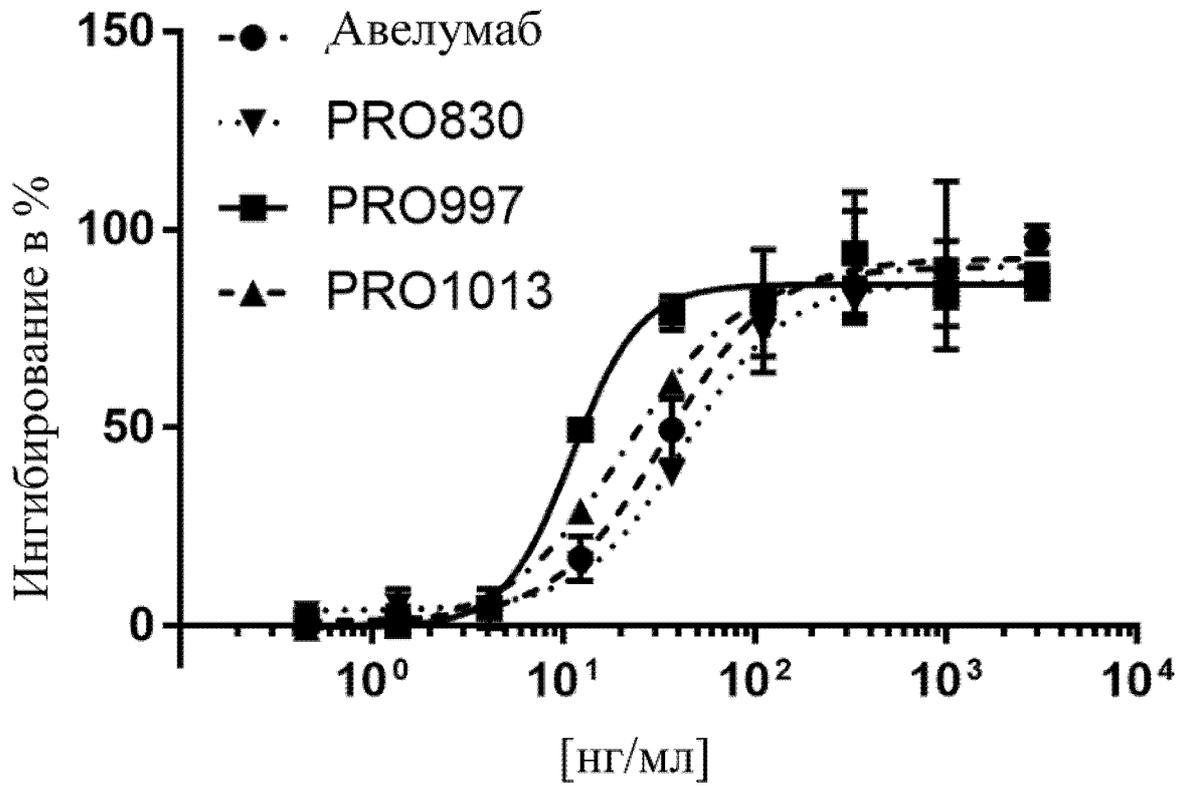
Фиг. 1В



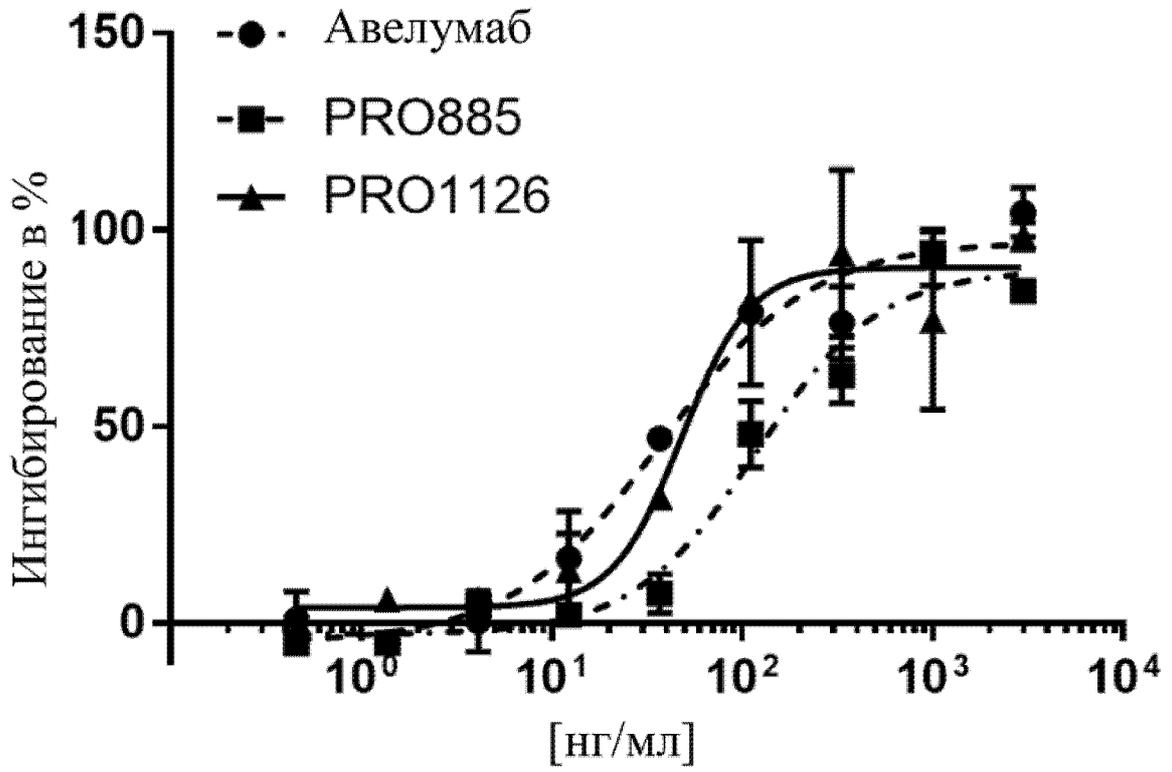
Фиг. 1С



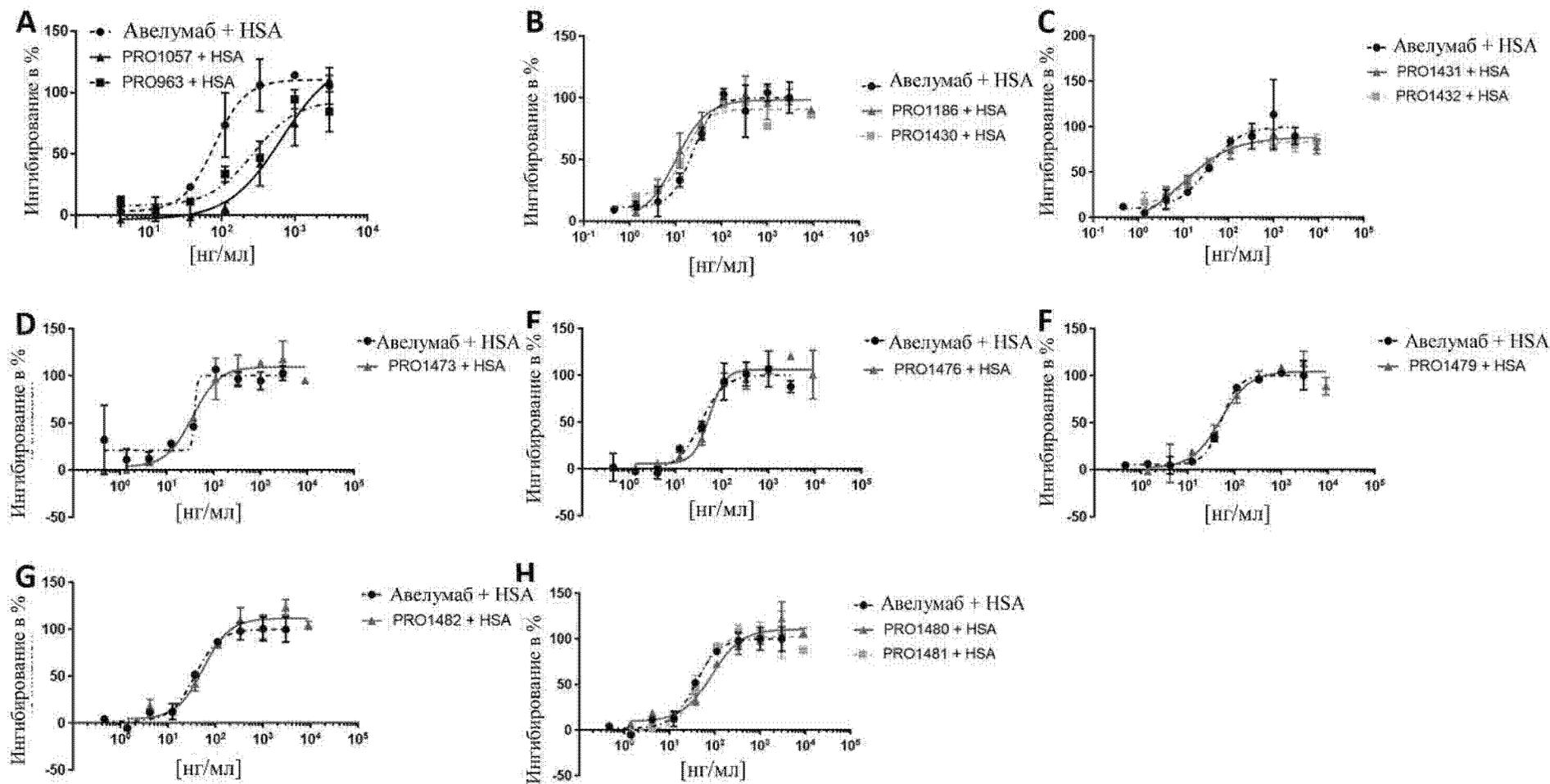
Фиг. 2



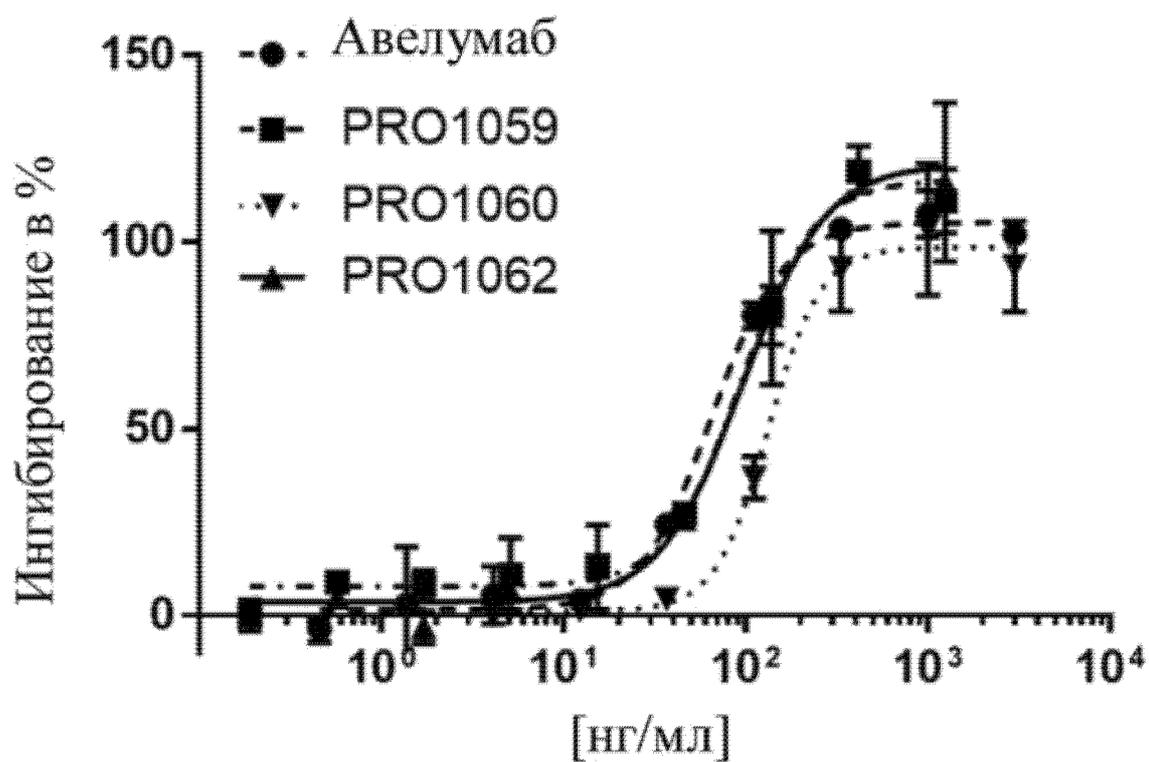
Фиг. 3



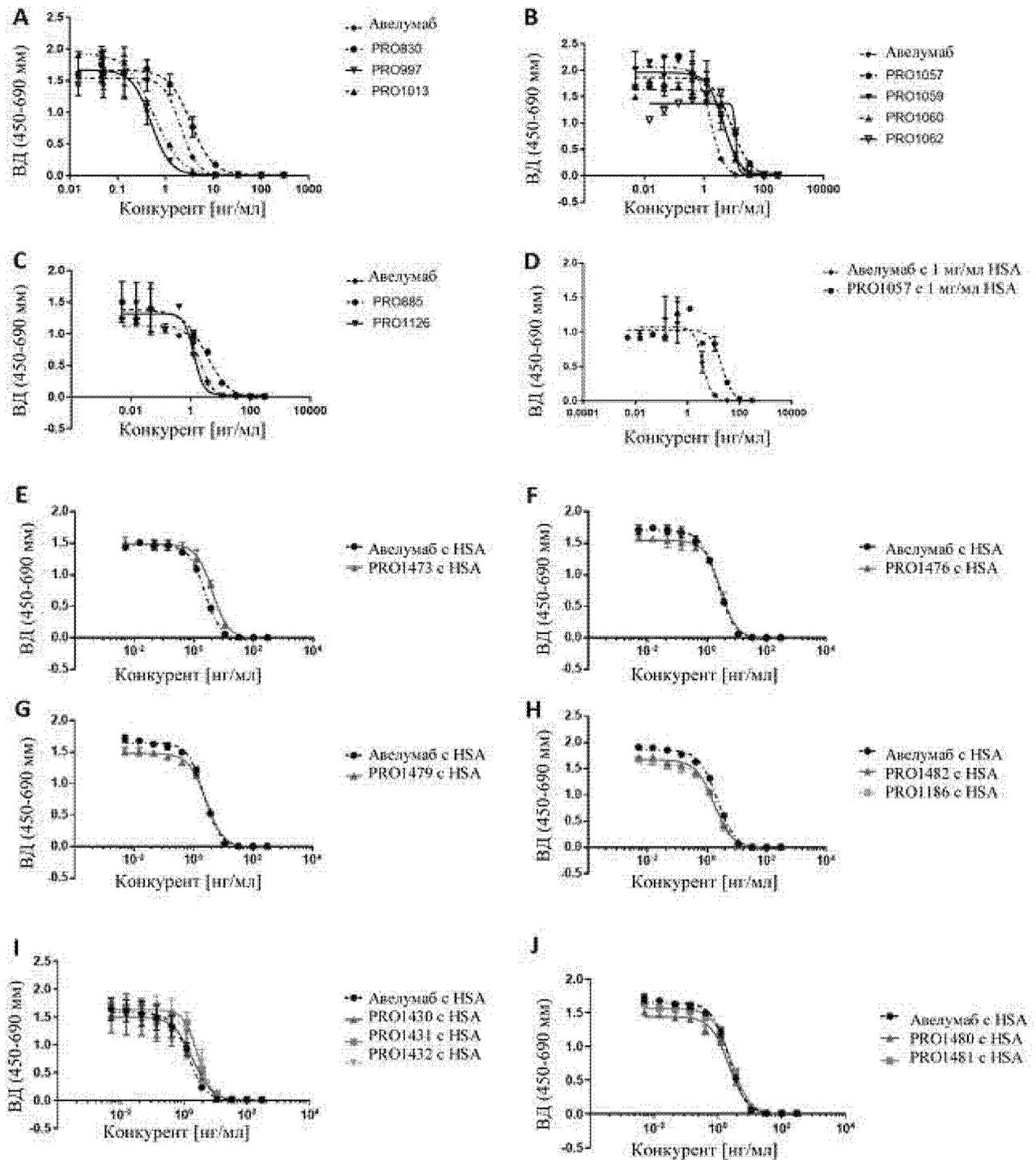
Фиг. 4



Фиг. 5



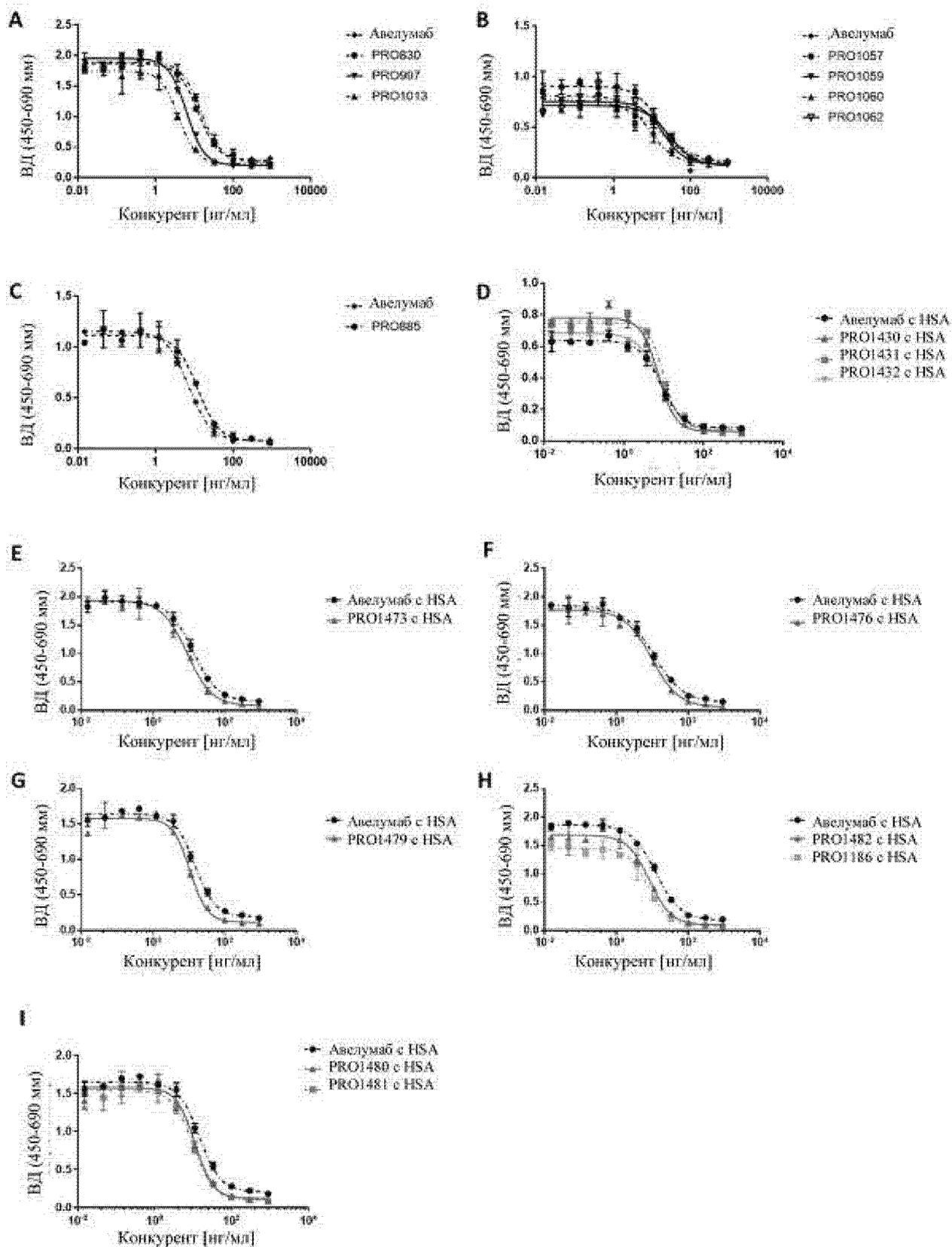
