

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092497** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.06.16

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

(22) Дата подачи заявки
2019.04.17

(54) **АНТИ-CD27 И АНТИ-PD-L1 АНТИТЕЛА И БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ**

(31) 62/658,899; 62/826,091

(32) 2018.04.17; 2019.03.29

(33) US

(86) PCT/US2019/027897

(87) WO 2019/204462 2019.10.24

(88) 2019.12.26

(71) Заявитель:

**СЕЛЛДЕКС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)**

(72) Изобретатель:

**Келлер Тибор, Голдстейн Джоел,
Витале Лаура А., Хе Лижен (US)**

(74) Представитель:

Квашнин В.П. (RU)

(57) Настоящее изобретение обеспечивает новые анти-CD27 и анти-PD-L1 антитела и их связывающие домены, а также биспецифические конструкции и анти-CD27 связывающий домен, связанный с анти-PD-L1 связывающим доменом. Настоящее изобретение также обеспечивает способы стимуляции Т-клеточной активности, способы индукции или усиления иммунного ответа и способы лечения заболевания или состояния (например, рака) путем введения биспецифических конструкций, антител или их антигенсвязывающих фрагментов или композиций, описанных в настоящем документе, пациенту, нуждающемуся в этом.

**202092497
A1**

202092497

A1

АНТИ-CD27 И АНТИ-PD-L1 АНТИТЕЛА И БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОНСТРУКЦИИ

Описание

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/658899, поданной 17 апреля 2018 г., и по предварительной заявке на патент США № 62/826091, поданной 29 марта 2019 г. Содержание вышеупомянутой заявки включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники

Взаимодействия между Т-клетками и антигенпрезентирующими клетками включают множество дополнительных молекул, которые способствуют возникновению иммунного ответа. Одной из таких молекул является CD27, которая связывает CD70 и принадлежит к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухолей (TNF-R) (Ranheim, E.A. et al. (1995) *Blood*, 85 (12): 3556-65). CD27 обычно существует в виде гликозилированного трансмембранного белка типа I, часто в форме гомодимеров с дисульфидным мостиком, связывающим два мономера. Дисульфидный мостик находится во внеклеточном домене рядом с мембраной (Camerini et al. (1991) *J. Immunol.*, 147: 3165-69). CD27 также может экспрессироваться в растворимой форме (см., например, van Oers, MH et al. (1993) *Blood* 82 (11): 3430-6 и Loenen, WA et al. (1992) *Eur. J. Immunol.*, 22: 447). Поперечное сшивание антигена CD27 на Т-клетках обеспечивает костимулирующий сигнал, который вместе со сшиванием Т-клеточного рецептора может индуцировать пролиферацию Т-клеток и активацию клеточного иммунитета.

CD27 экспрессируется на зрелых тимоцитах, на большинстве CD4⁺ и CD8⁺ Т-

клетках периферической крови, естественных клетках-киллерах и В-клетках (Kobata, T. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(24):11249-53). CD27 также высоко экспрессируется на В-клеточных неходжкинских лимфомах и В-клеточных хронических лимфоцитарных лейкозах (Ranheim, E.A. et al. (1995) *Blood*, 85 (12): 3556-65). Кроме того, повышенные уровни растворимого белка CD27 были идентифицированы в сыворотках или участках активности заболевания при паразитарной инфекции, цитомегаловирусной (CMV) инфекции, саркоидозе, рассеянном склерозе и В-клеточном хроническом лимфоцитарном лейкозе (Loenen, W.A. et al. (1992) *Eur. J. Immunol*, 22:447).

Лиганд запрограммированной смерти 1 (PD-L1) представляет собой трансмембранный белок массой 40 кДа типа 1, который, как предполагается, играет важную роль в подавлении иммунной системы во время определенных событий, таких как беременность, тканевые аллотрансплантаты, аутоиммунное заболевание и другие болезненные состояния, такие как гепатит. Обычно иммунная система реагирует на чужеродные антигены, которые связаны с экзогенными или эндогенными сигналами опасности, что запускает пролиферацию антиген-специфичных CD8 + Т-клеток и/или CD4 + хелперных клеток. Связывание PD-L1 с PD-1 передает тормозной сигнал, который снижает пролиферацию этих Т-клеток, а также может индуцировать апоптоз, который дополнительно опосредуется более низкой регуляцией гена Bcl-2. PD-L1 присутствует в большом количестве при различных раковых опухолях человека (Dong et al. (2002) *Nat. Med.* 8: 787-9). Взаимодействие между PD-1 и PD L1 приводит к уменьшению лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, уменьшению пролиферации, опосредованной рецепторами Т-клеток, и уклонению раковых клеток от иммунного надзора (Dong et al. (2003) *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank et al. (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi et al. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100). Подавление иммунитета можно обратить, ингибируя локальное взаимодействие PD-1 с PD-L1, и эффект является аддитивным, когда взаимодействие PD-1 с PD-L2 также блокируется (Iwai et al. (2002) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 99:12293-7; Brown et al. (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66).

Несмотря на достижения в области мультимодальной терапии, в данной области существует потребность в новых и улучшенных терапевтических средствах для лечения состояний или заболеваний (например, при которых желательна стимуляция иммунного ответа). Соответственно, задачей настоящего изобретения является обеспечение улучшенных способов лечения субъектов с такими состояниями или заболеваниями (например, раком).

Сущность изобретения

Обеспечиваются новые анти-CD27 и анти-PD-L1 антитела, и их связывающие домены, а также биспецифические конструкции и мультиспецифические конструкции, содержащие анти-CD27 связывающий домен, связанный с анти-PD-L1 связывающим доменом. Также обеспечиваются способы стимуляции Т-клеточной активности, способы индукции или усиления иммунного ответа, и способы лечения заболеваний или состояний (*например*, рака) путем введения биспецифических или мультиспецифических конструкций, антител, или их антиген-связывающих фрагментов, или композиций, описанных в настоящем документе, пациенту, нуждающемуся в этом.

Примерное анти-CD27 антитело представляет собой антитело 3C2 как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его связывающий домен содержит CDR или переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела 3C2. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи антитела 3C2, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:17, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи антитела 3C2, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:18. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их

консервативные модификации последовательности. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:17. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:18. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:17 и SEQ ID NO:18, соответственно.

Другое примерное анти-CD27 антитело представляет собой антитело 2B3 как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его связывающий домен содержит CDR или переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела 2B3. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи антитела 2B3, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:19, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи антитела 2B3, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:20. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO: 10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:19. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:20. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменные участки тяжелой и легкой

цепи, имеющие аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:20, соответственно.

Примерное анти-PD-L1 антитело представляет собой антитело 7H7 как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен содержит CDR или переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела 7H7. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи антитела 7H7, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:77, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи антитела 7H7, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:78. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:29, 30, и 31, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно, или их консервативные модификации последовательности. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:77. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:77. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:77 и SEQ ID NO:78, соответственно.

Другое примерное анти-PD-L1 антитело представляет собой антитело 1B3 как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен содержит CDR или переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела 1B3. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1,

CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи антитела 1B3, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:79, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи антитела 1B3, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:80. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:35, 36, и 37, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно, или их консервативные модификации последовательности. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:79. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:80. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:79 и SEQ ID NO:80, соответственно.

Другое примерное анти-PD-L1 антитело представляет собой антитело 3B6 как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен содержит CDR или переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела 3B6. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи антитела 3B6, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:81, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи антитела 3B6, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:82. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:41, 42, и 43, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие

последовательности, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно, или их консервативные модификации последовательности. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:81. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:82. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:81 и SEQ ID NO:82, соответственно.

Другое примерное анти-PD-L1 антитело представляет собой антитело 8B1 как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен содержит CDR или переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела 8B1. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи антитела 8B1, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:83, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи антитела 8B1, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:84. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:47, 48, и 49, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно, или их консервативные модификации последовательности. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:83. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:84. Согласно другому варианту осуществления, антитело

или его связывающий домен содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:83 и SEQ ID NO:84, соответственно.

Другое примерное анти-PD-L1 антитело представляет собой антитело 4A3 как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен содержит CDR или переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела 4A3. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи антитела 4A3, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:85, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи антитела 4A3, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:86. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:53, 54, и 55, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно, или их консервативные модификации последовательности. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:85. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:86. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:85 и SEQ ID NO:86, соответственно.

Другое примерное анти-PD-L1 антитело представляет собой антитело 9H9 как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен содержит CDR или переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела 9H9. Согласно другому варианту

осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи антитела 9H9, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:87, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи антитела 9H9, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:88. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно, или их консервативные модификации последовательности. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:87. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:88. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:87 и SEQ ID NO:88, соответственно.

Согласно одному варианту осуществления, участки CDR1, 2 и/или 3 связывающих доменов анти-C27 или анти-PD-L1, описанных в настоящем документе, могут содержать точные аминокислотные последовательности как у антител 3C2, 2B3, 7H7, 1B3, 3B6, 8B1, 4A3 и 9H9, как раскрыто в настоящем документе. Согласно другому варианту осуществления, антитела содержат производные точных последовательностей CDR антител 3C2, 2B3, 7H7, 1B3, 3B6, 8B1, 4A3 и 9H9, которые все еще сохраняют способность эффективно связываться либо с CD27, либо с PD-L1. Такие модификации аминокислотных последовательностей могут включать одно или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, или 6) добавлений, делеций или замещений аминокислот, например, консервативные модификации последовательности.

Согласно другому варианту осуществления, анти-C27 или анти-PD-L1 связывающие домены, описанные в настоящем документе, могут состоять из одного или более CDR, которые например, на 90%, 95%, 98% или 99.5% идентичны одному или более CDR антител 3C2, 2B3, 7H7, 1B3, 3B6, 8B1, 4A3 и 9H9. Диапазоны, промежуточные между вышеуказанными значениями, *например*, CDR, которые на 90-95%, 95-98%, или 98-100% идентичны одной или более из вышеуказанных последовательностей, также охватываются настоящим изобретением.

Последовательности антител также могут представлять собой консенсусные последовательности нескольких антител. Например, согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1 переменного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из консенсусной последовательности: (T,S)(S,Y,H)WMS (SEQ ID NO:167). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR2 переменного участка тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:168. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR3 переменного участка тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:169. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1 переменного участка легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:170. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR2 переменного участка легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:171. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR3 переменного участка легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:172.

Последовательности, по существу идентичные анти-C27 и/или анти-PD-L1 связывающим доменам, описанным в настоящем документе (например, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны вышеуказанным последовательностям), также охватываются настоящим изобретением. Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, SEQ ID NO: 19, или последовательность, которая на по меньшей

мере 90% идентична ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям).

Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична им (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78,

или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям).

Анти-CD27 и/или анти-PD-L1 антитела или их связывающие домены, которые конкурируют за связывание с любым из антител или их связывающих доменов,

описанных в настоящем документе, или которые связываются с тем же самым эпитопом, что и любое из антител или их связывающих доменов, описанных в настоящем документе, также являются подходящими для применения и охватываются настоящим изобретением. Например, согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его связывающий домен конкурирует за связывание с CD27 с антителом 3C2 и/или антителом 2B3, как описано в настоящем документе. Например, как описано в Примере 28, антитела согласно настоящему изобретению (например, антитело 2B3) связываются с одним или более остатками аминокислот 80-95 ECD человеческого CD27 (SEQ ID NO: 183), например, одним или более остатками аминокислот 85-89, например, аминокислотами 85, 87, 88, и/или 89 ECD человеческого CD27 (SEQ ID NO: 183).

Согласно другому варианту осуществления, антитела связываются с ECD дикого типа человеческого CD27, но не с мутированным вариантом ECD, имеющим аминокислотные замещения при одном или более положениях аминокислотных остатков 85-89 (например, A85S, R87A, N88A, и/или G89A) ECD человеческого CD27 (SEQ ID NO: 183). Например, анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, связывается с ECD дикого типа человеческого CD27 (SEQ ID NO: 183), но не связывается с мутированным вариантом ECD дикого типа человеческого CD27, имеющим следующие аминокислотные замещения: A85S, R87A, N88A, и G89A.

Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело или связывающий домен связывается с тем же самым эпитопом на CD27, что и антитело 3C2 и/или антитело 2B3, как описано в настоящем документе. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или связывающий домен конкурирует за связывание с PD-L1 с антителом 7H7, 1B3, 3B6, 8B1, 4A3 и/или 9H9, как описано в настоящем документе. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или связывающий домен связывается с тем же самым эпитопом на PD-L1, что и антитело 7H7, 1B3, 3B6, 8B1, 4A3 и/или 9H9, как описано в настоящем документе.

Согласно одному аспекту обеспечивается биспецифическая конструкция (или мультиспецифическая конструкция), содержащая анти-CD27 связывающий домен, связанный с анти-PD-L1 связывающим доменом, где:

- (i) анти-CD27 связывающий домен содержит:
 - a. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, или
 - b. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и
- (ii) анти-PD-L1 связывающий домен содержит:
 - a. CDR1 переменного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из консенсусной последовательности: (T,S)(S,Y,H)WMS (SEQ ID NO:167);
 - b. CDR2 переменного участка тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:168;
 - c. CDR3 переменного участка тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:169;
 - d. CDR1 переменного участка легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:170;
 - e. CDR2 переменного участка легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:171; и
 - f. CDR3 переменного участка легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:172.

Согласно другому варианту осуществления, обеспечивается биспецифическая конструкция, содержащая анти-CD27 связывающий домен, связанный с анти-PD-L1 связывающим доменом, где:

- (i) анти-CD27 связывающий домен содержит:
 - a. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, или
 - b. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и
- (ii) анти-PD-L1 связывающий домен содержит:
 - a. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им;
 - b. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им;
 - c. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им;
 - d. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ

- ID NO:84, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им;
- e. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им; или
 - f. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и (б) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:29, 30, и 31, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 32, 33, и 34, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18 и (б) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1,2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и

CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:35, 36, и 37, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 38, 39, и 40, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (a) анти-CD27 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18 и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (a) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:41, 42, и 43, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (a) анти-CD27 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18 и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности и (б) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:47, 48, и 49, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18 и (б) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и (б) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:53, 54, и 55, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18 и (б) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 62, 63, и 64, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18 и (б) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации

последовательности, и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:29, 30, и 31, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (a) анти-CD27 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20 и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (a) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:35, 36, и 37, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (a) анти-CD27 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20 и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:41, 42, и 43, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20, и анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:47, 48, и 49, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20 и (b) анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий а CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий а CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:53, 54, и 55, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20 и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации

последовательности, и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий а CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (a) анти-CD27 связывающий домен, содержащий варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20 и (b) анти-PD-L1 связывающий домен содержит варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен и анти-CD27 связывающий домен являются генетически слитыми. Биспецифическая конструкция может представлять собой, например, слитый белок, который может быть получен с помощью генной инженерии с использованием стандартных методов рекомбинантной ДНК для функционального связывания нуклеиновой кислоты, кодирующей анти-CD27 и анти-PD-L1 связывающие домены. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен и анти-CD27 связывающий домен химически конъюгированы.