Фиг. 6



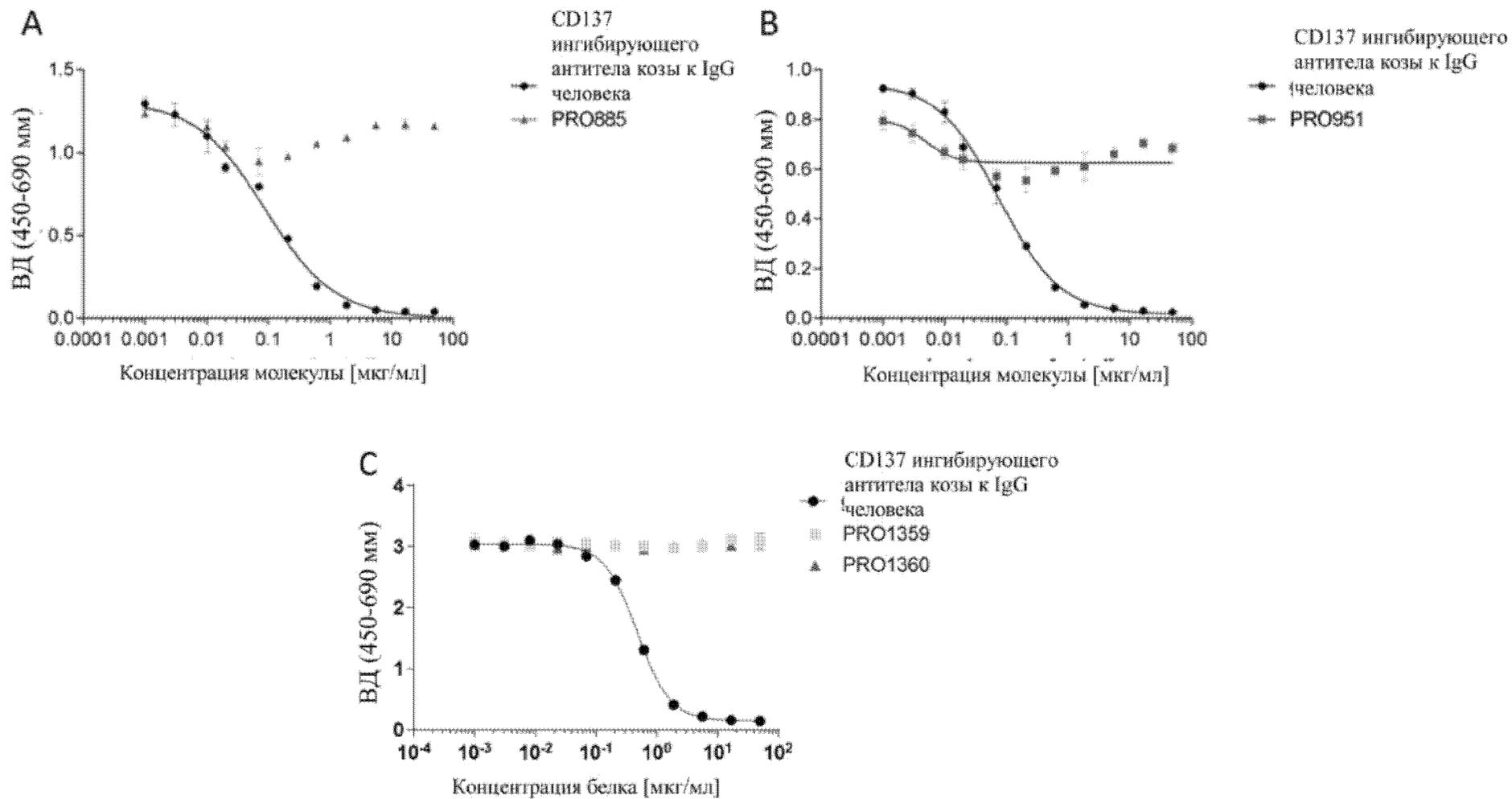
Фиг. 7

МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО

Лист 9/36



Фиг. 8



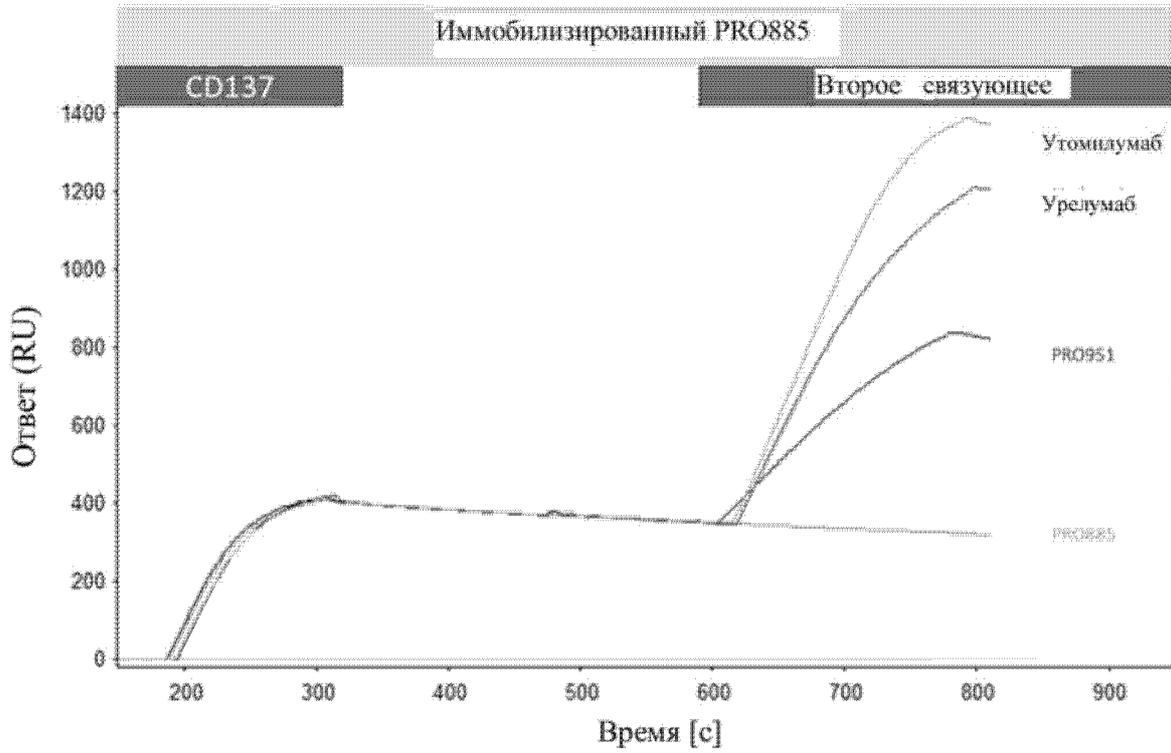
Фиг. 9

Тепловая карта	Урелумаб	Утомилумаб	PRO885	PRO951
PRO885	29%	35%	0%	48%
PRO951	34%	0%	22%	0%