Например, биспецифическая конструкция может представлять собой химический конъюгат, который может быть получен посредством химического конъюгирования анти-CD27 и анти-PD-L1 связывающих доменов. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен дополнительно содержит константный домен человеческого IgG1. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен связан с С-концом тяжелой цепи анти-PD-L1 связывающего домена. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен представляет собой scFv.

Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен дополнительно содержит константный домен человеческого IgG1. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен связан с С-концом тяжелой цепи анти-CD27 связывающего домена. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен представляет собой scFv.

Согласно конкретному варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

- (i) анти-CD27 scFv содержит:
 - a. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 1, 2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 4, 5, и 6, соответственно, или
 - b. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 10, 11, и 12, соответственно; и
- (ii) анти-PD-L1 антитело содержит:
 - a. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 29, 30, и 31, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 32, 33, и 34, соответственно;
 - b. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 35, 36, и 37, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 38, 39, и 40, соответственно;

- c. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 41, 42, и 43, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно;
- d. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно;
- e. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 53, 54, и 55, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно; или
- f. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 59, 60, и 61, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно; и
- g. константный домен человеческого IgG1.

Согласно другому конкретному варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

- (i) анти-CD27 антитело содержит:
 - a. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или

- b. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 10, 11, и 12, соответственно; и
 - c. константный домен человеческого IgG1; и
- (ii) анти-PD-L1 scFv содержит:
- a. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 29, 30, и 31, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 32, 33, и 34, соответственно;
 - b. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 35, 36, и 37, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 38, 39, и 40, соответственно;
 - c. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 41, 42, и 43, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 44, 45, и 46, соответственно;
 - d. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 50, 51, и 52, соответственно;
 - e. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 53, 54, и 55, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 56, 57, и 58, соответственно; или

- f. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 59, 60, и 61, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

- (i) анти-CD27 scFv содержит:
- a. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18; или
 - b. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и
- (ii) анти-PD-L1 антитело содержит:
- a. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78;
 - b. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80;
 - c. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82;
 - d. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84;

e. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86; или

f. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88; и

g. константный домен человеческого IgG1.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

(i) анти-CD27 антитело содержит:

a. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18; или

b. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и

c. константный домен человеческого IgG1; и

(ii) анти-PD-L1 scFv содержит:

a. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78;

b. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80;

c. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82;

d. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84;

e. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86; или

f. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

(i) анти-CD27 scFv содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно; и

(ii) анти-PD-L1 антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно, и константный домен человеческого IgG1.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

(i) анти-CD27 антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, и константный домен человеческого IgG1; и

- (ii) анти-PD-L1 scFv содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

- (i) анти-CD27 scFv содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и

- (ii) анти-PD-L1 антитело содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84, и константный домен человеческого IgG1.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

- (i) анти-CD27 антитело содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20, и константный домен человеческого IgG1; и

- (ii) анти-PD-L1 scFv содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

(i) анти-CD27 scFv содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как описано в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как описано в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно; и

(ii) анти-PD-L1 антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как описано в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как описано в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно, и константный домен человеческого IgG1.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

(i) анти-CD27 антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как описано в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как описано в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, и константный домен человеческого IgG1; и

(ii) анти-PD-L1 scFv содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как описано в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как описано в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

(i) анти-CD27 scFv содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и

- (ii) анти-PD-L1 антитело содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88, и константный домен человеческого IgG1.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

- (i) анти-CD27 антитело содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20, и константный домен человеческого IgG1; и
- (ii) анти-PD-L1 scFv содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция имеет одно или более из следующих функциональных свойств: индуцирует активацию NF κ B, индуцирует T-клеточную пролиферацию, индуцирует ответ T-клеток CD8, и/или усиливает продукцию ИЛ-2. Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция усиливает продукцию ИЛ-2 в по меньшей мере 1,5 раза (например, в по меньшей мере 2, 2,5, 3, 3,5 или 4 раза) по сравнению с анти-CD27 моноклональным антителом или анти-PD-L1 моноклональным антителом только. Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция индуцирует ответ T-клеток CD8 в по меньшей мере 2 раза сильнее (например, в по меньшей мере 2 раза, 2.5 раза, 3 раза, 3.5 раза, 4 раза, 4.5 раза, 5 раз, 5.5 раз, 6 раз, 6.5 раз, 7 раз, 7.5 раз, 8.0 раз, 8.5 раз или 9 раз) чем анти-CD27 моноклональное антитело только. Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция увеличивает выживаемость на по меньшей мере 1,5 раза дольше (например, на в меньшей мере 1.5 раз, 2.0 раз, 2.5 раз, 3 раз, 3.5 раз, 4 раз, 4.5 раз, или 5 раз) по сравнению с анти-CD27 моноклональным антителом или анти-PD-L1 моноклональным антителом только. Согласно другому

варианту осуществления, биспецифическая конструкция уменьшает массу опухоли в по меньшей мере 1,5 раза (например, на по меньшей мере 1.5 раз, 2.0 раз, 2.5 раз, 3 раз, 3.5 раз, 4 раз, 4.5 раз, или 5 раз) по сравнению с анти-CD27 моноклональными антителами или анти-PD-L1 моноклональными антителами самими по себе или в комбинации. Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция увеличивает Т-клеточную продукцию на по меньшей мере 1,5 раза (например, на по меньшей мере 1.5 раз, 2.0 раз, 2.5 раз, 3 раз, 3.5 раз, 4 раз, 4.5 раз, 5 раз, 5.5 раз, 6 раз, 6.5 раз, 7 раз, 7.5 раз, 8.0 раз, 8.5 раз, или 9 раз) по сравнению с анти-CD27 моноклональными антителами или анти-PD-L1 моноклональными антителами самими по себе или в комбинации.

Согласно определенным вариантам осуществления, биспецифические конструкции, описанные в настоящем документе, проявляют синергетические эффекты (*например*, при усилении иммунных ответов *in vivo*) по сравнению с применением анти-CD27 связывающих доменов и анти-PD-L1 связывающих доменов в комбинации (*т.е.* совместное введение несвязанных антител).

Согласно другому аспекту обеспечиваются новые анти-CD27 антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые содержат любой из анти-CD27 связывающих доменов, описанных в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (*например*, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям).

Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного

участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им.

Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, имеет одно или более из следующих функциональных свойств: индуцирует или усиливает Т-клеточный иммунный ответ, блокирует связывание sCD70 с CD27 (например, частично или полностью), индуцирует активацию NFκB, индуцирует Т-клеточную пролиферацию, связывается с человеческим CD27 с равновесной константой диссоциации K_d , равной 10^{-9} М или менее, или, альтернативно, с равновесной константой ассоциации K_a , равной 10^{+9} М⁻¹ или более, индуцирует специфическую комплемент-опосредованную цитотоксичность (CDC) CD27-экспрессирующих клеток, индуцирует антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC)-специфический лизис CD27-экспрессирующих клеток, индуцирует или усиливает антиген-специфические иммунные ответы *in vivo* в комбинации с вакциной или эндогенным антигеном, индуцирует или усиливает антиген-специфические TH1 иммунные ответы *in vivo* в комбинации с вакциной или эндогенным антигеном, индуцирует или усиливает антиген-специфическую Т-клеточную пролиферацию или активацию *in vivo* в комбинации с вакциной или эндогенным антигеном; и/или индуцирует или усиливает Т-клеточную активность при комбинации с одновременной, отдельной или последовательной активацией TCR.

Согласно другому аспекту обеспечивается биспецифическая конструкция, где биспецифическая конструкция содержит одно из анти-CD27 антител, описанных в настоящем документе, связанное с анти-PD-L1 связывающим доменом. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен выбран из группы, включающей:

- a. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 29, 30, и 31, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно;
- b. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 35, 36, и 37, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно;
- c. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 41, 42, и 43, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно;
- d. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно;
- e. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 53, 54, и 55, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно; и
- f. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 59, 60, и 61, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен выбран из группы, включающей: (а) переменный участок тяжелой цепи,

содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78; (b) переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80; (c) переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82; (d) переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84; (e) переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86; и (f) переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88. Согласно конкретному варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен представляет собой scFv.

Согласно определенным вариантам осуществления, биспецифические конструкции, описанные в настоящем документе, проявляют синергетические эффекты (например, при усилении иммунных ответов *in vivo*) по сравнению с применением анти-CD27 связывающих доменов и анти-PD-L1 связывающих доменов в комбинации (т.е. совместное введение несвязанных антител).

Согласно другому аспекту обеспечиваются новые анти-PD-L1 антитела или их антиген-связывающие фрагменты, которые содержат любой из анти-PD-L1 связывающих доменов, описанных в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:29, 30, и 31, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его

антиген-связывающий фрагмент, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:35, 36, и 37, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:41, 42, и 43, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:47, 48, и 49, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:53, 54, и 55, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID

NO:56, 57, и 58, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям).

Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, имеет одно или более из следующих функциональных свойств: (а) блокирует связывание PD1 с PD-L1 (например, частично или полностью), (b) индуцирует активацию пути NFAT и/или (с) индуцирует смешанный лимфоцитарный ответ.

Согласно другому аспекту обеспечивается биспецифическая конструкция, где биспецифическая конструкция содержит одно из анти-PD-L1 антител или его антиген-связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, связанное с анти-CD27 связывающим доменом. Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен содержит анти-CD27 антитело, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен содержит антитело, содержащее

вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-C27 связывающий домен содержит анти-CD27 антитело, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8 и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-C27 связывающий домен содержит анти-CD27 антитело, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям). Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен дополнительно содержит константный домен человеческого IgG1.

Согласно определенным вариантам осуществления, биспецифические конструкции, описанные в настоящем документе, проявляют синергетические эффекты (например, при усилении иммунных ответов *in vivo*) по сравнению с применением анти-CD27 связывающих доменов и анти-PD-L1 связывающих доменов в комбинации (т.е. совместное введение несвязанных антител).

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к композициям, включающим любое из биспецифических конструкций (мультиспецифических конструкций), антител, или их антиген-связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Также обеспечиваются наборы, содержащие любое из биспецифических конструкций (мультиспецифических конструкций), антител, или их антиген-связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, и инструкции по применению.

Согласно другому объекту также обеспечиваются выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие связывающие домены, антитела или их антиген-связывающие фрагменты, и биспецифические или мультиспецифические конструкции, описанные в настоящем документе, а также экспрессионные векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты, и клетки-хозяева, содержащие такие экспрессионные векторы. Согласно другому варианту осуществления обеспечивается молекула нуклеиновой кислоты, содержащая любое из связывающих доменов, антител или их антиген-связывающих фрагментов, или биспецифические конструкции, описанные в настоящем документе. Согласно другому варианту осуществления, молекула нуклеиновой кислоты находится в форме экспрессионного вектора. Согласно другому варианту осуществления, молекула нуклеиновой кислоты находится в форме экспрессионного вектора, который экспрессирует связывающий домен, антитело или его антиген-связывающий домен, или биспецифическую конструкцию, при введении субъекту *in vivo*.

Согласно одному варианту осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую переменный участок антитела, где переменный участок антитела содержит аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:17, 18, 19, 20, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, или аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90% идентичную им (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную одной или более из вышеуказанных последовательностей). Согласно другому варианту осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:25, 26, 27, 28, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, или нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную им (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную одной или более из вышеуказанных последовательностей).

Согласно другому варианту осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую переменные

участки тяжелой и легкой цепи антитела, где переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела содержат аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:17 и 18, SEQ ID NO:19 и 20, SEQ ID NO:77 и 78, SEQ ID NO:79 и 80, SEQ ID NO:81 и 82, SEQ ID NO: 83 и 84, SEQ ID NO:85 и 86, или SEQ ID NO:87 и 88, соответственно, или аминокислотные последовательности, на по меньшей мере 90% идентичные им (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичные вышеуказанным последовательностям).

Согласно другому аспекту обеспечиваются способы стимуляции активности Т-клеток, которые включают контактирование Т-клеток с любым из антител или их антиген-связывающих фрагментов, биспецифических конструкций, мультиспецифических конструкций или композиций, описанных в настоящем документе. Стимуляция активности Т-клеток может включать, например, стимуляцию продукции IFN-гамма.

Согласно еще одному аспекту обеспечиваются способы индукции или усиления иммунного ответа (например, против антигена) у субъекта, включающие введение субъекту любого из антител или их антиген-связывающих фрагментов, биспецифических конструкций, мультиспецифических конструкций или композиций, описанных в настоящем документе. в количестве, эффективном для индукции или усиления иммунного ответа у субъекта (например, против антигена).

Согласно дополнительному аспекту обеспечиваются способы лечения состояния или заболевания у субъекта, причем способ включает введение субъекту любого из антител или их антиген-связывающих фрагментов, биспецифических конструкций, мультиспецифических конструкций или композиций, описанных в настоящем документе, в количестве, эффективном для лечения состояния или заболевания.

Согласно другому аспекту обеспечиваются способы лечения состояния или заболевания у субъекта, где способ включает введение субъекту любого из анти-

CD27-антител или их антиген-связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, в комбинации с любым из анти-PD-L1-антител или их антиген-связывающих фрагментов, описанные в настоящем документе. Например, согласно одному варианту осуществления:

- (i) анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент выбрано из группы, включающей: (a) анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, и (b) анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно; и
- (ii) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент выбрано из группы, включающей: (a) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 29, 30, и 31, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно; (b) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 35, 36, и 37, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно; (c) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 41, 42, и 43, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно; (d) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой

цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно; (e) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 53, 54, и 55, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно; и (f) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 59, 60, и 61, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления,

- (i) анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент выбрано из группы, включающей: (a) анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18 и (b) анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее SEQ ID NO:19, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и
- (ii) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент выбрано из группы, включающей: (a) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78; (b) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80; (c) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82; (d) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и варибельный участок легкой цепи,

содержащий SEQ ID NO:84; (e) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86; и (f) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, вводят отдельно. Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент вводят последовательно. Например, анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, может быть введен первым с последующим (например, непосредственно сразу за) введением анти-PD-L1 антитела или его антиген-связывающего фрагмента, или наоборот. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, вводят вместе. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, вводят одновременно. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, вводят одновременно в одном составе. Альтернативно, анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, составлены для отдельного введения и вводятся одновременно или последовательно. Такое одновременное или последовательное введение предпочтительно приводит к тому, что оба антитела одновременно присутствуют у подлежащих лечению пациентов.

Согласно определенным вариантам осуществления, введение любого из анти-CD27 антител или их антиген-связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, в комбинации с любым из анти-PD-L1 антител, или их антиген-

связывающими фрагментами, описанными в настоящем документе, приводит к синергетическим эффектам (*например*, при усилении иммунных ответов *in vivo*) по сравнению с применением любого антитела самого по себе.