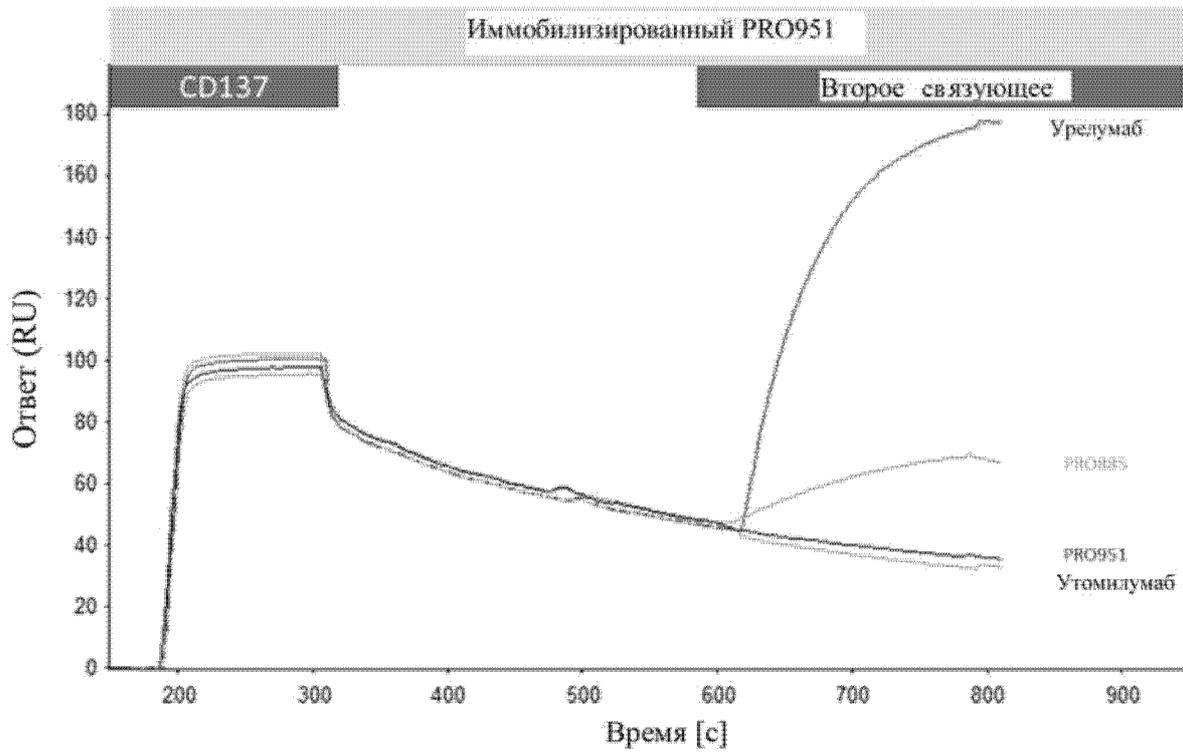
Тепловая карта	38-27-A11	Урелумаб	Утомилумаб
38-27-A11	0%	0%	52%
Урелумаб	0%	0%	41%
Утомилумаб	17%	21%	0%

Уровень связывания, нормализованный до теоретического Rmax [%]

Фиг. 10

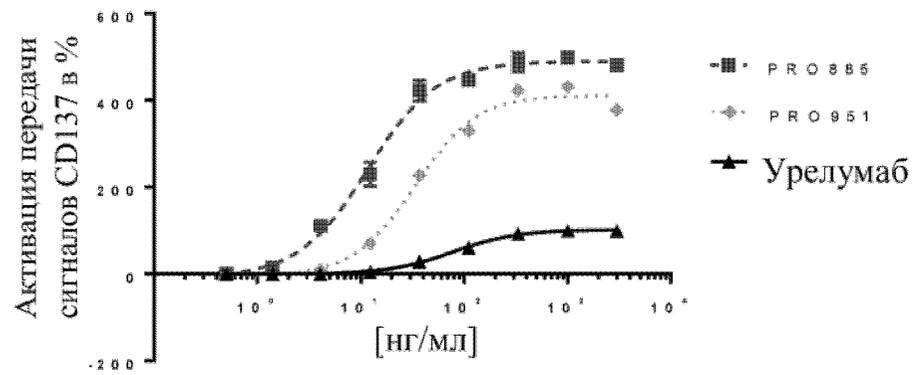


Фиг. 11

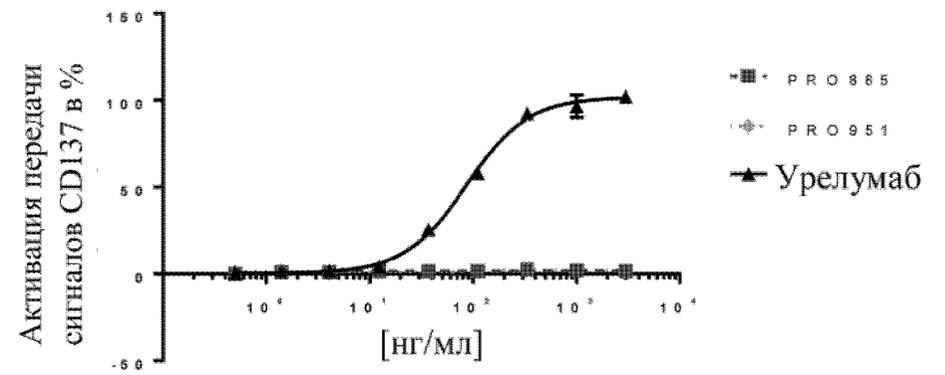


Фиг. 12

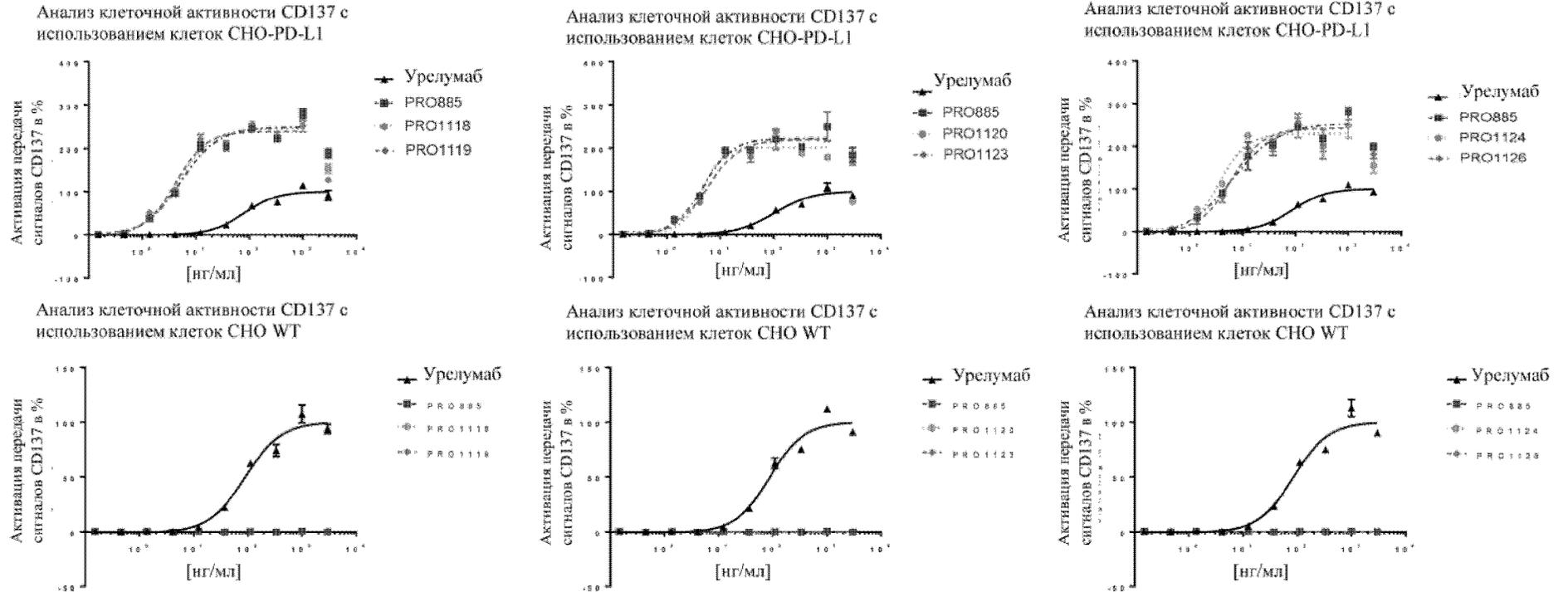
Анализ клеточной активности CD137 с использованием клеток CHO-PD-L1



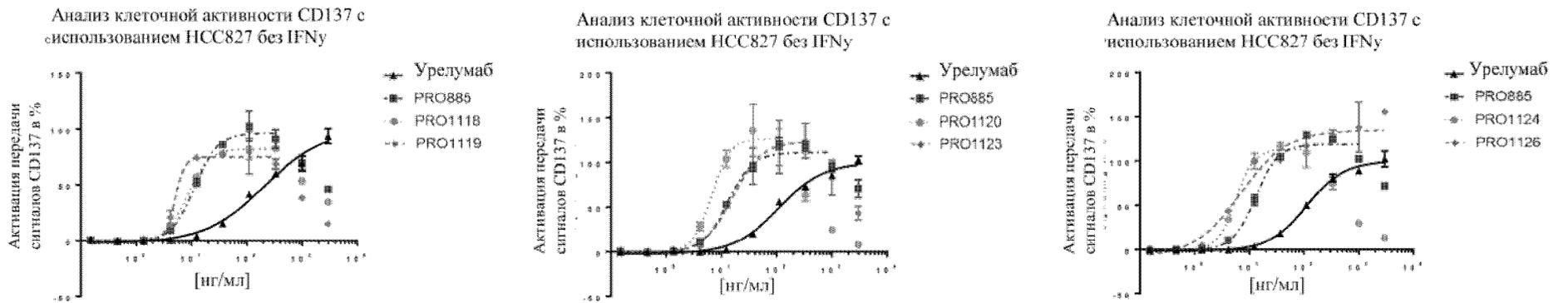
Анализ клеточной активности CD137 с использованием клеток CHO WT



Фиг. 13

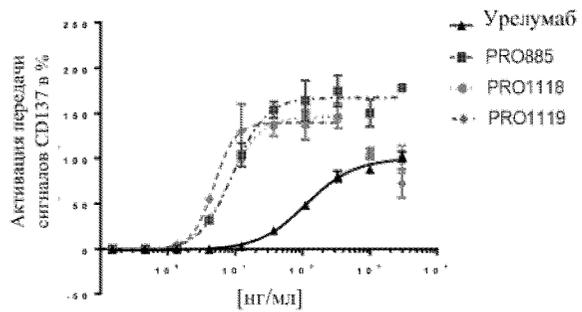


Фиг. 14

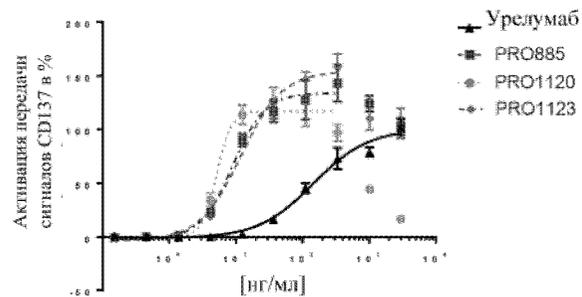


Фиг. 15

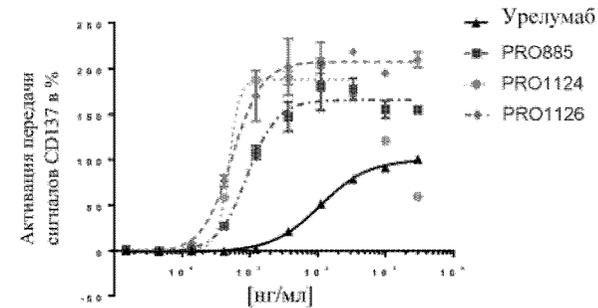
Анализ клеточной активности CD137 с использованием HCC827 с IFN γ



Анализ клеточной активности CD137 с использованием HCC827 с IFN γ

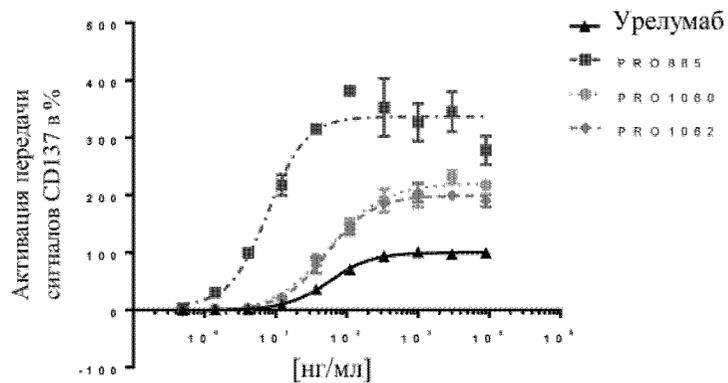


Анализ клеточной активности CD137 с использованием HCC827 с IFN γ

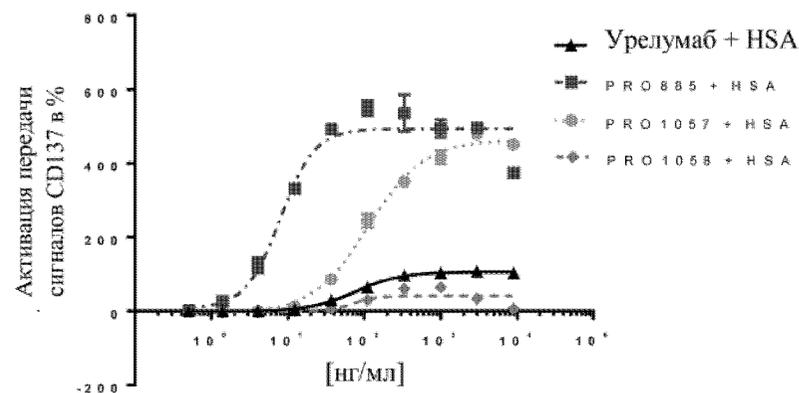


Фиг. 16

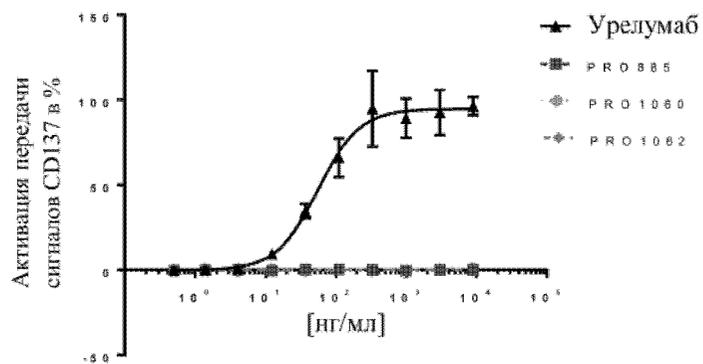
Анализ клеточной активности CD137 с использованием клеток CHO-PD-L1



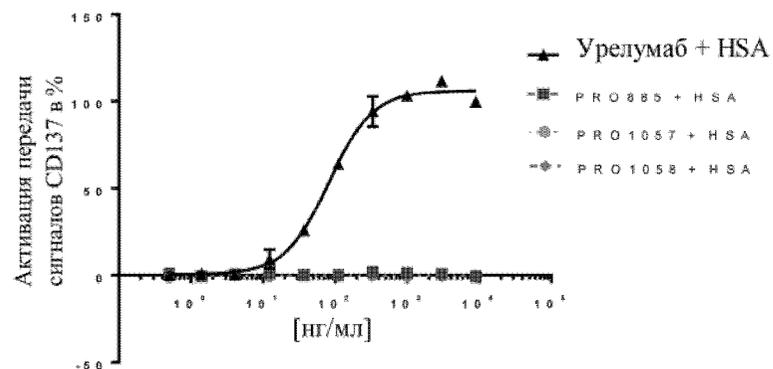
Анализ клеточной активности CD137 с использованием клеток CHO-PD-L1



Анализ клеточной активности CD137 с использованием клеток CHO WT

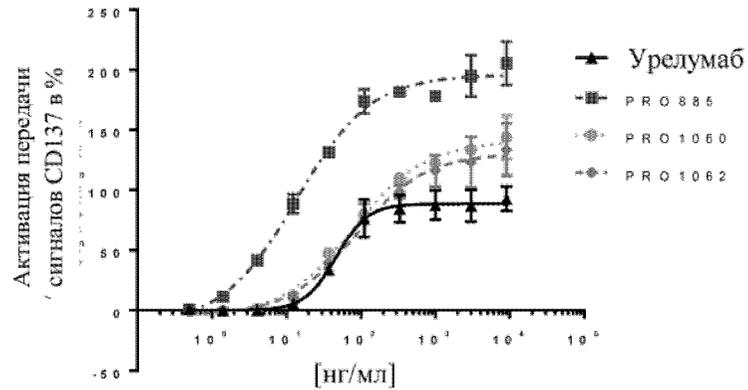


Анализ клеточной активности CD137 с использованием клеток CHO WT

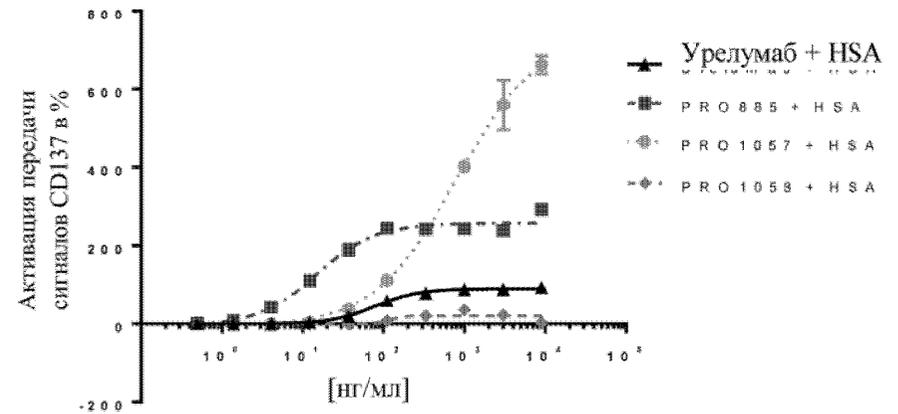


Фиг. 17

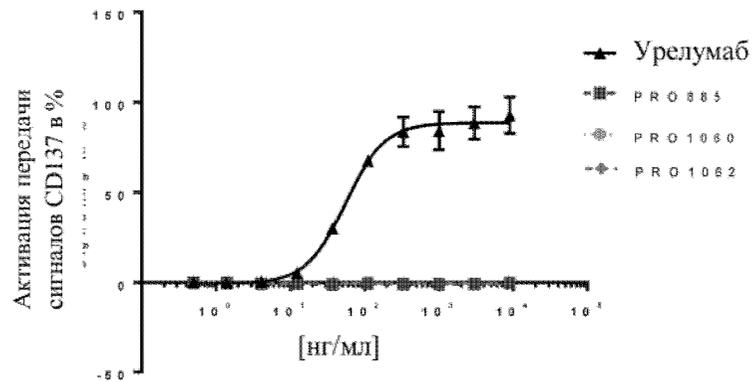
Анализ клеточной активности CD137 с использованием клеток CHO-PD-L1



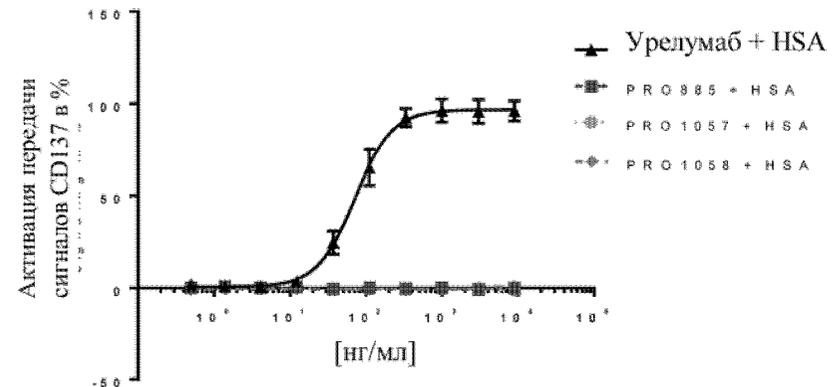
Анализ клеточной активности CD137 с использованием клеток CHO-PD-L1



Анализ клеточной активности CD137 с использованием клеток CHO WT



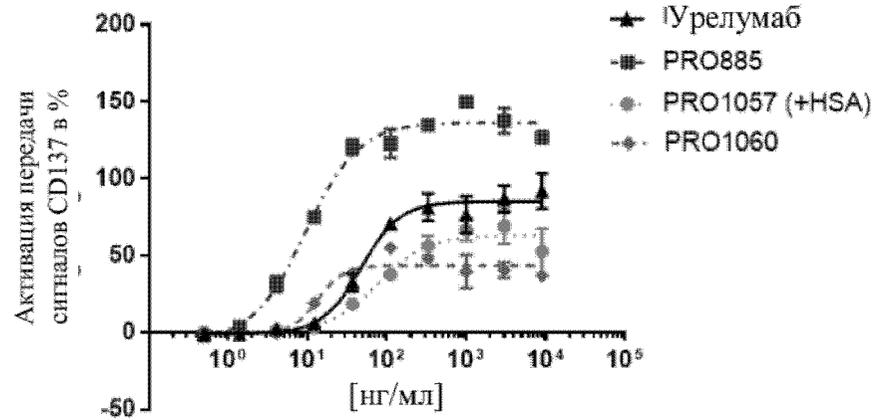
Анализ клеточной активности CD137 с использованием клеток CHO WT



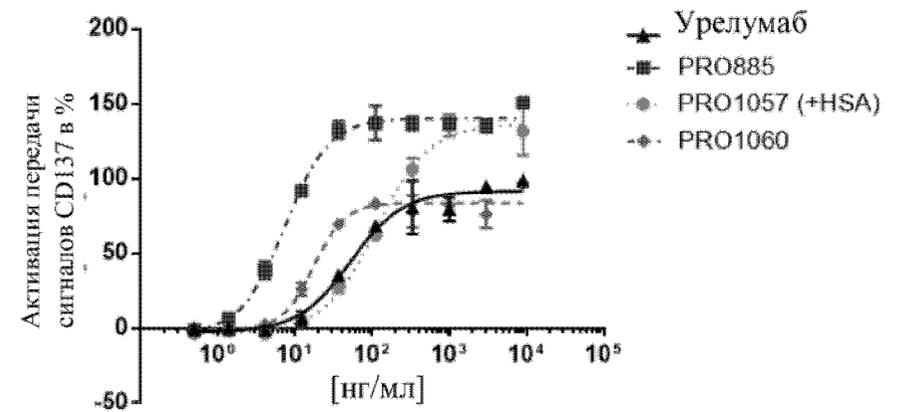
Фиг. 18

A

Анализ клеточной активности CD137 с использованием клеток HCC827 без IFN γ



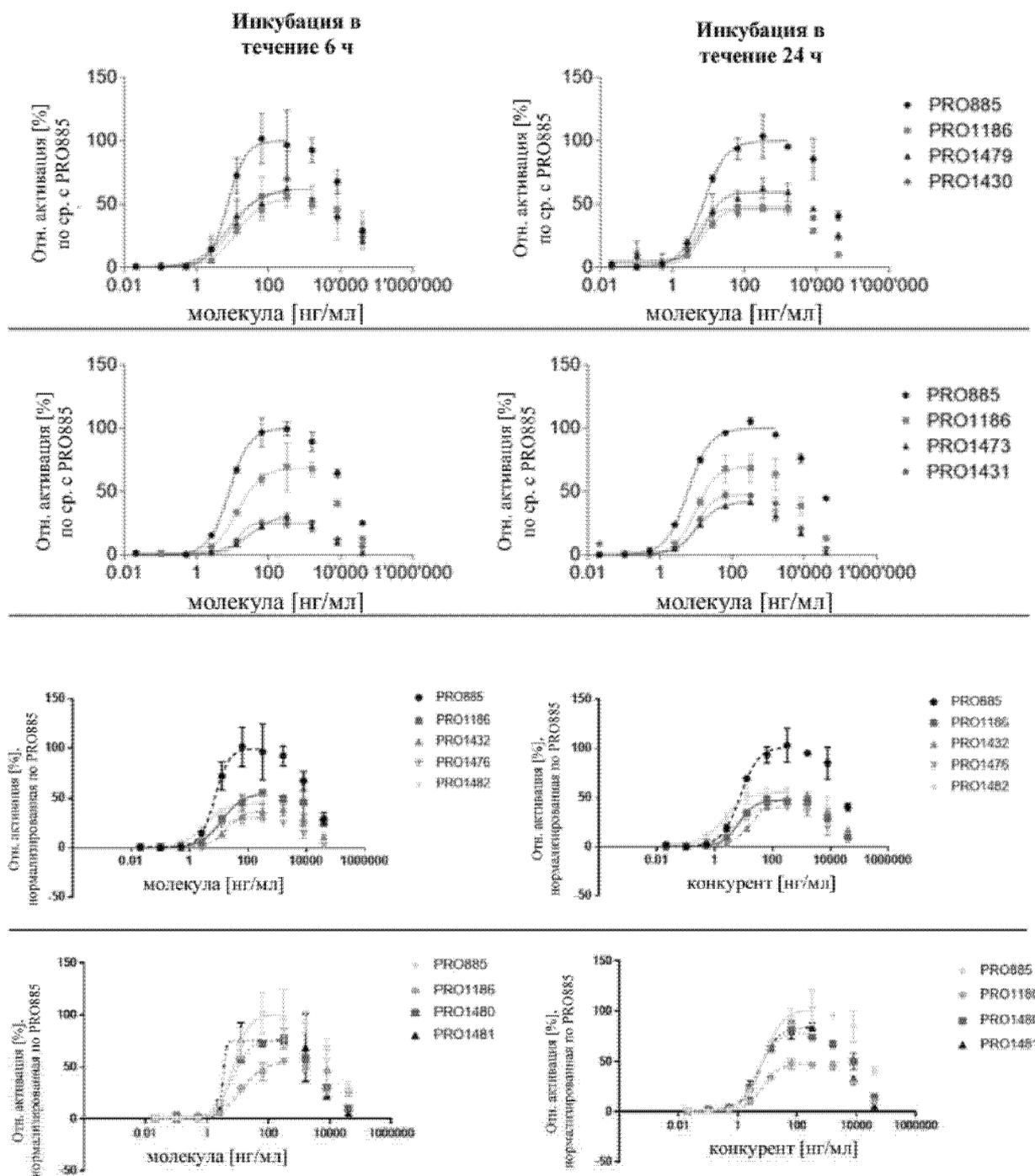
Анализ клеточной активности CD137 с использованием клеток HCC827 с IFN γ