Субъектом может быть, например, субъект, который страдает состоянием или заболеванием, при котором желательна стимуляция иммунного ответа. Согласно одному варианту осуществления, состоянием или заболеванием, при котором желательна стимуляция иммунного ответа, является рак. Способ индукции или усиления иммунного ответа (*например*, против антигена) у субъекта может дополнительно включать введение субъекту антигена. Предпочтительные антигены для совместного введения с антителами или их антиген-связывающими фрагментами, биспецифическими конструкциями, мультиспецифическими конструкциями или композициями, описанными в настоящем документе, представляют собой опухолевые антигены.

Краткое описание чертежей

На Фиг. 1 приведен график, показывающий связывание CD27 антител 2B3 и 3C2 с рекомбинантным человеческим CD27, как функцию от концентрации антитела.

На Фиг. 2 приведен график, показывающий связывание CD27 антител 2B3 и 3C2 с рекомбинантным CD27 яванских макаков.

На Фиг. 3 приведен график, показывающий высокий уровень связывания CD27 антител 2B3 и 3C2 с клетками Ramos, экспрессирующими CD27 на их поверхности.

На Фиг. 4 приведен график, показывающий высокий уровень связывания CD27 антител 2B3 и 3C2 с Т-клетками.

На Фиг. 5 приведен график, показывающий, что антитела 2B3 и 3C2 значительно блокируют связывание CD70 с CD27.

На Фиг. 6 приведен график, показывающий, что антитела 2B3 и индуцируют значительную активацию NFκB как функция от концентрации антитела.

На Фиг. 7 приведен график, показывающий, что антитела 2B3 и 3C2 увеличивают пролиферацию Т-клеток.

На Фиг. 8 приведен график, показывающий, что анти-PD-L1 антитела связываются с человеческим PD-L1 как функция от концентрации антитела.

На Фиг. 9 приведен график, показывающий связывание анти-PD-L1 антител с рекомбинантным PD-L1 яванских макаков.

На Фиг. 10 приведен график, показывающий, что анти-PD-L1 антитела значительно блокируют связывание PD-L1 с PD1 как функция от концентрации антитела.

На Фиг. 11 приведен график, показывающий высокий уровень связывания анти-PD-L1 антител с клетками, которые экспрессируют PD-L1 как функцию от концентрации антитела.

На Фиг. 12 приведен график, показывающий высокий уровень связывания анти-PD-L1 антител с человеческими дендритными клетками как функцию от концентрации антитела.

На Фиг. 13 приведен график, показывающий, что анти-PD-L1 антитела блокируют PD1/PD-L1 взаимодействие между клетками, приводящее к активации пути NFAT.

На Фиг. 14 приведен график, показывающий, что анти-PD-L1 антитела индуцируют смешанный лимфоцитарный ответ как функцию от концентрации антитела.

На Фиг. 15А приведен иллюстративный экспрессионный ДНК вектор, содержащий анти-CD27 легкую цепь, анти-CD27 тяжелую цепь и с-терминальный анти-PD-L1 одноцепочечный (VL + VH) пептид.

На Фиг. 15В показан белок биспецифического антитела CD27/PD-L1, где анти-PD-L1 антитело связано с анти-CD27 scFv.

На Фиг. 15С показан белок биспецифического антитела CD27/PD-L1, где анти-CD27 антитело связано с анти-PD-L1 scFv.

На Фиг. 15D приведена таблица иллюстративных анти-CD27/анти-PD-L1 биспецифических конструкций.

На Фиг. 15Е показана характеристика биспецифического антитела CDX-527 посредством ВЭЖХ и гель-электрофореза.

На Фиг.16 приведен график, показывающий связывание биспецифических конструкций анти-CD27/анти-PD-L1 (BsAbs) с CD27 и PD-L1 с применением двухфакторный анализ ELISA.

На Фиг.17 приведен график, показывающий повышенную активацию NFκB, индуцированную анти-CD27/анти-PD-L1 биспецифическими конструкциями по сравнению с антителами 1F5 или 2B3 самими по себе.

На Фиг. 18 приведен график, показывающий, что биспецифические конструкции анти-CD27/анти-PD-L1 блокируют PD1/PD-L1 взаимодействие и индуцируют активацию пути NFAT как функцию от концентрации антитела.

На Фиг. 19 приведен график, показывающий, что анти-CD27/анти-PD-L1 биспецифические конструкции увеличивают продукцию, секрецию ИЛ-2 в смешанной лимфоцитарной реакции по сравнению с антителами AbX (известное анти-PD-L1 моноклональное антитело), 8B1 или 9H9 самими по себе.

На Фиг. 20А и 20В приведены графики, показывающие, что анти-CD27/анти-PD-L1 биспецифическая конструкция (*например*, CD27xAbX) индуцирует более высокий CD8 Т-клеточный ответ по сравнению с CD27 моноклональным антителом самим по себе.

На Фиг. 21 приведена кривая Каплана-Мейера, показывающая улучшение выживаемости мышей, получавших биспецифическую конструкцию (*например*, CD27xAbX), по сравнению с антителами к CD27 и PD-L1, вводимыми отдельно или в комбинации на мышинной модели опухоли.

На Фиг. 22А приведен график, показывающий снижение массы опухоли у мышей, получавших биспецифическую конструкцию (*например*, CD27xAbX), по сравнению с антителами к CD27 и PD-L1, вводимыми по отдельности или в комбинации. На Фиг. 22В приведен график, показывающий повышенный процент CD8 Т-клеток у мышей, получавших биспецифическую конструкцию (*например*, CD27xAbX), по сравнению с антителами к CD27 и PD-L1, вводимыми отдельно или в комбинации. Фигура 22С представляет собой график, показывающий повышенный процент CD4 Т-клеток у мышей, получавших биспецифическую конструкцию (*например*, CD27xAbX), по сравнению с антителами к CD27 и PD-L1, вводимыми по отдельности или в комбинации. На Фиг. 22D приведен график, показывающий повышенное количество активированных Т-лимфоцитов CD8 у мышей, получавших биспецифическую конструкцию (*например*, CD27xAbX), по сравнению с антителами к CD27 и PD-L1, вводимыми по отдельности или в комбинации.

На Фиг. 23А и 23В приведены графики, показывающие анти-CD27 Ab (*например*, CDX-1127), повышающе регулирующие экспрессию PD-L1 в опухолевых клетках и интерфелирующих опухоль клетках.

На Фиг. 24 приведен график, показывающий связывание анти-CD27/анти-PD-L1 биспецифической конструкции CDX-527 с CD27 и PD-L1 с применением двухфакторный анализ ELISA.

На Фиг. 25 приведены графики, показывающие повышенную активацию NFκB, индуцированную анти-CD27/анти-PD-L1 биспецифической конструкцией CDX-527, по сравнению с антителами 1F5 или 2B3 самими по себе (график слева), а также в присутствии растворимого FcγR1 (график справа).

На Фиг. 26 приведен график, показывающий повышенную продукцию/секрецию ИЛ-2 в смешанной лимфоцитарной реакции посредством анти-CD27/анти-PD-L1 биспецифической конструкции CDX-527 по сравнению с антителами 2B3 или 9H9 самими по себе или в комбинации.

На Фиг. 27 приведен график, показывающий повышенную продукцию/секрецию ИЛ-2 в Т-клетках посредством анти-CD27/анти-PD-L1 биспецифической конструкции CDX-527 по сравнению с антителами 2B3 и 9H9 в комбинации.

На Фиг. 28 приведен график, оказывающий уровни в сыворотке CDX-527 в фармакокинетическом исследовании NHP.

На Фиг. 29 приведен график, показывающий повышенную блокаду сигнального пути PD-1 посредством 9H9x2B3 конфигурации по сравнению с 2B3x9H9 конфигурацией.

На Фиг. 30 приведен график, показывающий повышенную активацию Т-клеток посредством 9H9x2B3 конфигурации по сравнению с 2B3x9H9 конфигурацией.

На Фиг. 31 приведен график, показывающий повышенную стимуляцию индуцированного вакциной CD8⁺ Т-клеточного ответа посредством AbXx2B3 по сравнению с 2B3xAbX.

На Фиг. 32 приведен график, показывающий повышенную AbXx2B3 противоопухолевую активность по сравнению с 2B3xAbX.

На Фиг. 33 приведен график, показывающий блокирование связывания PD-L1 с CD80 анти-PD-L1 антителами AbX и 9H9.

На Фиг. 34 приведена последовательность внеклеточного домена (ECD) huCD27 дикого типа и мутированного варианта с замещениями в положениях 85, 87, 88 и 89.

На Фиг. 35 приведен график, показывающий связывание анти-CD27 антитело 2B3 как с huCD27 дикого типа, так и с мутированным huCD27 с последовательностями, как показано на Фиг.34.

На Фиг. 36 приведен график, показывающий улучшенную продукцию (экспрессию) модифицированной 9H9x2B3 (DD) конструкции по сравнению с исходной (немодифицированной) 9H9x2B3 конструкцией.

Подробное описание изобретения

CD27 является важным костимулирующим рецептором, который можно использовать для иммунотерапии с использованием молекул агонистов. CD27 играет ключевую роль в различных иммунологических процессах, включая выживание, активацию и эффекторные функции Т-клеток, а также пролиферацию и цитотоксическую активность естественных киллеров (NK). Эти события происходят в ответ на соответствующее взаимодействие лиганда (CD70) с CD27, что приводит к внутриклеточным сигнальным событиям, которые приводят к активации NF- κ B и экспрессии соответствующих генов. Как и в случае большинства костимулирующих молекул, для эффективной стимуляции Т-клеток либо лигандом, либо агонистическими антителами также требуется одновременная стимуляция через рецептор Т-клеток (TCR).

Большинство молекул агонистов CD27 требуют для своей активности мультимеризации или сшивания. Например, анти-CD27-антитела, которые являются агонистами, перекрестно сшиваются посредством взаимодействия их Fc-доменов с Fc-рецепторами посредством цис- или транс-взаимодействий. In

vitro это также может быть выполнено искусственно с использованием вторичного анти-Ig-антитела или путем адсорбции антитела на твердофазной матрице. Требование взаимодействия с FcR агонистических анти-CD27 антител подразумевает, что активность стимуляции Т-клеток, по меньшей мере частично зависит от количества клеток, экспрессирующих FcR.

Чтобы исключить необходимость во взаимодействии с FcR, были изобретены агонисты CD27, которые 1) устраняют необходимость взаимодействия с рецепторами, отличными от CD27 (в данном документе называемыми гиперсшивающими агентами CD27), или 2) могут обеспечивать перекрестное сшивание посредством взаимодействия альтернативных рецепторов, которые могут быть на разных специфических типах клеток, не экспрессирующих FcR, и такие альтернативные рецепторы могут также обеспечивать дополнительную функцию (в данном документе называемые мультиспецифическими агентами CD27).

Согласно одному аспекту настоящее изобретение обеспечивает биспецифические конструкции (или мультиспецифические конструкции), которые содержат анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, связанные с анти-PD-L1 антителом, или его антиген-связывающим фрагментом. Такие анти-CD27 x анти-PD-L1 биспецифические агенты согласно настоящему изобретению, как было показано в настоящем изобретении, проявляют синергетические эффекты *in vivo*, такие как усиление иммунных параметров и ингибирование роста опухоли, по сравнению с совместным введением анти-CD27 антитела с анти-PD-L1 антителом (см. Примеры 9 и 10).

Для более легкого понимания настоящего изобретения сначала даны определения некоторых терминов. Дополнительные определения приведены в подробном описании.

Определения

Используемый в настоящем документе термин «субъект» включает любого человека или животное, не являющееся человеком. Например, способы и

композиции согласно настоящему изобретению можно использовать для лечения субъекта с иммунным расстройством. Термин «животное, не являющееся человеком» включает всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как нечеловеческие приматы, овцы, собаки, коровы, куры, земноводные, рептилии и т.д.

Используемый в настоящем документе термин «связывающий домен» относится к части белка или антитела, которая содержит аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с антигеном. Связывающий домен включают, но не ограничиваются ими, антитела (например, полноразмерные антитела), а также их антиген-связывающие фрагменты. Связывающий домен придает связывающему агенту его специфичность и сродство к антигену. Термин также охватывает любой белок, имеющий связывающий домен, который гомологичен или в значительной степени гомологичен иммуноглобулин-связывающему домену. Такие белки могут быть получены из природных источников или частично или полностью произведены синтетическим путем.

«Антитело» относится, согласно одному предпочтительному варианту, к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями, или их антигенсвязывающую часть. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного участка тяжелой цепи (сокращенно обозначенного в настоящем документе VH) и константного участка тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменного участка легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе VL) и константного участка легкой цепи. Константный участок легкой цепи состоит из одного домена CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые участками, определяющими комплементарность (CDR), которые чередуются с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). CDR идентифицированы в настоящем документе по системе Кэбата, если другого не указано. Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в направлении от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3,

CDR3, FR4. Вариабельные участки тяжелой и легкой цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные участки 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.

В настоящем документе термин «антиген-связывающий фрагмент» антитела (или просто «фрагмент антитела») относится к одному или более фрагментам или частям антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, CD27 человека). Такие «фрагменты» содержат, например, от приблизительно 8 до приблизительно 1500 аминокислот в длину, приемлемо от приблизительно 8 до приблизительно 745 аминокислот в длину, приемлемо от приблизительно 8 до приблизительно 300 аминокислот в длину, например, от приблизительно 8 до приблизительно 200 аминокислот в длину или от приблизительно 10 до приблизительно 50 или 100 аминокислот в длину. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть выполнена фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин «антигенсвязывающая часть» антитела, включают (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из VL, VH, доменов CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; (v) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена VH; и (vi) выделенный гипервариабельный участок (CDR); или (vii) комбинацию двух или более выделенных CDR, которые необязательно могут быть соединены синтетическим линкером. Кроме того, несмотря на то, что два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены, используя рекомбинантные способы, с помощью синтетического линкера, который позволяет им формировать одну белковую цепь, в которой участки VL и VH спариваются с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечный Fv (sFv), см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Подразумевается, что такие одноцепочечные антитела также

включены в термин «антигенсвязывающая часть» антитела. Такие фрагменты антител получают с использованием обычных методик, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты подвергают скринингу для определения их полезности тем же способом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие части могут быть получены методами рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

В настоящем документе термин «моноклональное антитело» относится к антителу, которое проявляет единственный вид специфичности связывания и аффинности в отношении конкретного эпитопа. Соответственно, термин «моноклональное антитело человека» относится к антителу, которое проявляет единственный вид специфичности связывания и которое содержит переменные и необязательные константные участки, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения моноклональные антитела человека получают с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного животного, отличного от человека, например, трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, слитую с иммортализованной клеткой.