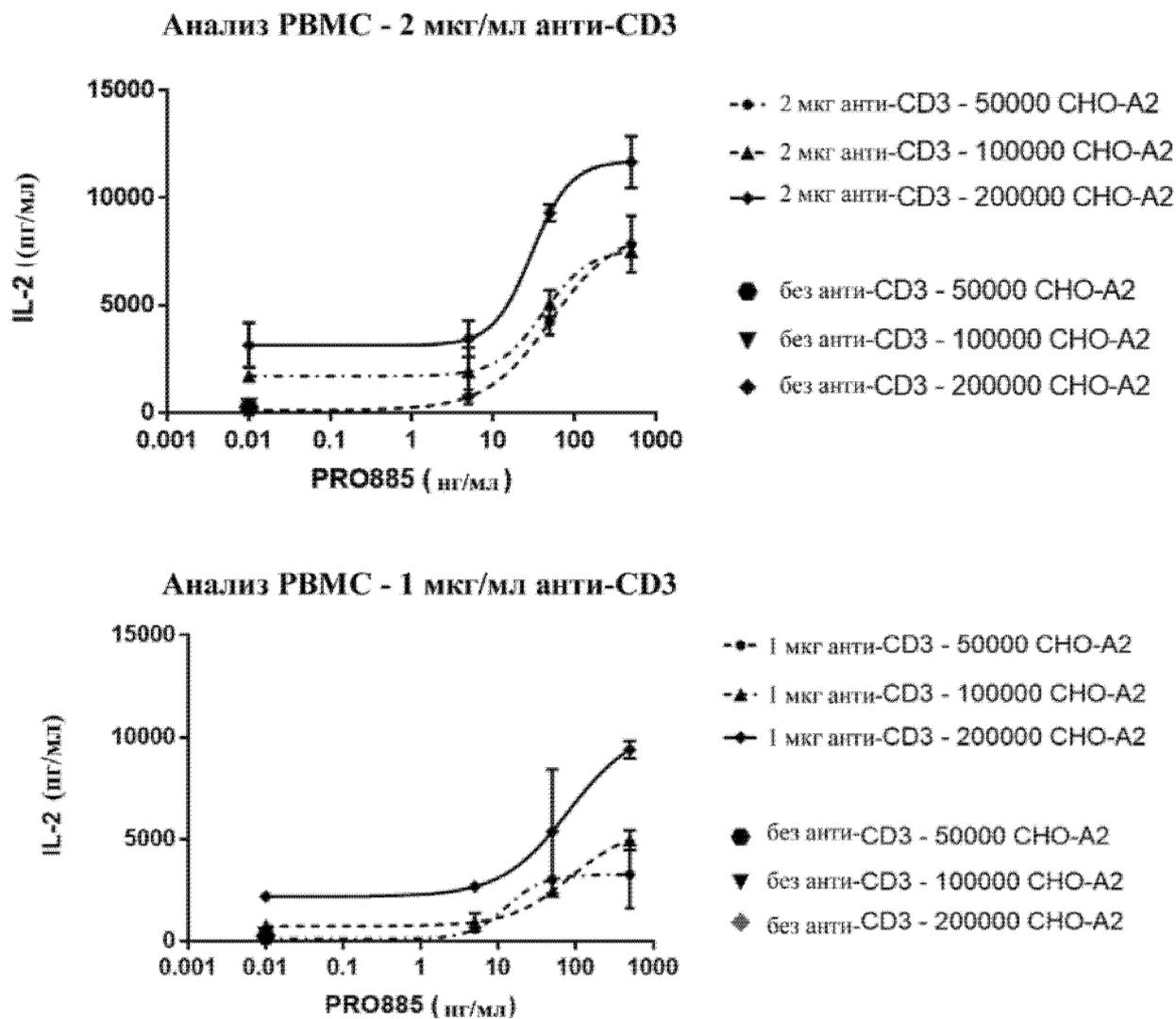
Фиг. 19А

В

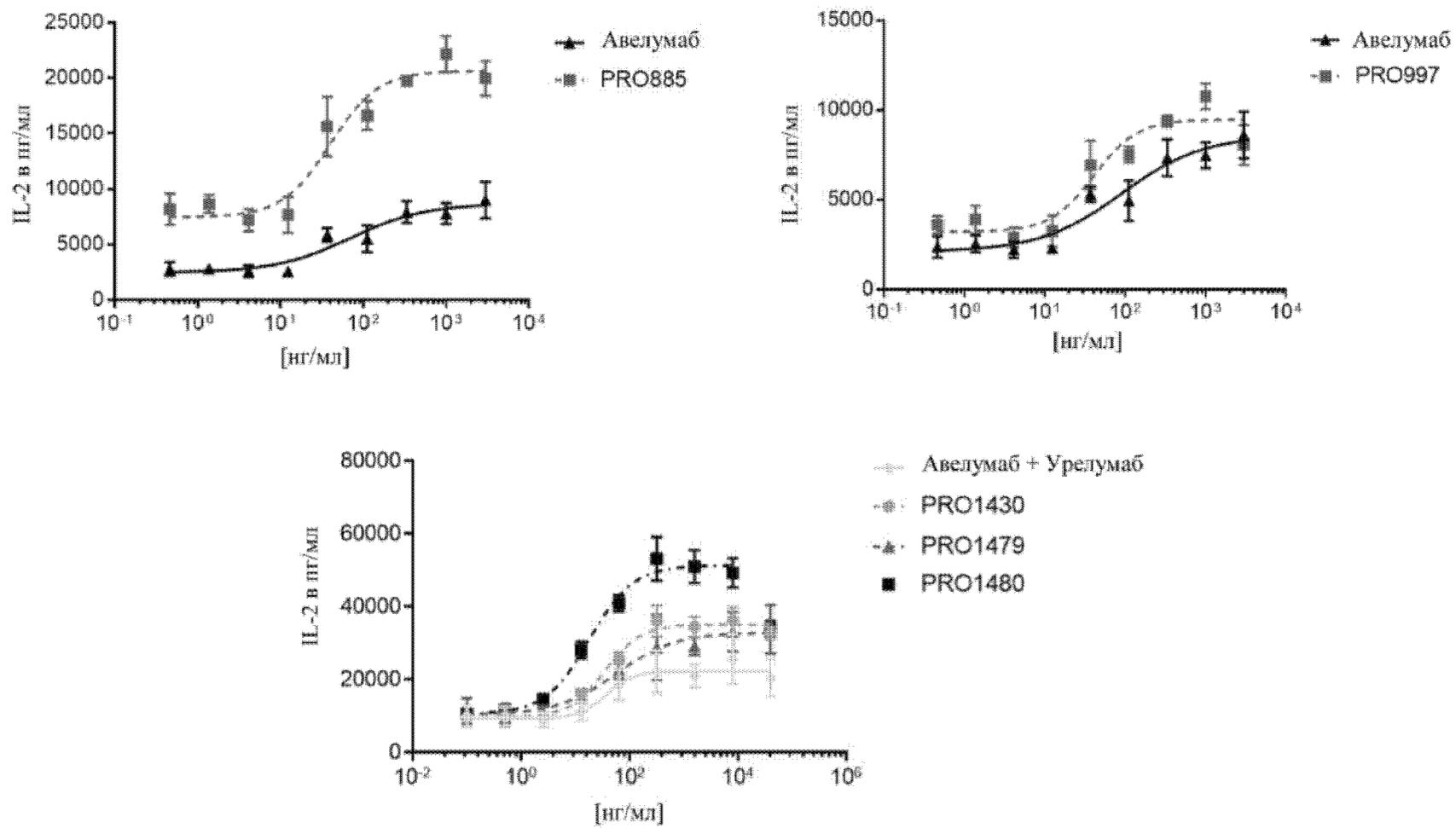
Активация CD137 в репортерных клетка Юркат, совместная культивация клетками НСС827



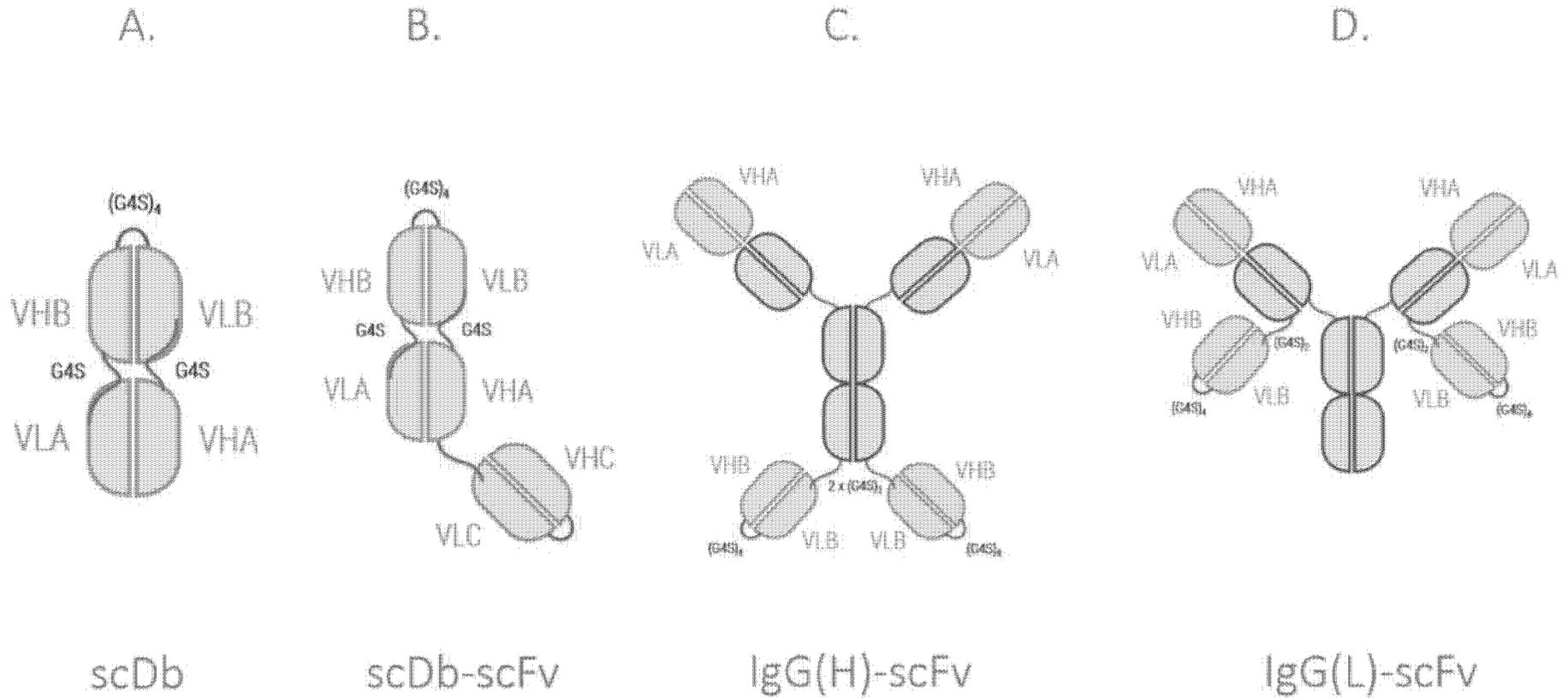
Фиг. 19В



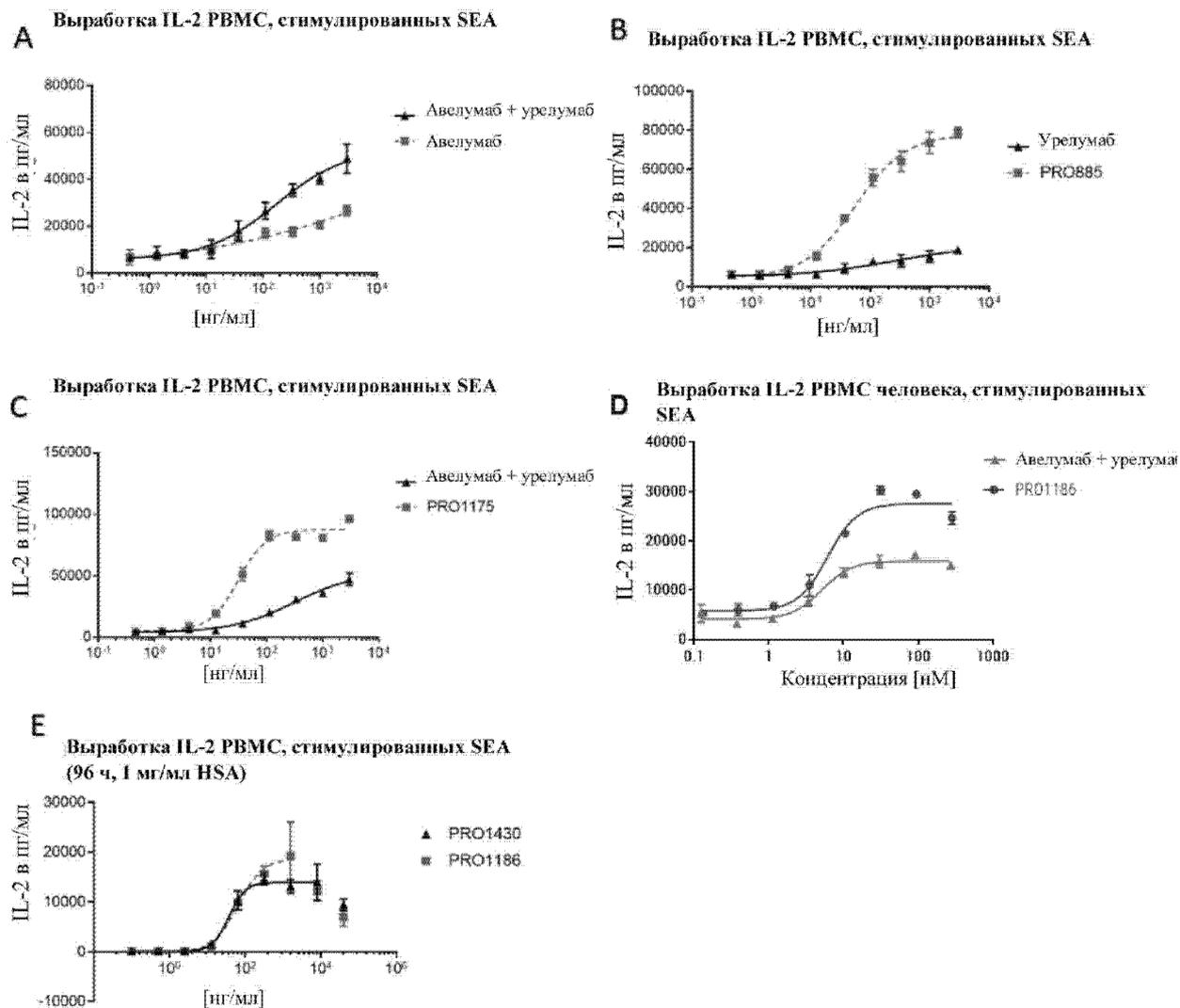
Фиг. 20



Фиг. 21

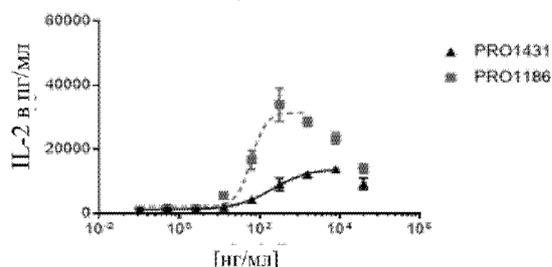


Фиг. 22

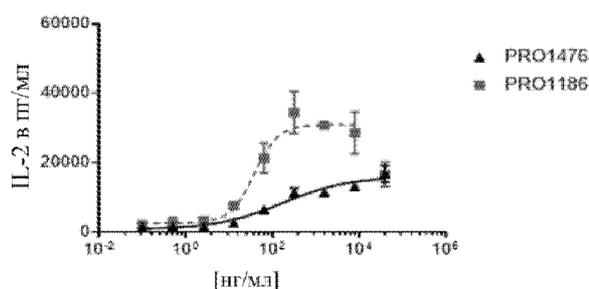


Фиг. 23 (А)-(Е)

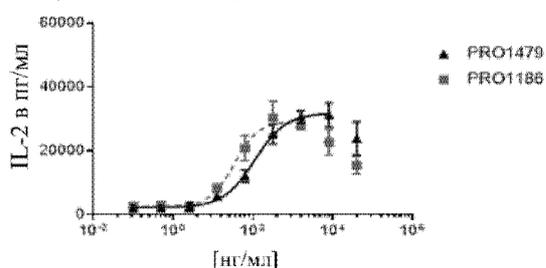
Ф Выработка IL-2 PBMC, стимулированных SEA (96 ч, 1 мг/мл HSA)



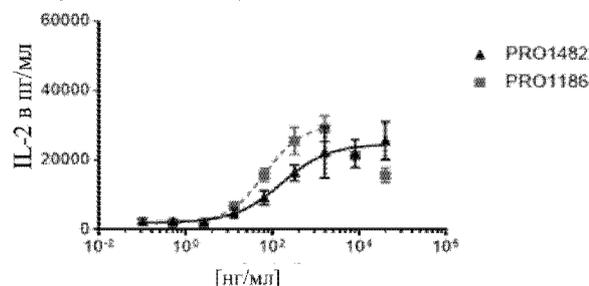
Г Выработка IL-2 PBMC, стимулированных SEA (96 ч, 1 мг/мл HSA)



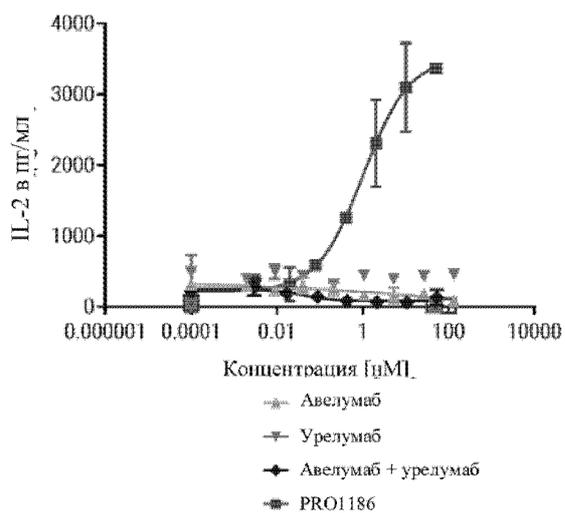
Н Выработка IL-2 PBMC, стимулированных SEA (96 ч, 1 мг/мл HSA)



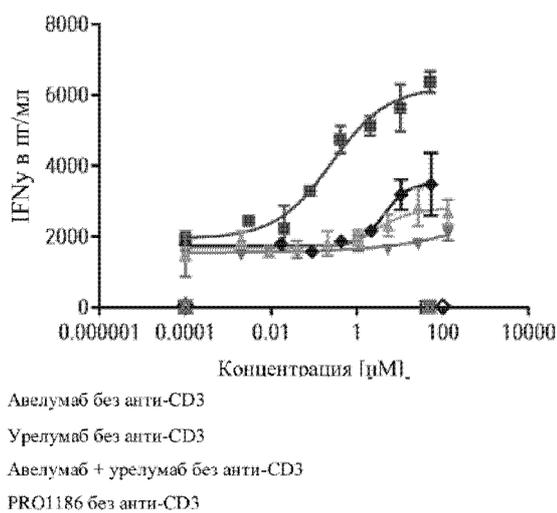
И Выработка IL-2 PBMC, стимулированных SEA (96 ч, 1 мг/мл HSA)



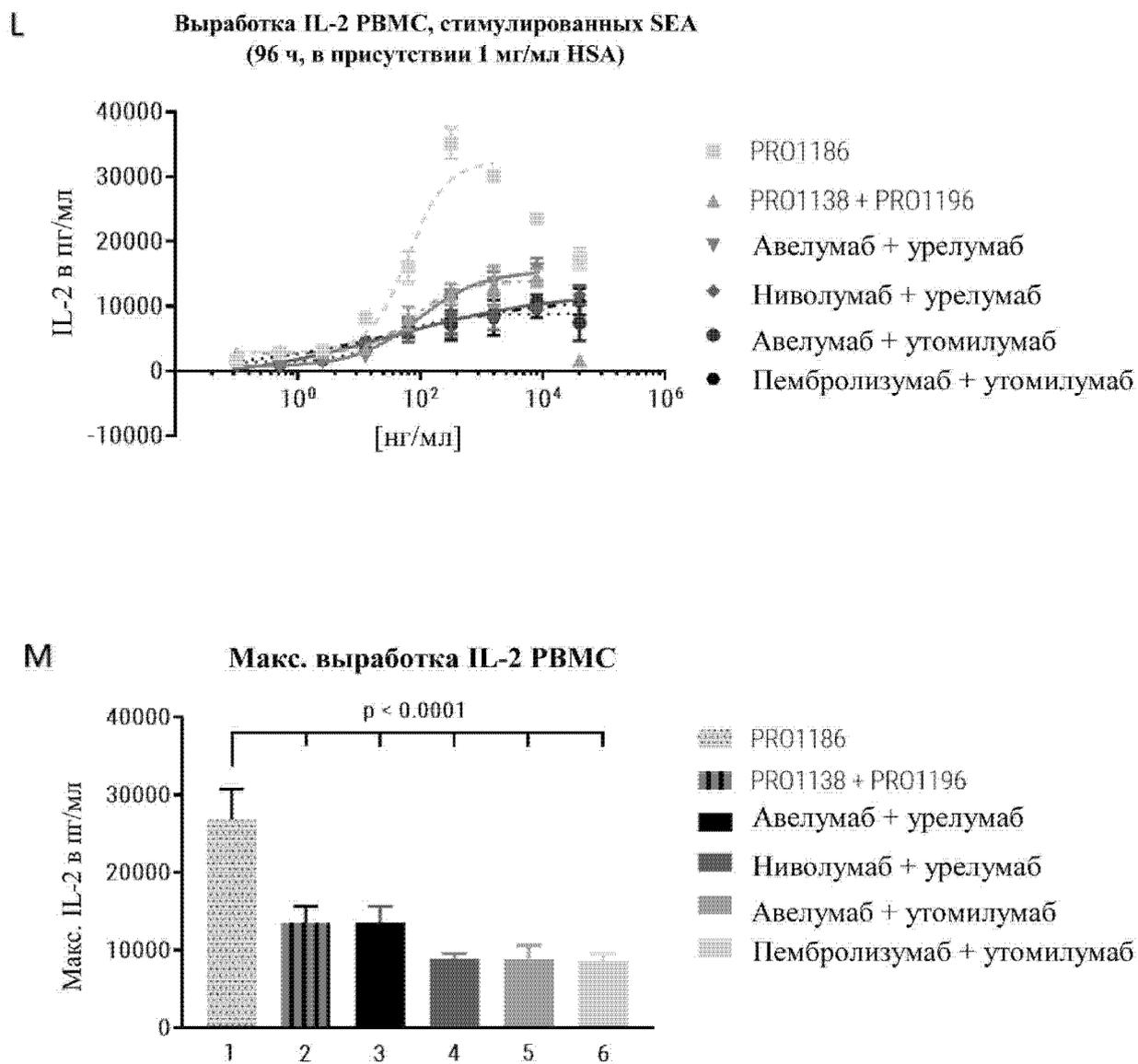
Ж PBMC + CHO-PD-L1
IL-2



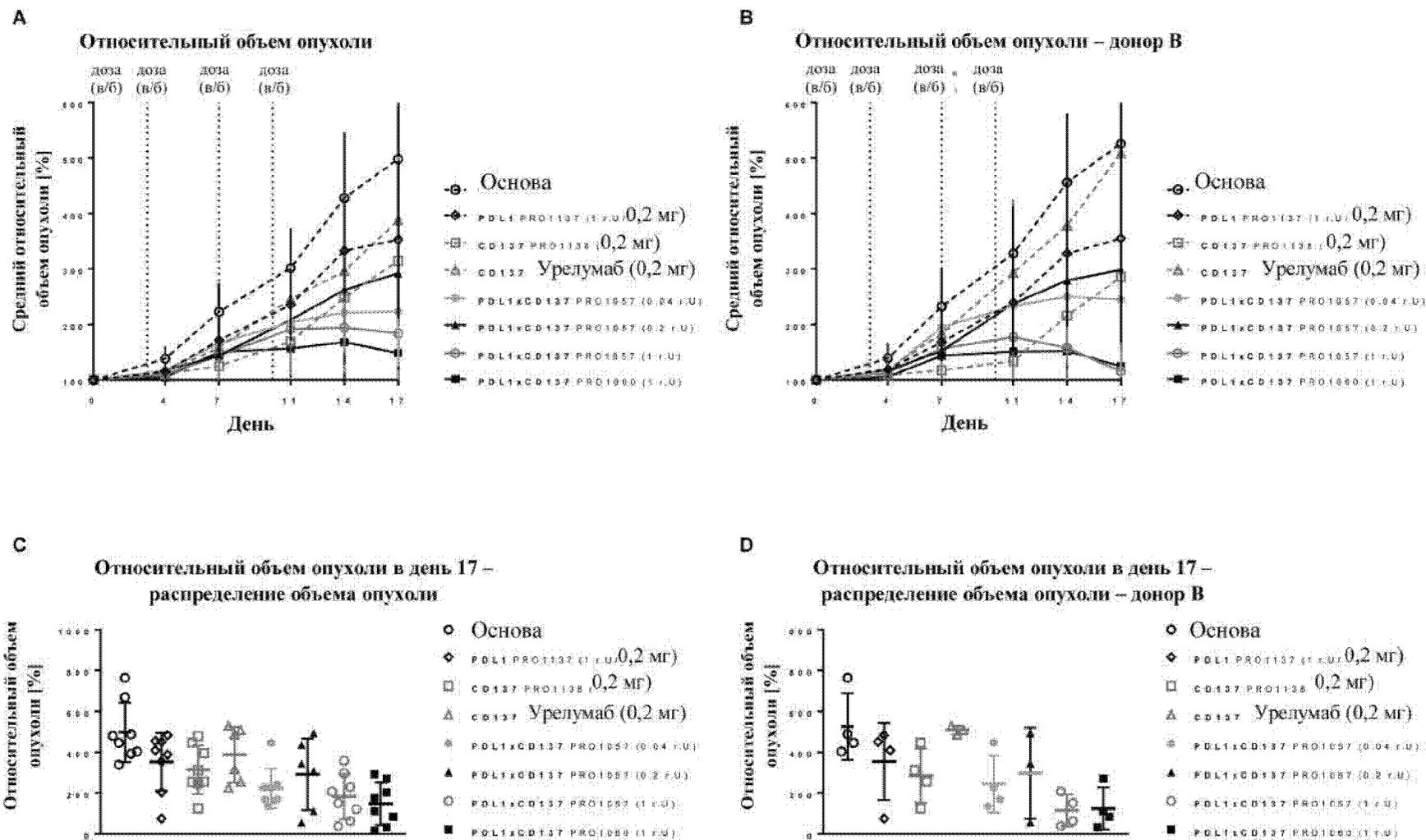
К PBMC + CHO-PD-L1
IFN γ



Фиг. 23 (F)-(K)

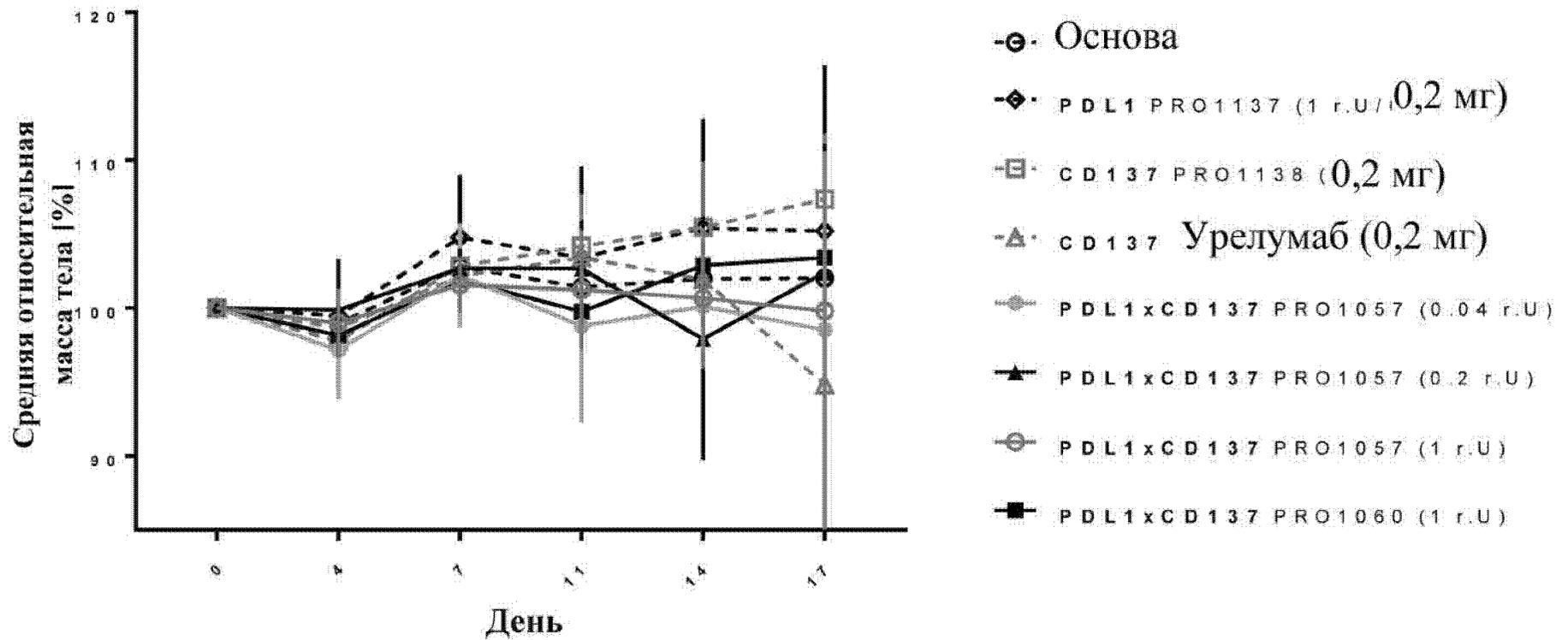


Фиг. 23 (L)-(M)