В настоящем документе термин «рекомбинантное антитело человека» включает все антитела человека, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных средств, такие как (а) антитела, выделенные у животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным для генов иммуноглобулинов человека, или из гибридомы, полученной из такого животного, (б) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (с) антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью любых других средств, которые включают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные участки, в которых используются конкретные

последовательности иммуноглобулинов зародышевой линии человека, кодируемые генами зародышевой линии, но включают последующие перегруппировки и мутации, которые происходят, например, во время созревания антител. Как известно в данной области техники (см., например, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1117-1125), переменный участок содержит антигенсвязывающий домен, который кодируется различными генами, которые перегруппировываются с образованием антитела, специфичного в отношении чужеродного антигена. В дополнение к перегруппировке переменный участок может быть дополнительно модифицирован несколькими изменениями отдельной аминокислоты (называемыми соматической мутацией или гипермутацией) для увеличения аффинности антитела в отношении чужеродного антигена. Константный участок изменится при последующем ответе на антиген (т. е., произойдет переключение изотипа). Следовательно, перегруппированные и содержащие соматические мутации последовательности молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи иммуноглобулина в ответ на антиген, могут не быть идентичны последовательностям исходных молекул нуклеиновых кислот, но, в качестве альтернативы, будут по существу идентичны или сходны с ними (т. е., имеют по меньшей мере 80% идентичность).

Термин «антитело человека» включает антитела, содержащие переменные и константные участки (если они присутствуют) из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека согласно настоящему изобретению могут содержать остатки аминокислот, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-специфичного мутагеза в условиях *in vitro* или путем соматической мутации в условиях *in vivo*) (см. Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859); Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, и Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Однако термин «антитело человека» не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были

привиты на последовательности каркаса человека (т. е. химерные и гуманизированные антитела).

Термин «выделенное антитело» в контексте настоящего изобретения предназначен для обозначения антитела, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое, например, связывается с человеческим CD27, по существу не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от человеческого CD27; выделенное антитело, которое связывается с человеческим PD-L1, по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от человеческого PD-L1). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом, может обладать перекрестной реактивностью с одним и тем же антигеном разных видов. Кроме того, выделенное антитело обычно практически не содержит другого клеточного материала и/или химических веществ.

Термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к сайту на антигене, с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы могут быть образованы как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, сближенных при сворачивании белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные при сворачивании белка в третичную структуру, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения того, какие эпитопы связаны данным антителом (т. е., картирование эпитопов), хорошо известны в данной области техники и включают, например, количественные исследования с помощью иммуноблоттинга и иммунопреципитации, в которых перекрывающиеся или смежные пептиды из антигена (*например*, CD27 или PD-L1) испытывают для определения их способности реагировать с данным антителом (*например*, анти-CD27 или анти-PD-L1 антитело). Способы определения пространственной конформации эпитопов включают методики,

известные в данной области техники и описанные в настоящем документе, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерный магнитный резонанс (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Термин «антитело, которое связывается с тем же эпитопом», что и другое антитело, предназначен для охвата антител, которые взаимодействуют, т.е. связываются, с тем же структурным участком человеческого CD27, что и эталонное анти-CD27-антитело. «Один и тот же эпитоп», с которым связываются антитела, может быть линейным эпитопом или конформационным эпитопом, образованным в результате третичного складывания антигена.

Термин «конкурирующее антитело» относится к антителу, которое конкурирует за связывание с человеческим CD27 с эталонным анти-CD27 антителом, т.е. конкурентно ингибирует связывание эталонного анти-CD27 антитела с CD27. «Конкурирующее антитело» может связываться с тем же эпитопом на CD27, что и эталонное анти-CD27-антитело, может связываться с перекрывающимся эпитопом или может стерически препятствовать связыванию эталонного анти-CD27-антитела с CD27.

Антитела, которые распознают один и тот же эпитоп или конкурируют за связывание, могут быть идентифицированы с использованием стандартных методик. Подходящие методики включают, например, иммунологические количественные исследования, которые показывают способность одного антитела блокировать связывание другого антитела с целевым антигеном, т.е. количественное исследование конкурентного связывания. Конкурентное связывание определяют в количественном исследовании, в котором испытываемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном, таким как CD27. Известны многочисленные типы количественных исследований конкурентного связывания, например: прямой или непрямой твердофазный радиоиммуноанализ (RIA), прямой или непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (EIA), количественное исследование конкурентного связывания в формате «сэндвич»

(см. Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); прямой твердофазный EIA на основе биотина-авидина (см. Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); прямой твердофазный количественный способ исследований с использованием метки, прямой твердофазный количественный способ исследований с использованием метки в формате «сэндвич» (см. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); прямой твердофазный RIA с использованием метки I-125 (см. Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); прямой твердофазный EIA на основе биотина-авидина (Cheung et al., *Virology* 176:546 (1990)); и прямой RIA с использованием метки (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Как правило, такое количественное исследование включает использование очищенного антигена, связанного с твердой поверхностью, или клеток, несущих любой из немеченого испытываемого иммуноглобулина и меченого эталонного иммуноглобулина. Конкурентное ингибирование измеряют путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками, в присутствии испытываемого иммуноглобулина. Обычно испытываемый иммуноглобулин присутствует в избытке. Обычно, если конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно будет ингибировать специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном по меньшей мере на 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или более.

Другие методики включают, например, способы картирования эпитопов, такие как рентгеновские исследования кристаллов комплексов антиген:антитело, которые обеспечивают атомное разрешение эпитопа. Другие способы позволяют контролировать связывание антитела с фрагментами антигена или мутированными вариантами антигена, при этом потеря связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в последовательности антигена часто рассматривается как указание на эпитопный компонент. Помимо этого, для картирования эпитопов также можно применять вычислительные комбинаторные способы. Эти способы основаны на способности антитела, представляющего интерес, обеспечивать аффинное выделение специфических коротких пептидов из комбинаторных пептидных библиотек фагового дисплея. Пептиды затем рассматривают как средство для установления эпитопа, соответствующего

антителу, использованному для скрининга библиотеки пептидов. Для картирования эпитопов также были разработаны вычислительные алгоритмы, которые, как было показано, картируют конформационные прерывистые эпитопы.

В настоящем документе термин «специфическое связывание», «селективное связывание», «селективно связывается» и «специфически связывается» относится к связыванию антитела с эпитопом на предварительно определенном антигене. Как правило, антитело связывается с равновесной константой диссоциации (KD), составляющей приблизительно менее 10^{-7} М, например, приблизительно менее 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже ниже, определенной методом технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIACORE 2000 (т.е. с использованием рекомбинантного CD27 человека в качестве анализита и антитела в качестве лиганда), и связывается с заранее определенным антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза выше, чем аффинность его связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеином), отличным от заранее определенного антигена или близкородственного антигена. В настоящем документе выражения «антитело, распознающее антиген» и «антитело, специфичное в отношении антигена» используются взаимозаменяемо с термином «антитело, которое специфически связывается с антигеном».

В настоящем документе термин «KD» предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Как правило, антитела человека согласно настоящему изобретению связываются с CD27 с равновесной константой диссоциации (KD), составляющей приблизительно 10^{-8} М или менее, как например менее 10^{-9} М или 10^{-10} М или даже ниже, определенной методом технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIACORE 2000 (т.е. с использованием рекомбинантного CD27 человека в качестве анализита и антитела в качестве лиганда).

В настоящем документе термин «kd» предназначен для обозначения константы скорости обратной реакции для диссоциации антитела из комплекса антитело/антиген.

В настоящем документе термин «ка» предназначен для обозначения константы скорости прямой реакции для ассоциации антитела с антигеном.

В настоящем документе термин «EC50» относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающей части, которая индуцирует ответ как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo*, который составляет 50% от максимального ответа, т. е. величина ответа находится на середине кривой с конечными точками, соответствующими максимальному ответу и ответу в начальных условиях.

В настоящем документе термин «изотип» относится к классу антител (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константного участка тяжелой цепи. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения моноклональное антитело человека согласно настоящему изобретению относится к изотипу IgG1. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения моноклональное антитело человека согласно настоящему изобретению относится к изотипу IgG2.

В настоящем документе термины «ингибирует» или «блокирует» (например, в отношении ингибирования/блокирования связывания CD70 с CD27 и/или PD1 с PD-L1) используются взаимозаменяемо и включают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование. Ингибирование/блокирование предпочтительно снижает или изменяет нормальный уровень или тип активности, который возникает при связывании без ингибирования или блокирования. Также подразумевается, что ингибирование и блокирование включают любое измеримое уменьшение аффинности связывания CD70 при контакте с анти-CD27 антителом, по сравнению с CD70, не вступающим в контакт с анти-CD27 антителом, например, ингибирование связывания CD70 по меньшей мере на приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 антитело ингибирует связывание CD70 по меньшей мере на приблизительно 70%. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело ингибирует связывание CD70 на по меньшей мере 80%. Также подразумевается, что ингибирование и блокирование включают любое измеримое

уменьшение аффинности связывания PD1 при контакте с анти-PD-L1 антителом по сравнению с PD1, не вступающим в контакт с анти-PD-L1 антителом, *например*, ингибирование связывания PD1 по меньшей мере на приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100%. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело ингибирует связывание PD1 по меньшей мере на приблизительно 70%. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело ингибирует связывание PD1 по меньшей мере на приблизительно 80%.

Термин «перекрестная реакция», используемый в данном документе, относится к способности анти-CD27 связывающего домена или анти-PD-L1 связывающего домена согласно настоящему изобретению связываться с CD27 или PD-L1, соответственно, из другого вида. Например, CD27 связывающий домен согласно настоящему изобретению, который связывает человеческий CD27, может также связывать CD27 другого вида. Точно так же анти-PD-L1 связывающий домен согласно настоящему изобретению, который связывает человеческий PD-L1, может также связывать PD-L1 другого вида. В данном контексте перекрестная реактивность измеряется путем определения специфической реактивности с очищенным антигеном в анализах связывания (например, SPR, ELISA) или связывания или иного функционального взаимодействия с клетками, физиологически экспрессирующими CD27. Способы определения перекрестной реактивности включают стандартные анализы связывания, как описано в настоящем документе, например, посредством анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore™ с использованием прибора Biacore™ 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Sweden) или методы проточной цитометрии.

В настоящем документе термин «природный», применительно к объекту, относится к тому факту, что объект может быть обнаружен в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не была преднамеренно модифицирована человеком в лабораторных условиях, является природной.

В объем настоящего изобретения также включены «консервативные модификации последовательности» любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 1-160, т. е., модификации нуклеотидной и аминокислотной последовательностей, которые не устраняют связывание VH и VL последовательностей, кодируемых нуклеотидной последовательностью или содержащих аминокислотную последовательность, с антигеном. Такие консервативные модификации последовательности включают консервативные замены нуклеотидов и аминокислот, а также добавления и делеции нуклеотидов и аминокислот. Например, модификации могут быть введены в последовательности, представленные в SEQ ID NO: 1-160, с помощью стандартных методик, известных в данной области техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредуемый мутагенез. Консервативные замены аминокислот включают те, в которых остаток аминокислоты заменен остатком аминокислоты, имеющим сходную боковую цепь. Семейства остатков аминокислот, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области техники. Такие семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), с кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), с незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), с неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), с бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Следовательно, предсказанный остаток заменимой аминокислоты в антителе к CD27 предпочтительно заменен другим остатком аминокислоты из этого же семейства боковых цепей. Способы выявления консервативных замен нуклеотидов и аминокислот, которые не устраняют связывание антигена, хорошо известны в данной области техники (см., например, Brummell et al., *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); и Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

Согласно определенным вариантам осуществления, консервативные модификации аминокислотной последовательности относятся к самое большее 1,

2, 3, 4 или 5 консервативным аминокислотным замещениям в CDR последовательностях, описанных в настоящем документе. Например, каждая такая CDR может содержать до 5 консервативных аминокислотных замен, например, до (т.е. не более чем) 4 консервативных аминокислотных замен, например, до (т.е. не более чем) 3 консервативных аминокислотных замен, например, до (т.е. не более чем) 2 консервативных аминокислотных замен, или не более 1 консервативной аминокислотной замены.

Альтернативно, согласно другому варианту осуществления, мутации могут быть введены случайным образом вдоль всей или части кодирующей последовательности анти-CD27 или анти-PD-L1 связывающего домена, например, посредством мутагенеза насыщения, и полученные модифицированные анти-CD27 или анти-PD-L1 антитела могут быть проверены на связывающую активность.

В случае нуклеиновых кислот термин «существенная гомология» указывает на то, что две нуклеиновые кислоты, или их специально выделенные последовательности, при оптимальном выравнивании и сравнении, являются идентичными, с соответствующими вставками или делециями нуклеотидов, в отношении по меньшей мере приблизительно 80% нуклеотидов, обычно в отношении по меньшей мере от приблизительно 90% до 95% нуклеотидов и более предпочтительно в отношении по меньшей мере от приблизительно 98% до 99,5% нуклеотидов. В другом варианте значительная гомология существует, если сегменты будут гибридизоваться в селективных условиях гибридизации с комплементарным партнером цепи.

Для аминокислот термин «по существу гомологичные» указывает на то, что две аминокислотные последовательности или их обозначенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении идентичны с соответствующими вставками или делециями аминокислот по меньшей мере примерно в отношении 80% аминокислот, обычно по меньшей мере от примерно 90% до 95% и более предпочтительно по меньшей мере от примерно 98% до 99% или 99,5% аминокислот.

Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от количества идентичных положений, присутствующих в последовательностях (т. е. % гомологии = количество идентичных положений/общее количество положений×100), с учетом количества пропусков и длины каждого пропуска, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма, описанного в приведенных ниже неограничивающих примерах.

Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен с использованием программы GAP в программном пакете GCG (доступен по веб-адресу <http://www.gcg.com>) с использованием матрицы NWSgapdna.CMP, штрафа за введение пробела 40, 50, 60, 70 или 80 и штрафа за продолжение пробела 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями также может быть определен с использованием алгоритма E. Meyers and W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), который был встроен в программу ALIGN (версия 2.0) с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за продолжение пробела 12 и штрафа за введение пробела 4. Помимо этого процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Needleman и Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), который был встроен в программу GAP в программном пакете GCG (доступен по веб-адресу <http://www.gcg.com>), используя матрицу Blossum 62 или матрицу PAM250, и штраф за введение пробела 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штраф за увеличение пробела 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Последовательности нуклеиновых кислот и белков согласно настоящему изобретению можно далее использовать в качестве «последовательности для запроса» для выполнения поиска по общедоступным базам данных, например, для выявления родственных последовательностей. Такие поиски могут быть выполнены с использованием программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиски нуклеотидов в BLAST могут быть

выполнены с помощью программы NBLAST, оценка = 100, длина слова = 12 для получения нуклеотидных последовательностей, идентичных молекулам нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Поиск белка в BLAST может быть выполнен с помощью программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, идентичных молекулам белка согласно настоящему изобретению. Чтобы получить выравнивания с пробелами для целей сравнения можно применять Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. При применении программ BLAST и Gapped BLAST могут быть использованы параметры по умолчанию для соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Анти-CD27 антитела и их связывающие домены

Настоящее изобретение обеспечивает новые анти-CD27 антитела и их связывающие домены. Термин «CD27» (также называемый «молекула CD27», «рецептор CD27L», «S1521», «антиген активации Т-клеток CD27», «TNFRSF7», «MGC20393», «суперсемейство рецепторов фактора некроза опухоли, член 7», «антиген активации Т-клеток S152» «Tr55», «член 7 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли», «антиген CD27» и «антиген активации Т-клеток CD27») относится к рецептору, который является членом суперсемейства TNF-рецепторов, которое связывается с лигандом CD70. CD27 необходим для генерации и длительного поддержания Т-клеточного иммунитета и играет ключевую роль в регулировании активации В-клеток и синтеза иммуноглобулинов. Термин «CD27» включает любые варианты или изоформы CD27, которые естественным образом экспрессируются клетками (например, человеческий CD27, депонированный в GENBANK® с номером доступа AAN12160.1, как изложено в SEQ ID NO: 173). Соответственно, CD27 связывающие домены согласно настоящему изобретению могут перекрестно реагировать с CD27 других видов, кроме человека. Альтернативно, CD27 связывающий домен может быть специфичным для человеческого CD27 и не проявлять перекрестной реактивности с другими видами. CD27 или его любые варианты и изоформы могут быть либо выделены из клеток или тканей, которые

их экспрессируют в природе, либо могут быть получены рекомбинантным путем с использованием методов, хорошо известных в данной области техники и/или описанных в настоящем документе. Предпочтительно, чтобы CD27 связывающий домен были нацелены на человеческий CD27, который имеет нормальную модель гликозилирования.