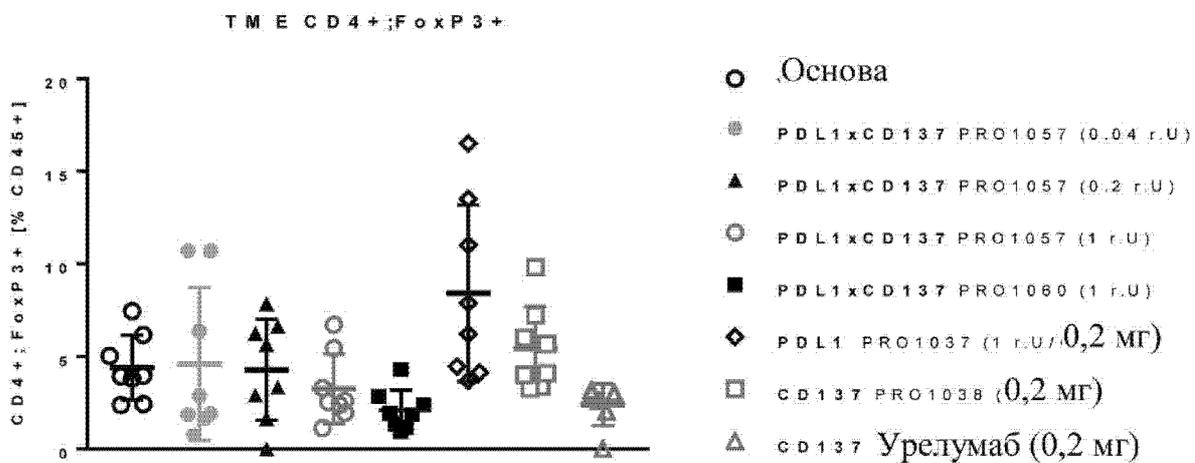
Фиг. 24

Относительная масса тела

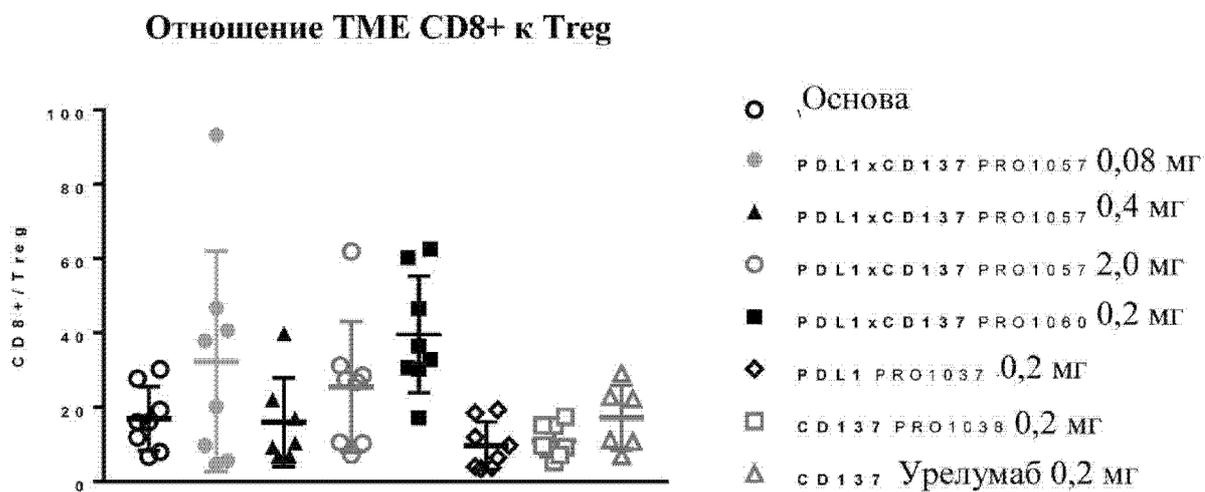


Фиг. 25

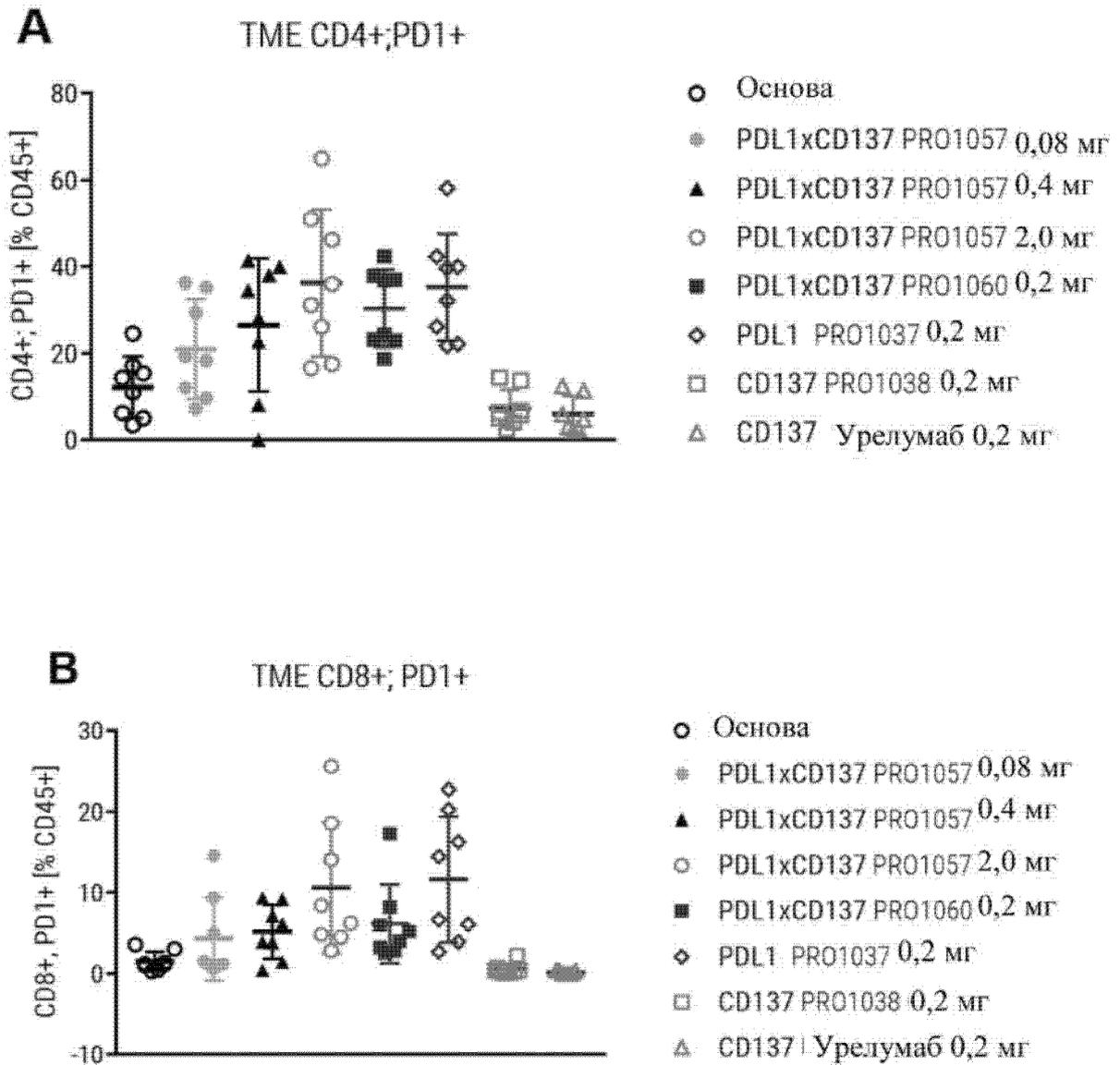
A



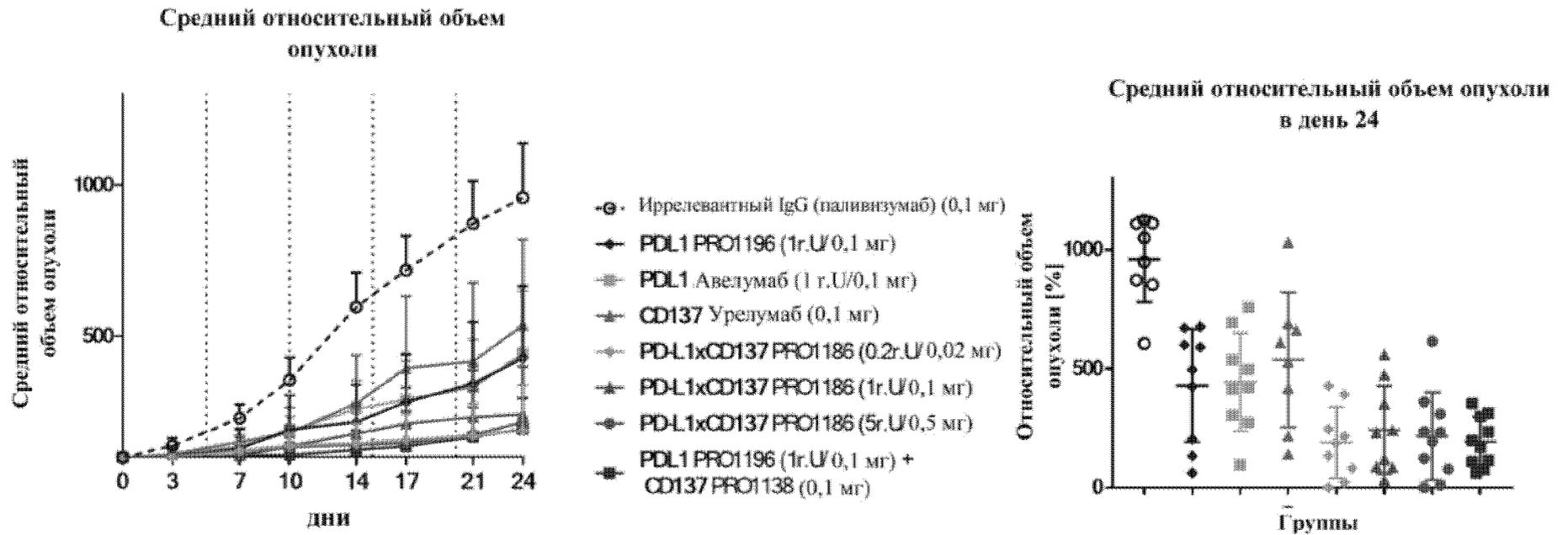
B



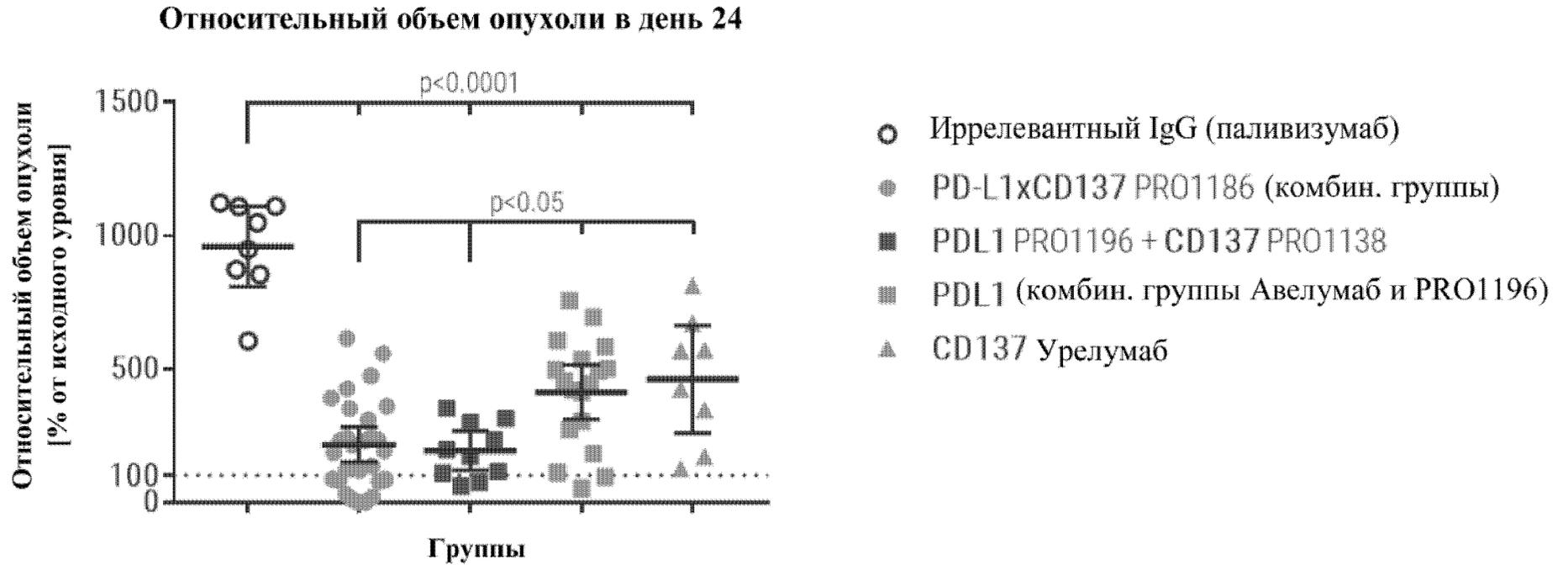
Фиг. 26



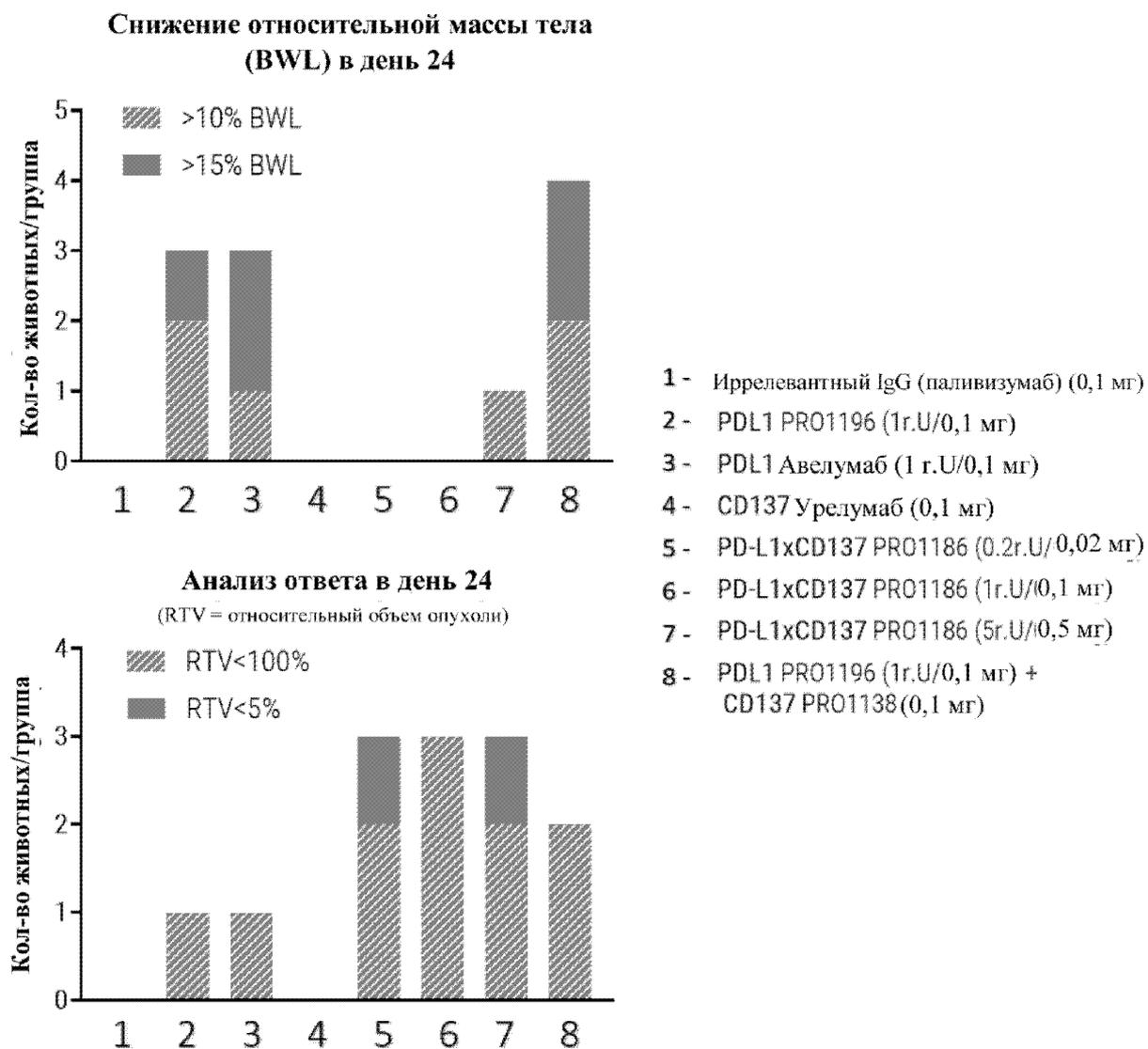
Фиг. 27



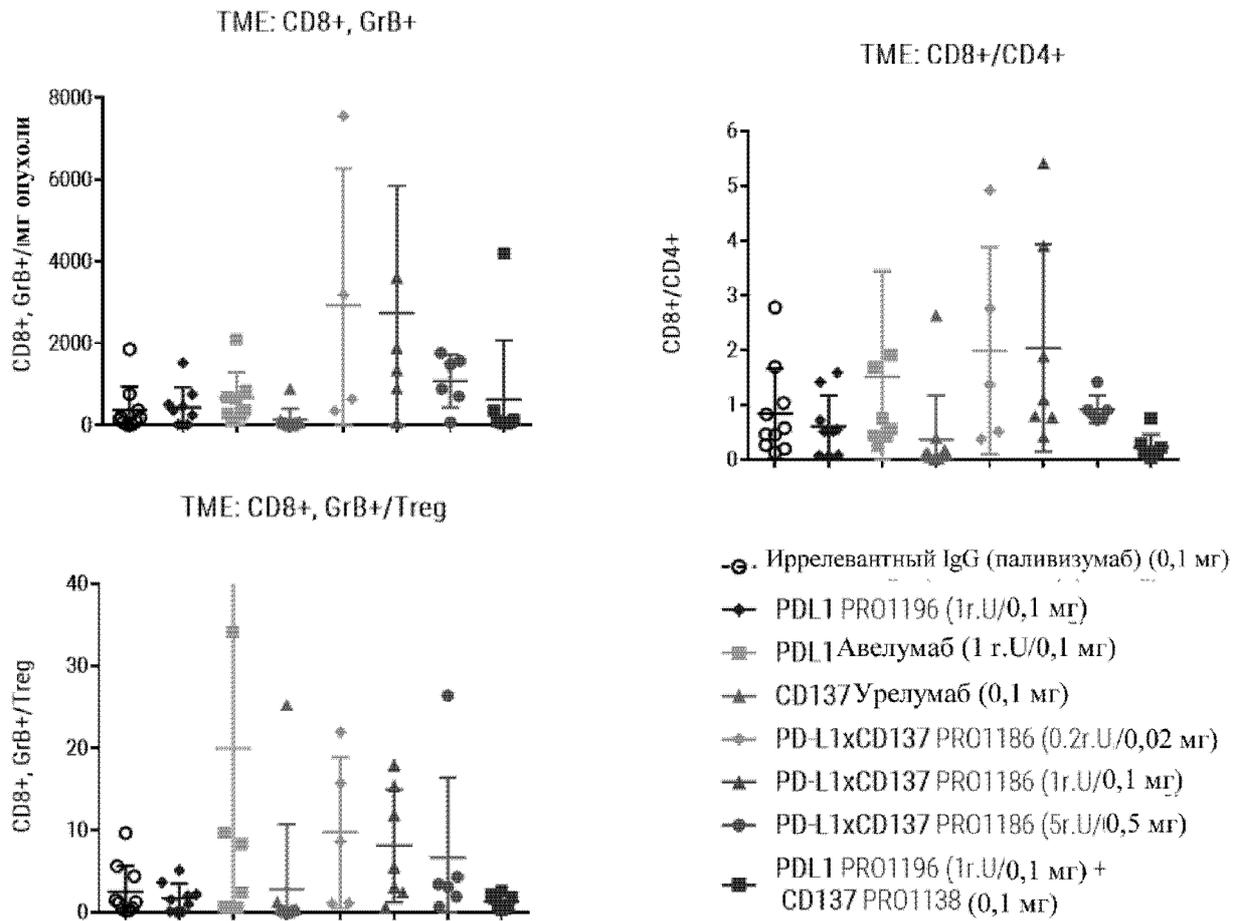