Термин “CD70” (также называемый как “CD70 молекула”, “CD27L”, “CD27LG”, “TNFSF7,” “член 7 суперсемейства факторов (лигандов) некроза опухоли,” “CD27 лиганд,” “CD70 антиген,” “поверхностный антиген CD70,” “член 7 суперсемейства лигандов факторов некроза опухоли,” “Ki-24 антиген,” и “CD27-L”) относится к лиганду для CD27 (см, например, Bowman MR *et al.*, *J. Immunol.* 1994 Feb 15;152(4):1756-61). CD70 представляет собой трансмембранный белок типа II, который принадлежит к семейству лигандов фактора некроза опухоли (TNF). Это поверхностный антиген на активированных Т- и В-лимфоцитах, который индуцирует пролиферацию костимулированных Т-клеток, усиливает образование цитолитических Т-клеток и способствует активации Т-клеток. Также было высказано предположение, что CD70 играет роль в регулировании активации В-клеток, цитотоксической функции естественных клеток-киллеров и синтезе иммуноглобулинов (Hintzen RQ *et al.*, *J. Immunol.* 1994 Feb 15;152(4):1762-73). Genbank® № доступа NP_001243 относится к аминокислотной последовательности человеческого CD70 (SEQ ID NO:174).

Примерное анти-CD27 антитело представляет собой антитело 3C2 как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его связывающий домен содержит CDR или варибельные участки тяжелой и легкой цепи антитела 3C2. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи антитела 3C2, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:17, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи антитела 3C2, имеющие последовательность как изложено в SEQ ID NO:18. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ

ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:17. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:18. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:17 и SEQ ID NO:18, соответственно.

Другое примерное анти-CD27 антитело представляет собой антитело 2B3 как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его связывающий домен содержит CDR или переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела 2B3. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи антитела 2B3, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:19, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи антитела 3C2, имеющие последовательность как изложено в SEQ ID NO:20. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO: 10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:19. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный

участок легкой цепи, имеющий аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:20. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:20, соответственно.

Также обеспечиваются последовательности, по существу идентичные анти-С27 связывающим доменам, описанным в настоящем изобретении (*например, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичные вышеуказанным последовательностям*). Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, SEQ ID NO: 19 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична ей (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*). Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*). Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*). Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*).

Анти-CD27 антитела и их связывающие домены, которые конкурируют за связывание с любым из анти-CD27 антитела или его связывающего домена, описанными в настоящем документе, или которые связываются с тем же самым эпитопом, что и любое из анти-CD27 антитела или его связывающего домена, описанных в настоящем документе, также обеспечиваются настоящим изобретением и являются подходящими для применения. Например, согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его связывающий домен конкурирует за связывание с CD27 с антителом 3C2 (или антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой и легкой цепи и/или переменных участков тяжелой и легкой цепи, соответствующие антителу 3C2). Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его связывающий домен конкурирует за связывание с CD27 с антителом 2B3 (или антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой и легкой цепи и/или переменных участков тяжелой и легкой цепи, соответствующие антителу 2B3). Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его связывающий домен связывается с тем же эпитопом на CD27 что и антитело 3C2 (или антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой и легкой цепи и/или переменных участков тяжелой и легкой цепи, соответствующие антителу 3C2). Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его связывающий домен связывается с тем же эпитопом на CD27 что и антитело 2B3 (или антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой и легкой цепи и/или переменных участков тяжелой и легкой цепи, соответствующие антителу 2B3).

Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2 и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*).

Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им.

Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, имеет одно или более из следующих функциональных свойств: индуцирует или усиливает Т-клеточный иммунный ответ, блокирует связывание sCD70 с CD27 (*например*, частично или полностью), индуцирует активацию NF- κ B, индуцирует Т-клеточную пролиферацию, связывается с человеческим CD27 с равновесной константой диссоциации K_d , равной 10^{-9} М или менее, или, альтернативно, с равновесной константой ассоциации K_a , равной 10^{+9} М⁻¹ или более, индуцирует специфическую комплемент-опосредованную цитотоксичность (CDC) CD27-экспрессирующих клеток, индуцирует антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC)-специфический лизис CD27-экспрессирующих клеток, индуцирует или усиливает антиген-специфические иммунные ответы *in vivo* в комбинации с вакциной или эндогенным антигеном, индуцирует или усиливает антиген-специфические TH1 иммунные ответы *in vivo* в комбинации с вакциной или эндогенным антигеном, индуцирует или усиливает антиген-специфическую Т-клеточную пролиферацию или активацию *in vivo* в комбинации с вакциной или эндогенным антигеном; и/или индуцирует или усиливает Т-клеточную активность при комбинации с одновременной, отдельной или последовательной активацией TCR.

Анти-PD-L1 антитела и связывающие домены

Настоящее изобретение обеспечивает новые анти-PD-L1 антитела и их связывающие домены. В контексте настоящего изобретения термины «лиганд 1 запрограммированной гибели клеток 1», «PD-L1», «лиганд 1 PDCD1», «лиганд 1 запрограммированной смерти», «гомолог 1 B7», «B7-H1» и «CD274» являются используются взаимозаменяемо и включают варианты, изоформы, видовые гомологи человеческого PD-L1 и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с PD-L1. Полную последовательность PD-L1 можно найти в GenBank № доступа NP_001254635, как изложено в SEQ ID NO: 176.

Лиганд запрограммированной смерти 1 (PD-L1) представляет собой трансмембранный белок массой 40 кДа типа 1, который, как предполагалось, играет важную роль в подавлении иммунной системы во время определенных событий, таких как беременность, тканевые аллотрансплантаты, аутоиммунное заболевание и другие болезненные состояния, такие как гепатит. Обычно иммунная система реагирует на чужеродные антигены, которые связаны с экзогенными или эндогенными сигналами опасности, что запускает пролиферацию антиген-специфичных CD8 + Т-клеток и/или CD4 + хелперных клеток. Связывание PD-L1 с PD-1 передает ингибирующий сигнал, который снижает пролиферацию этих Т-клеток, а также может индуцировать апоптоз, который дополнительно опосредуется более низкой регуляцией гена Bcl-2. В контексте настоящего изобретения термины «запрограммированная смерть 1», «запрограммированная смерть клетки 1», «белок PD-1», «PD-1», «PD1», «PDCD1», «hPD-1» и «hPD-I» используются взаимозаменяемо и включают варианты, изоформы, видовые гомологи человеческого PD-1 и аналоги, имеющие по меньшей мере один общий эпитоп с PD-1. Полную последовательность PD-1 можно найти в GenBank № доступа NP_005009, как изложено в SEQ ID NO:175.

PD-L1 присутствует в большом количестве при различных раковых опухолях человека (Dong et al. (2002) *Nat. Med.* 8: 787-9). Взаимодействие между PD-1 и PD L1 приводит к уменьшению лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, уменьшению пролиферации, опосредованной рецепторами Т-клеток, и уклонению раковых клеток от иммунного надзора (Dong et al. (2003) *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank et al. (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi et al. (2004)

Clin. Cancer Res. 10:5094-100). Подавление иммунитета можно обратить вспять, ингибируя локальное взаимодействие PD-1 с PD-L1, и эффект является аддитивным, когда взаимодействие PD-1 с PD-L2 также блокируется (Iwai *et al.* (2002) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 99:12293-7; Brown *et al.* (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66).

Примерное анти-PD-L1 антитело представляет собой антитело 7H7 как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен содержит CDR или переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела 7H7. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи антитела 7H7, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:77, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи антитела 7H7, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:78. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:29, 30, и 31, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно, или их консервативные модификации последовательности. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:77. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:77. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:77 и SEQ ID NO:78, соответственно.

Примерное анти-PD-L1 антитело представляет собой антитело 1B3 как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1

антитело или его связывающий домен содержит CDR или переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела 1B3. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи антитела 1B3, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:79, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи антитела 1B3, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:80. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:35, 36, и 37, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно, или их консервативные модификации последовательности. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:79. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:80. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:79 и SEQ ID NO:80, соответственно.

Другое примерное анти-PD-L1 антитело представляет собой антитело 3B6 как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен содержит CDR или переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела 3B6. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи антитела 3B6, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:81, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи антитела 3B6, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:82. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1,

CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:41, 42, и 43, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно, или их консервативные модификации последовательности. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:81. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:82. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:81 и SEQ ID NO:82, соответственно.

Другое примерное анти-PD-L1 антитело представляет собой антитело 8B1 как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен содержит CDR или переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела 8B1. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи антитела 8B1, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:83, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи антитела 8B1, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:84. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:47, 48, и 49, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно, или их консервативные модификации последовательности. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:83. Согласно другому варианту

осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:84. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:83 и SEQ ID NO:84, соответственно.

Другое примерное анти-PD-L1 антитело представляет собой антитело 4A3 как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен содержит CDR или переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела 4A3. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи антитела 4A3, имеющего последовательность как изложено в SEQ ID NO:85, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи антитела 4A3, имеющие последовательность как изложено в SEQ ID NO:86. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:53, 54, и 55, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно, или их консервативные модификации последовательности. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:85. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:86. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:85 и SEQ ID NO:86, соответственно.

Другое примерное анти-PD-L1 антитело представляет собой антитело 9H9 как описано в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен содержит CDR или переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела 9H9. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи антитела 9H9, имеющие последовательность как изложено в SEQ ID NO:87, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи антитела 9H9, имеющие последовательность как изложено в SEQ ID NO:88. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно, или их консервативные модификации последовательности. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:87. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:88. Согласно другому варианту осуществления, антитело или его связывающий домен содержит переменные участки тяжелой и легкой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:87 и SEQ ID NO:88, соответственно.

Последовательности антител также могут представлять собой консенсусные последовательности нескольких антител. Например, согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1 переменного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из консенсусной последовательности: (T,S)(S,Y,H)WMS (SEQ ID NO:167). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR2 переменного участка тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:168. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий

домен содержит CDR3 переменного участка тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:169. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1 переменного участка легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:170. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR2 переменного участка легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:171. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR3 переменного участка легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:172.

Настоящим изобретением также охватываются последовательности, по существу идентичные анти-PD-L1 антителу и их связывающим доменам, описанным в настоящем документе (*например, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичные вышеуказанным последовательностям*). Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:87, или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80, или

последовательность на по меньшей мере 90% идентичную им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную ей (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*).

Анти-PD-L1 антитела и их связывающие домены, которые конкурируют за связывание с любым из анти-PD-L1 антител или их связывающих доменов, как описано в настоящем документе, или которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из анти-PD-L1 антител или их связывающих доменов, как описано в настоящем документе, также являются подходящими для применения и обеспечиваются настоящим изобретением. Например, согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен конкурирует за

связывание с PD-L1 с антителом 7H7 (или антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой и легкой цепи и/или переменных участков тяжелой и легкой цепи, соответствующие антителу 7H7). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен связывается с тем же эпитопом на PD-L1 что и антитело 7H7 (или антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой и легкой цепи и/или переменных участков тяжелой и легкой цепи, соответствующие антителу 7H7).

Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен конкурирует за связывание с PD-L1 с антителом 1B3 (или антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой и легкой цепи и/или переменных участков тяжелой и легкой цепи, соответствующие антителу 1B3). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен связывается с тем же эпитопом на PD-L1 что и антитело 1B3 (или антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой и легкой цепи и/или переменных участков тяжелой и легкой цепи, соответствующие антителу 1B3).

Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен конкурирует за связывание с PD-L1 с антителом 3B6 (или антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой и легкой цепи и/или переменных участков тяжелой и легкой цепи, соответствующие антителу 3B6). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен связывается с тем же эпитопом на PD-L1 что и антитело 3B6 (или антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой и легкой цепи и/или переменных участков тяжелой и легкой цепи, соответствующие антителу 3B6).

Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен конкурирует за связывание с PD-L1 с антителом 8B1 (или антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой и легкой цепи и/или переменных участков тяжелой и легкой цепи, соответствующие антителу 8B1). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен связывается с тем же эпитопом на PD-L1 что и антитело 8B1

(или антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой и легкой цепи и/или переменных участков тяжелой и легкой цепи, соответствующие антителу 8B1).

Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен конкурирует за связывание с PD-L1 с антителом 4A3 (или антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой и легкой цепи и/или переменных участков тяжелой и легкой цепи, соответствующие антителу 4A3).

Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен связывается с тем же эпитопом на PD-L1 что и антитело 4A3 (или антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой и легкой цепи и/или переменных участков тяжелой и легкой цепи, соответствующие антителу 4A3).

Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен конкурирует за связывание с PD-L1 с антителом 9H9 (или антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой и легкой цепи и/или переменных участков тяжелой и легкой цепи, соответствующие антителу 9H9).

Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело или его связывающий домен связывается с тем же эпитопом на PD-L1 что и антитело 9H9 (или антителом, имеющим последовательности CDR тяжелой и легкой цепи и/или переменных участков тяжелой и легкой цепи, соответствующие антителу 9H9).

Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен представляет собой анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:29, 30, и 31, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным*

последовательностям). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:35, 36, и 37, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:41, 42, и 43, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:47, 48, и 49, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:53, 54, и

55, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*). Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*).

Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, имеет одно или более из следующих функциональных свойств: (а) блокирует связывание PD1 с PD-L1 (*например, частично или полностью*), (b) индуцирует активацию пути NFAT, и/или (c) индуцирует смешанную лимфоцитарную реакцию.

Биспецифические конструкции

Настоящее изобретение относится к биспецифическим конструкциям, содержащим анти-CD27 связывающий домен, связанный с анти-PD-L1 связывающим доменом. Также обеспечиваются такие биспецифические конструкции, связанные с одним или несколькими дополнительными связывающими агентами с образованием мультиспецифических конструкций.