Фиг. 28



Фиг. 29

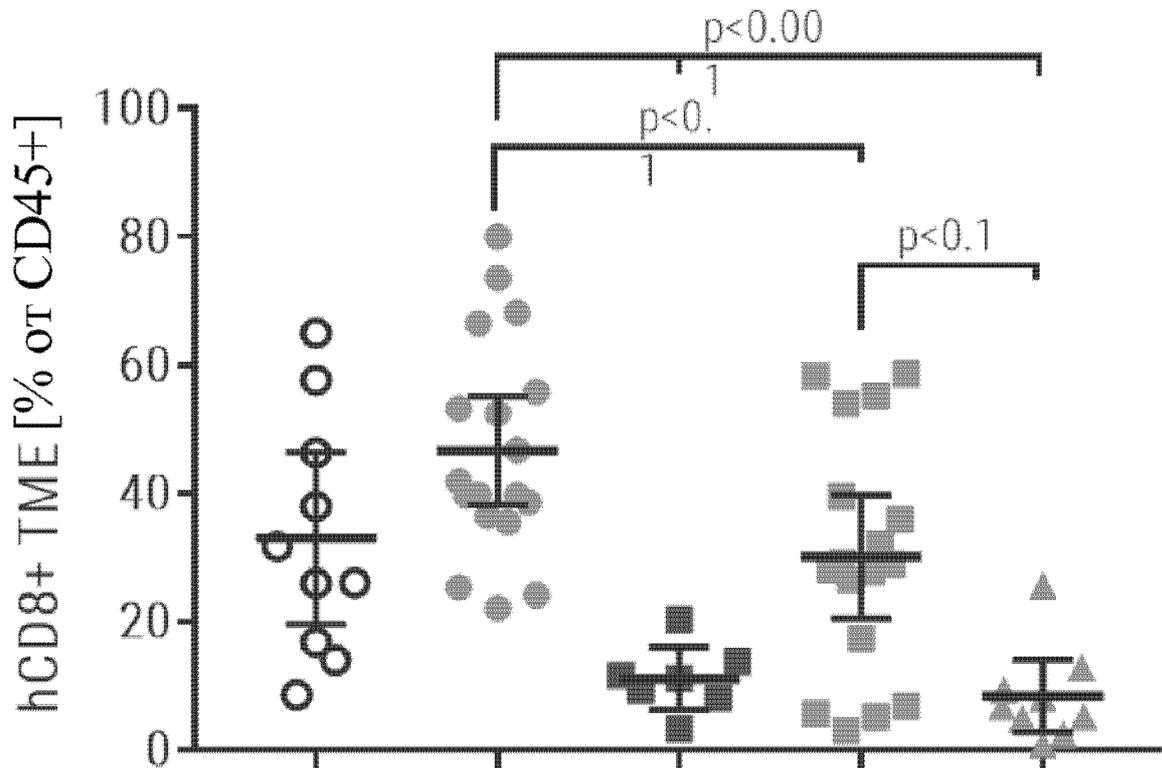


Фиг. 30



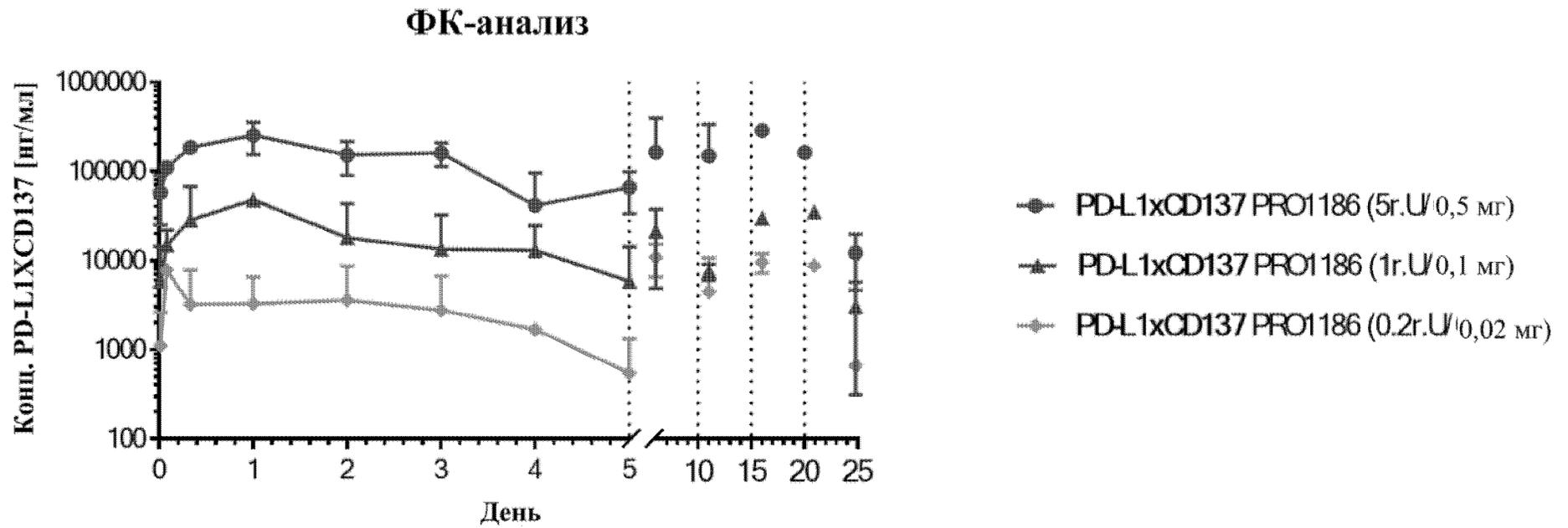
Фиг. 31

Т-клетка CD8+ в ТМЕ



- Иррелевантный IgG (паливизумаб)
- PD-L1xCD137 PRO1186 (комбин. группы)
- PDL1 PRO1196 + CD137 PRO1138
- PDL1(комбин. группы Авелумаб и PRO1196)
- ▲ CD137 Урелумаб

Фиг. 32



Фиг. 33