«Биспецифическая» или «бифункциональная» конструкция представляет собой искусственный гибрид, содержащее две разные пары (например, тяжелой/легкой цепей) связывающего домена и два разных сайта связывания. Биспецифические конструкции могут быть получены различными способами, включая слияние гибридом или соединение фрагментов Fab'. См., например, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

Используемый в настоящем документе термин «связанный» относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Связь также может быть генетической (т.е. рекомбинантно слитой). Такие связи могут быть достигнуты с использованием широкого ряда известных в данной области методов, таких как химическая конъюгация и получение рекомбинантного белка.

Для химического конъюгирования подходящие реагенты и способы известны в данной области техники для связывания двух или более фрагментов, в частности двух или более антител или их фрагментов вместе. Множество связывающих или сшивающих агентов коммерчески доступны и могут применяться для конъюгирования анти-CD27 связывающего домена и анти-PD-L1 связывающего домена. Неограничивающие примеры включают сульфо-SMCC, белок А, карбоимид, дималеимид, дитио-бис-нитробензойную кислоту (DTNB) и N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP). Сульфо-SMCC, SPDP и DTNB являются предпочтительными агентами, причем сульфо-SMCC является особенно предпочтительным. Другие подходящие методики для сшивания компонентов (*например*, связывающих доменов) сшивающими агентами известны в данной области техники. См., *например*, Karpovsky, B. *et al.*, (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, M. A. *et al.*, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 82:8648; Segal, D. M. and Perez, P., Патент США № 4,676,980; и Brennan, M. (1986) *Biotechniques* 4:424.

Для генной инженерии молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие анти-CD27 связывающий домен, могут быть вставлены в соответствующий вектор экспрессии с использованием стандартных методов рекомбинантной ДНК.

Молекула (молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующая анти-PD-L1 связывающий домен, также может быть вставлена в тот же вектор экспрессии, так что она будет функционально связана (например, клонирование в рамке) с CD27 связывающим доменом, что приведет к экспрессионному вектору, кодирующему гибридный белок, который является биспецифической конструкцией. Предпочтительно, анти-PD-L1 связывающий домен оперативно связан с С-концевым участком тяжелой цепи анти-CD27 связывающего домена. Другие подходящие экспрессионные векторы и стратегии клонирования для получения описанных здесь биспецифических конструкций известны в данной области техники.

Для экспрессии биспецифических конструкций в клетках-хозяевах кодирующие участки связывающих доменов комбинируются с клонированным промотором, лидерной последовательностью, инициацией трансляции, лидерной последовательностью, константным участком, 3'-нетранслируемой, полиаденилированной последовательностями и последовательностью терминации транскрипции, последовательностями для формирования конструкций экспрессионных векторов. Эти конструкции можно использовать для экспрессии, например, полноразмерных человеческих антител IgG1к или IgG4. Полные человеческие, гуманизированные и химерные антитела, используемые в описанных в настоящем документе биспецифических конструкциях, также включают антитела IgG2, IgG3, IgE, IgA, IgM и IgD. Подобные плазмиды могут быть сконструированы для экспрессии других изоформ тяжелой цепи или для экспрессии антител, содержащих легкие лямбда-цепи.

После получения экспрессионного вектора, кодирующего биспецифическую конструкцию, биспецифическая конструкция может быть экспрессирована рекомбинантно в клетке-хозяине с использованием стандартных методов трансфекции. Например, согласно одному варианту осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическую конструкцию, можно лигировать в вектор экспрессии, такой как плаزمид для экспрессии у эукариот, такая как система экспрессии на основе GS-гена, раскрытая в WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338841, или другие системы экспрессии, хорошо известные в данной области

техники. Очищенную плазмиду с клонированным геном биспецифической конструкции можно вводить в эукариотические клетки-хозяева, такие как клетки линии CHO или клетки линии NSO или, в другом варианте, другие эукариотические клетки, такие как клетки, полученные из растений, грибковые или дрожжевые клетки. Способ, использованный для введения таких генов, может представлять собой способ, описанный в данной области техники, такой как электропорация, липофектин, липофектамин или другие. После введения экспрессионного вектора в клетки-хозяева, клетки, экспрессирующие биспецифическую конструкцию могут быть выявлены и отобраны. Эти клетки представляют собой трансфектомы, которые затем могут быть подвергнуты амплификации для оценки уровня экспрессии, и их количество может быть увеличено для продукции биспецифических конструкций. Альтернативно, эти клонированные биспецифические конструкции могут быть экспрессированы в других экспрессионных системах, таких как *E. Coli*, или в полных организмах, или могут быть экспрессированы синтетически. Рекомбинантные биспецифические конструкции могут быть выделены и очищены из этих культуральных супернатантов и/или клеток.

Биспецифическая конструкция согласно настоящему изобретению, полученная путем химической конъюгации или генной инженерии, может быть выделена и очищена с использованием одной или нескольких методик очистки белка, хорошо известных в данной области техники. Предпочтительные методы выделения и очистки включают, но не ограничиваются ими, гель-фильтрационную хроматографию, аффинную хроматографию, анионообменную хроматографию и т.п. Особенно предпочтительным методом является гель-фильтрационная хроматография, например, с использованием колонки Superdex 200. Выделенные и очищенные биспецифические конструкции можно оценить с использованием стандартных методов, таких как анализ SDS-PAGE.

Соответственно, согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен и анти-CD27 связывающий домен являются генетически слитыми. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен и анти-CD27 связывающий домен являются химически конъюгированными.

Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен дополнительно содержит константный домен человеческого IgG1. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен связан с С-концом тяжелой цепи анти-PD-L1 связывающего домена. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен представляет собой scFv. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен дополнительно содержит константный домен человеческого IgG1. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен связан с С-концом тяжелой цепи анти-CD27 связывающего домена. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен представляет собой scFv.

Иллюстративные биспецифические конструкции изложены в Таблицах 1-2, где связывающие домены определены посредством последовательностей CDR (Таблица 1) или последовательностей переменного участка (Таблица 2).

Таблица 1: Иллюстративные биспецифические конструкции (CDR)

Биспецифическая конструкция	CD27 Вариабельные CDR тяжелой цепи	CD27 Вариабельные CDR легкой цепи	PD-L1 Вариабельные CDR тяжелой цепи	PD-L1 Вариабельные CDR легкой цепи
2B3x7H7	CDR1: SEQ ID NO:7 CDR2: SEQ ID NO:8 CDR3: SEQ ID NO:9	CDR1: SEQ ID NO:10 CDR2: SEQ ID NO:11 CDR3: SEQ ID NO:12	CDR1: SEQ ID NO:29 CDR2: SEQ ID NO:30 CDR3: SEQ ID NO:31	CDR1: SEQ ID NO:32 CDR2: SEQ ID NO:33 CDR3: SEQ ID NO:34
2B3x1B3	CDR1: SEQ ID NO:7 CDR2: SEQ ID NO:8 CDR3: SEQ ID NO:9	CDR1: SEQ ID NO:10 CDR2: SEQ ID NO:11 CDR3: SEQ ID NO:12	CDR1: SEQ ID NO:35 CDR2: SEQ ID NO:36 CDR3: SEQ ID NO:37	CDR1: SEQ ID NO:38 CDR2: SEQ ID NO:39 CDR3: SEQ ID NO:40
2B3x3B6	CDR1: SEQ ID NO:7 CDR2: SEQ ID NO:8 CDR3: SEQ ID NO:9	CDR1: SEQ ID NO:10 CDR2: SEQ ID NO:11 CDR3: SEQ ID NO:12	CDR1: SEQ ID NO:41 CDR2: SEQ ID NO:42 CDR3: SEQ ID NO:43	CDR1: SEQ ID NO:44 CDR2: SEQ ID NO:45 CDR3: SEQ ID NO:46
2B3x8B1	CDR1: SEQ ID NO:7 CDR2: SEQ ID NO:8 CDR3: SEQ ID NO:9	CDR1: SEQ ID NO:10 CDR2: SEQ ID NO:11 CDR3: SEQ ID NO:12	CDR1: SEQ ID NO:47 CDR2: SEQ ID NO:48 CDR3: SEQ ID NO:49	CDR1: SEQ ID NO:50 CDR2: SEQ ID NO:51 CDR3: SEQ ID NO:52
2B3x4A3	CDR1: SEQ ID NO:7 CDR2: SEQ ID NO:8 CDR3: SEQ ID NO:9	CDR1: SEQ ID NO:10 CDR2: SEQ ID NO:11 CDR3: SEQ ID NO:12	CDR1: SEQ ID NO:53 CDR2: SEQ ID NO:54 CDR3: SEQ ID NO:55	CDR1: SEQ ID NO:56 CDR2: SEQ ID NO:57 CDR3: SEQ ID NO:58
2B3x9H9	CDR1: SEQ ID NO:7 CDR2: SEQ ID NO:8 CDR3: SEQ ID NO:9	CDR1: SEQ ID NO:10 CDR2: SEQ ID NO:11 CDR3: SEQ ID NO:12	CDR1: SEQ ID NO:59 CDR2: SEQ ID NO:60 CDR3: SEQ ID NO:61	CDR1: SEQ ID NO:62 CDR2: SEQ ID NO:63 CDR3: SEQ ID NO:64
3C2x7H7	CDR1: SEQ ID NO:1	CDR1: SEQ ID NO:4	CDR1: SEQ ID NO:29	CDR1: SEQ ID NO:32

Биспецифическая конструкция	<u>CD27</u> Варибельные CDR тяжелой цепи	<u>CD27</u> Варибельные CDR легкой цепи	<u>PD-L1</u> Варибельные CDR тяжелой цепи	<u>PD-L1</u> Варибельные CDR легкой цепи
	CDR2: SEQ ID NO:2 CDR3: SEQ ID NO:3	CDR2: SEQ ID NO:5 CDR3: SEQ ID NO:6	CDR2: SEQ ID NO:30 CDR3: SEQ ID NO:31	CDR2: SEQ ID NO:33 CDR3: SEQ ID NO:34
3C2x1B3	CDR1: SEQ ID NO:1 CDR2: SEQ ID NO:2 CDR3: SEQ ID NO:3	CDR1: SEQ ID NO:4 CDR2: SEQ ID NO:5 CDR3: SEQ ID NO:6	CDR1: SEQ ID NO:35 CDR2: SEQ ID NO:36 CDR3: SEQ ID NO:37	CDR1: SEQ ID NO:38 CDR2: SEQ ID NO:39 CDR3: SEQ ID NO:40
3C2x3B6	CDR1: SEQ ID NO:1 CDR2: SEQ ID NO:2 CDR3: SEQ ID NO:3	CDR1: SEQ ID NO:4 CDR2: SEQ ID NO:5 CDR3: SEQ ID NO:6	CDR1: SEQ ID NO:41 CDR2: SEQ ID NO:42 CDR3: SEQ ID NO:43	CDR1: SEQ ID NO:44 CDR2: SEQ ID NO:45 CDR3: SEQ ID NO:46
3C2x8B1	CDR1: SEQ ID NO:1 CDR2: SEQ ID NO:2 CDR3: SEQ ID NO:3	CDR1: SEQ ID NO:4 CDR2: SEQ ID NO:5 CDR3: SEQ ID NO:6	CDR1: SEQ ID NO:47 CDR2: SEQ ID NO:48 CDR3: SEQ ID NO:49	CDR1: SEQ ID NO:50 CDR2: SEQ ID NO:51 CDR3: SEQ ID NO:52
3C2x4A3	CDR1: SEQ ID NO:1 CDR2: SEQ ID NO:2 CDR3: SEQ ID NO:3	CDR1: SEQ ID NO:4 CDR2: SEQ ID NO:5 CDR3: SEQ ID NO:6	CDR1: SEQ ID NO:53 CDR2: SEQ ID NO:54 CDR3: SEQ ID NO:55	CDR1: SEQ ID NO:56 CDR2: SEQ ID NO:57 CDR3: SEQ ID NO:58
3C2x9H9	CDR1: SEQ ID NO:1 CDR2: SEQ ID NO:2 CDR3: SEQ ID NO:3	CDR1: SEQ ID NO:4 CDR2: SEQ ID NO:5 CDR3: SEQ ID NO:6	CDR1: SEQ ID NO:59 CDR2: SEQ ID NO:60 CDR3: SEQ ID NO:61	CDR1: SEQ ID NO:62 CDR2: SEQ ID NO:63 CDR3: SEQ ID NO:64

Таблица 2: Иллюстративные биспецифические конструкции (VR)

Биспецифические конструкции	<u>CD27</u> Варибельный участок тяжелой цепи	<u>CD27</u> Варибельный участок легкой цепи	<u>PD-L1</u> Варибельный участок тяжелой цепи	<u>PD-L1</u> Варибельный участок легкой цепи
2B3x7H7	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:78
2B3x1B3	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:79	SEQ ID NO:80
2B3x3B6	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:82
2B3x8B1	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:83	SEQ ID NO:84
2B3x4A3	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:86
2B3x9H9	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:88
3C2x7H7	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:78
3C2x1B3	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:79	SEQ ID NO:80
3C2x3B6	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:82
3C2x8B1	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:83	SEQ ID NO:84
3C2x4A3	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:86
3C2x9H9	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:88

Согласно одному варианту осуществления, обеспечивается биспецифическая конструкция, содержащая анти-CD27 связывающий домен, связанный с анти-PD-L1 связывающим доменом, где:

- (i) анти-CD27 связывающий домен содержит:
 - a. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или
 - b. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно; и
- (ii) анти-PD-L1 связывающий домен содержит:
 - a. CDR1 переменного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из консенсусной последовательности: (T,S)(S,Y,H)WMS (SEQ ID NO:167);
 - b. CDR2 переменного участка тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:168;
 - c. CDR3 переменного участка тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:169;
 - d. CDR1 переменного участка легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:170;
 - e. CDR2 переменного участка легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:171; и
 - f. CDR3 переменного участка легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:172.

Согласно другому варианту осуществления, обеспечивается биспецифическая конструкция, содержащая анти-CD27 связывающий домен, связанный с анти-PD-L1 связывающим доменом, где:

- (i) анти-CD27 связывающий домен содержит:
 - a. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как описано в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как описано в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или
 - b. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как описано в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как описано в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно; и
- (ii) анти-PD-L1 связывающий домен содержит:
 - a. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им (*например, на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*);
 - b. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им (*например, на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*);
 - c. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им (*например, на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*);
 - d. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им (*например, на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*);
 - e. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им (*например, на по меньшей мере 95%, 96%, 97%,*

98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям);
или

- f. вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им (*например, на по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*).

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:29, 30, и 31, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 32, 33, и 34, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18 и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1,2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:35, 36, и 37, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3

вариабельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 38, 39, и 40, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18 и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:41, 42, и 43, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18 и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи,

как изложено в SEQ ID NO:47, 48, и 49, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18 и (б) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно; и (б) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:53, 54, и 55, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18 и (б) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно и анти-PD-L1 связывающий

домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 62, 63, и 64, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18 и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:29, 30, и 31, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20 и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как

изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, и анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:35, 36, и 37, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20 и (б) и анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, и анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:41, 42, и 43, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20, и анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (а) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9,

соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:47, 48, и 49, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (a) анти-CD27 связывающий домен, содержащий варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20, и (b) анти-PD-L1 связывающий домен содержит варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (a) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий а CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:53, 54, и 55, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (a) анти-CD27 связывающий домен, содержащий варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20 и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (a) анти-CD27 связывающий домен, содержащий CDR1, CDR2 и CDR3

вариабельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно и (b) анти-PD-L1 связывающий домен, содержащий а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит (a) анти-CD27 связывающий домен, содержащий вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20 и (b) анти-PD-L1 связывающий домен содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

Согласно конкретному варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

- (i) анти-CD27 scFv содержит:
 - a. CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или
 - b. CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельной области легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно; и
- (ii) анти-PD-L1 антитело содержит:

- a. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 29, 30, и 31, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно;
- b. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 35, 36, и 37, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно;
- c. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 41, 42, и 43, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно;
- d. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно;
- e. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 53, 54, и 55, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно; или
- f. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 59, 60, и 61, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно; и
- g. константный домен человеческого IgG1.

Согласно другому конкретному варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

- (i) анти-CD27 антитело содержит:
 - a. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 1, 2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 4, 5, и 6, соответственно, или
 - b. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 10, 11, и 12, соответственно; и
 - c. константный домен человеческого IgG1; и
- (ii) анти-PD-L1 scFv содержит:
 - a. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 29, 30, и 31, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 32, 33, и 34, соответственно;
 - b. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 35, 36, и 37, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 38, 39, и 40, соответственно;
 - c. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 41, 42, и 43, соответственно, и CDR1,

CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно;

- d. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно;
- e. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 53, 54, и 55, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно; или
- f. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 59, 60, и 61, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

- (i) анти-CD27 scFv содержит:
 - a. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18; или
 - b. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и
- (ii) анти-PD-L1 антитело содержит:

- a. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78;
- b. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80;
- c. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82;
- d. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84;
- e. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86; или
- f. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88; и
- g. константный домен человеческого IgG1.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

- (i) анти-CD27 антитело содержит:
 - a. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18; или
 - b. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и

с. константный домен человеческого IgG1; и

- (ii) анти-PD-L1 scFv содержит:
 - а. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78;
 - б. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80;
 - в. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82;
 - г. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84;
 - д. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86; или
 - е. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87 и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

- (i) анти-CD27 scFv содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно; и
- (ii) анти-PD-L1 антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49,

соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно, и константный домен человеческого IgG1.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

- (i) анти-CD27 антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, и константный домен человеческого IgG1; и
- (ii) анти-PD-L1 scFv содержит а CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

- (i) анти-CD27 scFv содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и
- (ii) анти-PD-L1 антитело содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84, и константный домен человеческого IgG1.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

- (i) анти-CD27 антитело содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20, и константный домен человеческого IgG1; и
- (ii) анти-PD-L1 scFv содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

(i) анти-CD27 scFv содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно; и

- (ii) анти-PD-L1 антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно, и константный домен человеческого IgG1.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

- (i) анти-CD27 антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, и константный домен человеческого IgG1; и

(ii) анти-PD-L1 scFv содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

(i) анти-CD27 scFv содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и

(ii) анти-PD-L1 антитело содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88, и константный домен человеческого IgG1.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция содержит анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

(i) анти-CD27 антитело содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20, и константный домен человеческого IgG1; и

(ii) анти-PD-L1 scFv содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

Согласно другому аспекту обеспечивается биспецифическая конструкция, где биспецифическая конструкция содержит одно из анти-CD27 антител или их антиген-связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, связанное

с анти-PD-L1 связывающим доменом. Согласно одному варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен выбран из группы, включающей:

- a. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 29, 30, и 31, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно;
- b. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 35, 36, и 37, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно;
- c. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 41, 42, и 43, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно;
- d. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно;
- e. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 53, 54, и 55, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно; и
- f. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 59, 60, и 61, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен выбран из группы, включающей: (a) переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78; (b) переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80; (c) переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82; (d) переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84; (e) переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86; и (f) переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88. Согласно конкретному варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен дополнительно содержит константный домен человеческого IgG1. Согласно другому варианту осуществления, анти-PD-L1 связывающий домен представляет собой scFv.

Согласно другому аспекту обеспечивается биспецифическая конструкция, где биспецифическая конструкция содержит одно из анти-PD-L1 антител или их антиген-связывающих доменов, описанных в настоящем документе, связанное с анти-CD27 связывающим доменом. Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен содержит анти-CD27 антитело, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен содержит антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*). Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен содержит анти-CD27 антитело, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9,

соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен содержит анти-CD27 антитело, содержащее варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20, или последовательность на по меньшей мере 90% идентичную им (*например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична вышеуказанным последовательностям*). Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен представляет собой scFv. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 связывающий домен дополнительно содержит константный домен человеческого IgG1.

Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция имеет одно или более из следующих функциональных свойств: индуцирует активацию NF κ B, индуцирует Т-клеточную пролиферацию, индуцирует ответ Т-клеток CD8, и/или усиливает продукцию ИЛ-2. Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция усиливает продукцию ИЛ-2 в по меньшей мере 1,5 раза (*например, в по меньшей мере 2, 2,5, 3, 3,5 или 4 раза*) по сравнению с анти-CD27 моноклональным антителом или анти-PD-L1 моноклональным антителом только. Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция индуцирует ответ Т-клеток CD8 в по меньшей мере 2 раза сильнее (*например, в по меньшей мере 2 раза, 2.5 раза, 3 раза, 3.5 раза, 4 раза, 4.5 раза, 5 раз, 5.5 раз, 6 раз, 6.5 раз, 7 раз, 7.5 раз, 8.0 раз, 8.5 раз или 9 раз*) чем анти-CD27 моноклональное антитело само по себе. Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция увеличивает выживаемость на по меньшей мере 1,5 раза (*например, на по меньшей мере 1.5 раз, 2.0 раз, 2.5 раз, 3 раз, 3.5 раз, 4 раз, 4.5 раз, или 5 раз*) дольше по сравнению с анти-CD27 моноклональным антителом или анти-PD-L1 моноклональным антителом только. Согласно другому варианту осуществления, биспецифическая конструкция уменьшает массу опухоли в по меньшей мере 1,5 раза (*например, на по меньшей мере 1.5 раз, 2.0 раз, 2.5 раз, 3 раз, 3.5 раз, 4 раз, 4.5 раз, или 5 раз*) по сравнению с анти-CD27 моноклональными антителами или анти-PD-L1 моноклональными антителами самими по себе или в комбинации. Согласно другому варианту

осуществления, биспецифическая конструкция повышает продукцию Т-клеток на по меньшей мере 1,5 раза (*например, на по меньшей мере 1.5 раз, 2.0 раз, 2.5 раз, 3 раз, 3.5 раз, 4 раз, 4.5 раз, 5 раз, 5.5 раз, 6 раз, 6.5 раз, 7 раз, 7.5 раз, 8.0 раз, 8.5 раз, или 9 раз*) по сравнению с анти-CD27 моноклональными антителами или анти-PD-L1 моноклональными антителами самими по себе или в комбинации.

Согласно определенным вариантам осуществления, биспецифические конструкции, описанные в настоящем документе, проявляют синергетические эффекты (*например, при усилении иммунных ответов *in vivo**) по сравнению с применением анти-CD27 связывающих доменов и анти-PD-L1 связывающих доменов в комбинации (*т.е. при совместном введении несвязанных антител*).

Композиции

Настоящее изобретение также относится к композициям, *например, композиции, содержащей одно или комбинацию любого из связывающих доменов, антител или их антиген-связывающих фрагментов, биспецифических конструкций или мультиспецифических конструкций, описанных в настоящем документе, в составе с носителем (например, фармацевтически приемлемым носителем)*.

В настоящем документе термины «носитель» и «фармацевтически приемлемый носитель» включают любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты и т. п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (*например, путем инъекции или инфузии*). В зависимости от пути введения активное соединение, т. е. антитело, биспецифическая и полиспецифическая молекула, может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение.

Примеры адъювантов, которые можно применять со связывающими доменами, антителами и их антиген-связывающими фрагментами, биспецифическими

конструкциями или мультиспецифическими конструкциями, согласно настоящему изобретению, включают без ограничения к этому: неполный адъювант Фрейнда и полный адъювант Фрейнда (Difco Laboratories, Детройт, Мичиган, США); Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Рэуей, Нью-Джерси, США); AS-2 (SmithKline Beecham, Филадельфия, Пенсильвания, США); соли алюминия, такие как гель гидроксида алюминия (квасцы) или фосфат алюминия; соли кальция, железа или цинка; нерастворимую суспензию ацилированного тирозина; ацилированные сахара; катионно- или анионно-дериватизированные полисахариды; полифосфазены; биоразлагаемые микросферы; цитокины, такие как ГМ-КСФ, интерлейкин-2, -7, -12 и другие подобные факторы; 3Д-МФЛ; олигонуклеотид CpG; и монофосфориллипид А, например, 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А.

Адъюванты МФЛ доступны от Corixa Corporation (Сиэтл, Вашингтон, США, см., например, патенты США №№ 4436727, 4877611, 4866034 и 4912094). CpG-содержащие олигонуклеотиды (в которых динуклеотид CpG не метилирован) хорошо известны и описаны, например, в WO 96/02555, WO 99/33488 и патентах США №№ 6008200 и 5856462. Иммуностимулирующие последовательности ДНК также описаны, например, Sato et al., Science 273:352, 1996.

Другие альтернативные адъюванты включают, например, сапонины, такие как Quil A или его производные, включая QS21 и QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Фрамингем, Массачусетс, США); эскин; дигитонин; или сапонины Gypsophila или Chenopodium quinoa; Montanide ISA 720 (Seppic, Франция); SAF (Chiron, Калифорния, США); ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron); серию адъювантов SBAS (например, SBAS-2 или SBAS-4, доступные от SmithKline Beecham, Риксансар, Бельгия); детокс (энханзин™) (Corixa, Гамильтон, Монтана, США); RC-529 (Corixa, Гамильтон, Монтана, США) и другие аминоксилглюкозаминид-4-фосфаты (AGP); адъюванты на основе простых эфиров полиоксиэтилена, такие как те, которые описаны в WO 99/52549A1; синтетические имидазохинолины, такие как имиквимод [S-26308, R-837] (Harrison, et al., Vaccine 19: 1820-1826, 2001) и резиквимод [S-28463, R-848] (Vasilakos, et al., Cellular immunology 204: 64-74, 2000); основания Шиффа карбониллов и аминов, которые конститутивно

экспрессируются на антигенпрезентирующих клетках и поверхностях Т-клеток, такие как тукарезол (Rhodes, J. et al., *Nature* 377: 71-75, 1995), цитокины, хемокины и костимулирующие молекулы, такие как белок или пептид, включая, например, провоспалительные цитокины, такие как интерферон, ГМ-КСФ, ИЛ-1 альфа, ИЛ-1 бета, TGF-альфа и TGF-бета, индукторы Th1, такие как интерферон-гамма, ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18 и ИЛ-21, индукторы Th2, такие как ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-13 и другие хемокины, и костимулирующие гены, такие как MCP-1, MIP-1 альфа, MIP-1 бета, RANTES, TCA-3, CD80, CD86 и CD40L; иммуностимулирующие агенты, нацеленные на лиганды, такие как CTLA-4 и L-селектин, стимулирующие апоптоз белки и пептиды, такие как Fas; синтетические адъюванты на основе липидов, такие как ваксфектин (Reyes et al., *Vaccine* 19: 3778-3786, 2001), сквален, альфа-токоферол, полисорбат 80, DOPC и холестерин; эндотоксин, [ЛПС], (Beutler, B., *Current Opinion in Microbiology* 3: 23-30, 2000); лиганды, которые запускают Toll-рецепторы для выработки Th1-индуцирующих цитокинов, такие как синтетические микобактериальные липопроотеины, микобактериальный белок р19, пептидогликан, тейхоевая кислота и липид А; и ХТ (холерный токсин, субъединицы А и В) и LT (термолабильный энтеротоксин из *E. coli*, субъединицы А и В), семейства белков теплового шока (HSP) и LLO (листериолизин О, WO 01/72329). Перечисленные и различные другие агонисты Toll-подобного рецептора (TLR) описаны, например, в Kanzler et al, *Nature Medicine*, May 2007, Vol 13, No 5.

«Фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, которая сохраняет желаемую биологическую активность исходного соединения и не оказывает нежелательного токсического действия (см., например, Berge, S.M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Примеры таких солей включают кислотно-аддитивные соли и основно-аддитивные соли. Кислотно-аддитивные соли включают соли, полученные из нетоксичных неорганических кислот, таких как хлористоводородная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфорная и т.п., а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксилкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфокислоты и тому

подобное. Основно-аддитивные соли включают соли, полученные из щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также из нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Композицию согласно настоящему изобретению можно вводить различными способами, известными в данной области техники. Специалист в данной области техники поймет, что путь и/или способ введения будут варьироваться в зависимости от желательных результатов. Активные соединения могут быть получены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, например, состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и системы доставки, заключенные в микрокапсулы. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие способы получения таких составов запатентованы или известны специалистам в данной области техники. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Для введения соединения согласно настоящему изобретению с помощью определенных путей введения может потребоваться нанесение покрытия на это соединение или совместное введение соединения с материалом, предотвращающим его инактивацию. Например, соединение может быть введено субъекту в подходящем носителе, например, липосомах, или разбавителе. Приемлемые разбавители включают солевые и водные буферные растворы. Липосомы включают эмульсии «вода-в-масле в воде» CGF, а также обычные липосомы (Strejan et al. (1984) *J. Neuroimmunol.* 7:27).

Носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсии для инъекций. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники. За исключением случаев, когда

любые обычные среды или агент не совместимы с активным соединением, в объеме настоящего изобретения включено их применение в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие их смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительным является включение в композицию изотонических агентов, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит, сорбит или хлорид натрия. Длительное всасывание композиций для инъекций может быть достигнуто путем включения в композицию агента, который задерживает всасывание, например, моностеаратных солей и желатина.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения активного соединения в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией путем микрофльтрации. Обычно дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты, выбранные из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сушка вымораживанием (лиофилизация), которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из раствора, ранее стерилизованного путем фильтрования.

Схемы дозирования корректируют так, чтобы обеспечить оптимальный желательный ответ (например, терапевтический ответ). Например, можно вводить один болюс, несколько разделенных доз могут быть введены на протяжении определенного периода времени, или доза может быть пропорционально снижена или увеличена в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Например, антитела согласно настоящему изобретению могут быть введены один или два раза в неделю путем подкожной или внутримышечной инъекции или один или два раза в месяц путем подкожной или внутримышечной инъекции.

Особенно полезным является приготовление композиций для парентерального введения в виде стандартной лекарственной формы для удобства введения и единообразия дозировки. В настоящем документе стандартная лекарственная форма относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве унифицированных доз для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желательного терапевтического действия в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Описание стандартной лекарственной формы согласно настоящему изобретению обусловлено и зависит непосредственно от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического действия, которое должно быть достигнуто, и (б) исходных ограничений технологии смешивания такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов.

Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) хелатирующие металлы агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

В случае терапевтических композиций составы согласно настоящему изобретению включают те, которые подходят для перорального, назального, местного (включая буккальное и сублингвальное), ректального, вагинального и/или парентерального введения. Для удобства составы могут быть представлены в виде стандартной лекарственной формы и могут быть получены любыми способами, известными в области фармацевтики. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения единичной стандартной лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от субъекта, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения единичной стандартной лекарственной формы, обычно будет представлять собой такое количество композиции, которое обеспечивает терапевтическое действие. Обычно из ста процентов такое количество будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,001% до приблизительно девяноста процентов активного ингредиента, предпочтительно от приблизительно 0,005% до приблизительно 70%, наиболее предпочтительно от приблизительно 0,01% до приблизительно 30%.

Составы согласно настоящему изобретению, которые пригодны для вагинального введения, также включают пессарии, тампоны, кремы, гели, пасты, пены или аэрозольные составы, содержащие носители, которые известны в данной области техники. Лекарственные формы для местного или трансдермального введения композиций согласно настоящему изобретению включают порошки, аэрозольные препараты, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, патчи и ингаляционные препараты. Активное соединение можно смешивать в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, которые могут потребоваться.

В настоящем документе выражения «парентеральное введение» и «вводимые парентерально» означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, но не ограничиваются указанными, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрикапсулярную, внутриорбитальную, внутрисердечную,

внутрикожную, внутривнутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, подкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутриспинальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем использования материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ.

Подходящие композиции также могут содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение присутствия микроорганизмов может быть обеспечено как с помощью процедур стерилизации, описанных выше, так и путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т.п. Желательным также может быть включение в композиции изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Помимо этого пролонгированное всасывание фармацевтической формы для инъекций может быть обеспечено путем включения агентов, которые задерживают всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

В случае если соединения согласно настоящему изобретению вводят в виде фармацевтических препаратов, человеку и животным, они могут быть введены по отдельности или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, от 0,001% до 90% (более предпочтительно от 0,005% до 70%, например, от 0,01% до 30 %) активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Независимо от выбранного пути введения соединения согласно настоящему изобретению, которые можно применять в подходящей гидратированной форме,

и/или фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению получают в виде фармацевтически приемлемых лекарственных форм с помощью обычных способов, известных специалистам в данной области техники.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению могут варьироваться так, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желательного терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретных композиций согласно настоящему изобретению или их сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости выделения конкретного применяемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных препаратов, соединений и/или материалов, использованных в комбинации с конкретными примененными композициями, возраста, пола, массы, состояния, общего состояния здоровья и предшествующей истории болезни пациента, которого лечат, и подобных факторов, хорошо известных в медицине. Врач или ветеринар, имеющий стандартную квалификацию в данной области техники, может легко определить и назначить эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать введение доз соединений согласно настоящему изобретению, примененных в фармацевтической композиции, на более низких уровнях, чем те, которые требуются для достижения желательного терапевтического действия, и постепенно увеличивать дозировку до достижения желательного действия. Обычно подходящая суточная доза композиции согласно настоящему изобретению составит то количество соединения, которое представляет собой самую низкую дозу, эффективную для получения терапевтического действия. Такая эффективная доза обычно будет зависеть от факторов, описанных выше. Предпочтительный способ введения включает внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное или подкожное введение, предпочтительно проксимально относительно целевого места. При необходимости, эффективную суточную дозу терапевтической композиции можно вводить в виде двух, трех, четырех, пяти, шести или более субдоз,

вводимых по отдельности через соответствующие интервалы времени в течение суток, необязательно, в виде стандартных лекарственных форм. Несмотря на то, что соединение согласно настоящему изобретению может быть введено по отдельности, предпочтительным является введение соединения в виде фармацевтического состава (композиции).

Терапевтические композиции могут быть введены с помощью медицинских устройств, известных в данной области техники. Например, в предпочтительном варианте осуществления, терапевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть введена с помощью устройства для подкожных инъекций без иглы, такого как устройства, раскрытые в патентах США №№ 5399163, 5383851, 5312335, 5064413, 4941880, 4790824, или 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей, которые можно применять в настоящем изобретении, включают: патент США № 4487603, в котором раскрыт имплантируемый микроинфузионный насос для дозирования лекарственного средства с контролируемой скоростью; патент США № 4486194, в котором раскрыто терапевтическое устройство для введения лекарственных средств через кожу; патент США № 4447233, в котором раскрыт инфузионный насос для введения лекарственного средства с точной скоростью инфузии; патент США № 4447224, в котором раскрыт имплантируемый инфузионный аппарат с регулируемой скоростью потока для непрерывной доставки лекарственного препарата; патент США № 4439196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного препарата, имеющая многокамерные отсеки; и патент США № 4475196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного препарата. Специалистам в данной области техники известны многие другие подходящие имплантаты, системы доставки и модули.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены, чтобы обеспечить надлежащее распределение в условиях *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) не пропускает многие высокогидрофильные соединения. Чтобы гарантировать, что терапевтические соединения согласно настоящему изобретению пересекут ГЭБ (если необходимо), они могут быть приготовлены,

например, в липосомах. Способы получения липосом описаны, например, в патентах США №№ 4522811; 5374548; и 5399331. Липосомы могут содержать один или более фрагментов, которые селективно переносятся в определенные клетки или органы, повышая тем самым целевую доставку лекарственного препарата (см., например, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Примерные нацеливающие фрагменты включают фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016, выданный Low et al.); маннозиды (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); антитела (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); рецептор протеина А сурфактанта (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134), различные виды которого могут содержать составы согласно изобретениям, а также компоненты изобретенных молекул; p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); также см. K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения терапевтические соединения согласно настоящему изобретению приготовлены в липосомах; в более предпочтительном варианте осуществления липосомы включают нацеливающий фрагмент. В наиболее предпочтительном варианте осуществления терапевтические соединения в липосомах доставляют путем болюсной инъекции в участок, ближайший к опухоли или очагу инфекции. Композиция должна быть жидкой в такой степени, чтобы обеспечить проходимость через иглу. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть устойчива к загрязняющему действию микроорганизмов, таких как бактерии и грибки.

Способность соединения ингибировать рак можно оценить в модельной системе на животных, которая позволяет прогнозировать эффективность в опухолях человека. В другом варианте это свойство композиции можно оценить, исследуя ингибиторную способность соединения, такое ингибирование можно оценить в условиях *in vitro* с помощью количественных способов исследований, известных квалифицированному практику. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может уменьшить размер опухоли или иным образом улучшить симптомы у субъекта. Специалист в данной области техники сможет определить такие количества на основании таких факторов как размер

субъекта, степень тяжести симптомов субъекта и выбранной конкретной композиции или пути введения.

Композиция должна быть стерильной и жидкой в такой степени, чтобы обеспечить доставку композиции с помощью шприца. Помимо воды носитель может представлять собой изотонический буферный солевой раствор, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие их смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, с помощью покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительным является включение в композиции изотонических агентов, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит или сорбит, и хлорида натрия. Длительное всасывание инъекционных композиций может быть обеспечено путем включения в композицию агента, который замедляет всасывание, например, моностеарата алюминия или желатина.

Когда активное соединение защищено соответствующим образом, как описано выше, соединение может быть введено перорально, например, с инертным разбавителем или ассимилируемым съедобным носителем.

Нуклеиновые кислоты

Используемый в настоящем документе термин «молекула нуклеиновой кислоты» включает молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно представляет собой двухцепочечную ДНК.

Термин «выделенная молекула нуклеиновой кислоты», используемый в настоящем документе в отношении нуклеиновых кислот, кодирующих связывающие домены, антитела или части антител (например, VH, VL, CDR3), которые связываются с CD27 и/или PD-L1, предназначен для ссылки на молекулу нуклеиновой кислоты, в которой нуклеотидные последовательности, кодирующие

связывающий домен, антитела или части антител, не содержат других нуклеотидных последовательностей, кодирующих связывающий домен, антитела или части антител, которые связывают антигены, отличные от CD27 и/или PD-L1, где другие последовательности могут естественным образом фланкировать нуклеиновую кислоту в геномной ДНК человека.

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или по существу чистой форме. Нуклеиновая кислота «выделена» или «превращена в по существу чистую» при очистке от других клеточных компонентов или других загрязнений, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков, с помощью стандартных методик, включая обработку щелочами/ДСН, разделение в градиенте CsCl, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие способы, хорошо известные в данной области техники. См. F. Ausubel, et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

Молекулы нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, несмотря на то, что они часто представлены в виде нативной последовательности (за исключением модифицированных сайтов рестрикции и т.п.), из кДНК, геномной ДНК или их смесей могут быть мутированы в соответствии со стандартными методиками, чтобы обеспечить последовательности генов. В случае кодирующих последовательностей такие мутации могут влиять на аминокислотную последовательность, если необходимо. В частности, в объем настоящего изобретения включены последовательности ДНК, по существу гомологичные или происходящие из нативных V-, D-, J-, константных последовательностей, переключателей и других таких последовательностей, описанных в настоящем документе (где «происходящие» указывает на то, что последовательность идентична другой последовательности или получена путем ее модификации).

Нуклеиновая кислота «операбельно связана» или «функционально соединена», если она находится в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер функционально соединен с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию

последовательности. В отношении регулирующих транскрипцию последовательностей функционально соединенный означает, что соединенные последовательности ДНК являются смежными и, если необходимо соединить две кодирующие белок области, смежными и находящимися в одной рамке считывания. В случае последовательностей переключения функциональное соединение указывает на то, что последовательности способны осуществлять рекомбинацию на этапе переключения.

Также обеспечиваются выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие связывающие домены, антитела или их антиген-связывающие фрагменты, биспецифические конструкции и мультиспецифические конструкции, описанные в настоящем документе, а также экспрессионные векторы, содержащие такие нуклеиновые кислоты, и клетки-хозяева, содержащие такие экспрессионные векторы. Согласно другому варианту осуществления, обеспечивается молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая любое из связывающих доменов, антител, или их антиген-связывающих фрагментов, биспецифических конструкций или мультиспецифических конструкций, описанных в настоящем документе. Согласно другому варианту осуществления, молекула нуклеиновой кислоты находится в форме экспрессионного вектора. Согласно другому варианту осуществления, молекула нуклеиновой кислоты находится в форме экспрессионного вектора, который экспрессирует связывающий домен, антитело или его антиген-связывающий фрагмент, биспецифическую конструкцию или мультиспецифическую конструкцию, при введении субъекту *in vivo*.

Согласно одному варианту осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую переменный участок антитела, где переменный участок антитела содержит аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:17, 18, 19, 20, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, или аминокислотную последовательность на по меньшей мере 90% идентичные им (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную одной или более из вышеуказанных последовательностей). Согласно другому варианту

осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:25, 26, 27, 28, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, или нуклеотидную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную им (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную одной или более из вышеуказанных последовательностей).

Согласно другому варианту осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела, где переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела содержат аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:17 и 18, SEQ ID NO:19 и 20, SEQ ID NO:77 и 78, SEQ ID NO:79 и 80, SEQ ID NO:81 и 82, SEQ ID NO: 83 и 84, SEQ ID NO:85 и 86, или SEQ ID NO:87 и 88, соответственно, или аминокислотные последовательности, на по меньшей мере 90% идентичные им (например, на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичные вышеуказанным последовательностям).

В настоящем документе термин «вектор» предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к циклической петле двухцепочечной ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и тем самым реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально соединены. В настоящем документе такие векторы называются «рекомбинантные векторы экспрессии»

(или просто «экспрессионный вектор»). Обычно векторы экспрессии, подходящие для применения в способах рекомбинантной ДНК, часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании «плазида» и «вектор» могут быть использованы взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако, подразумевается, что в объем настоящего изобретения включены другие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

В настоящем документе термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») предназначен для обозначения клетки, в которую был введен рекомбинантный экспрессионный вектор. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной клетки субъекта, но и потомства такой клетки. Поскольку определенные модификации могут произойти в последующих поколениях вследствие как мутаций, так и воздействий окружающей среды, такое потомство не может, фактически, быть идентичным родительской клетке, тем не менее, оно все еще включено в объем термина «клетка-хозяин», используемого в настоящем документе.

Комбинированная терапия

Любое из связывающих доменов, антител, их антиген-связывающих фрагментов, биспецифических конструкций и/или мультиспецифических конструкций, описанных в настоящем документе, можно вводить в комбинации с дополнительной терапией, то есть в комбинации с другими агентами. Используемый в настоящем документе термин «совместно вводимый» включает любое из или все из одновременного, отдельного или последовательного введения связывающих доменов, антител, их антиген-связывающих фрагментов, биспецифических конструкций или мультиспецифических конструкций, описанных в настоящем документе, с адьювантами и другими агентами, включая введение как часть режима дозирования. Например, комбинированная терапия может включать введение любого из связывающих доменов, антител, их антиген-связывающих фрагментов, биспецифических конструкций и/или

мультиспецифических конструкций, описанных в настоящем документе, по меньшей мере с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, такими как противовоспалительные агенты, DMARD (противоревматические препараты, модифицирующие течение болезни), иммуносупрессорные агенты, химиотерапевтические агенты, лучевая терапия, другие антитела, цитотоксины и/или лекарственные препараты, а также адъюванты, иммуностимулирующие агенты и/или иммунодепрессанты

Химиотерапевтические агенты, подходящие для совместного введения с связывающими доменами, антителами, их антиген-связывающими фрагментами, биспецифическими конструкциями и/или мультиспецифическими конструкциями, описанными в настоящем документе, при лечении опухолей, включают, например, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин, а также их аналоги или гомологи. Дополнительные агенты включают, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацилдекарбазин), алкилирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиамин платины (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (ранее дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (AMC)) и антимиотические агенты (например, винкристин и винбластин) и темозоломид.

Агенты, которые устраняют или ингибируют виды иммуносупрессорной активности, например, иммунными клетками (например, регуляторными Т-клетками, НКТ-клетками, макрофагами, супрессорными клетками миелоидного происхождения, незрелыми или супрессорными дендритными клетками) или супрессорными факторами, вырабатываемыми опухолевыми клетками или клетками-хозяевами в местное микроокружение опухоли (например, TGF β ,

индоламин 2,3 диоксигеназа – IDO), также могут вводиться с связывающими доменами, антителами, их антиген-связывающими фрагментами, биспецифическими конструкциями или мультиспецифическими конструкциями, описанными в настоящем документе. Такие агенты включают антитела и низкомолекулярные препараты, такие как ингибиторы IDO, такие как 1-метилтриптофан или производные.

Подходящие агенты для совместного введения с связывающими доменами, антителами, их антиген-связывающими фрагментами, биспецифическими конструкциями и/или мультиспецифическими конструкциями, описанными в настоящем документе для лечения таких иммунных расстройств, включают, например, иммунодепрессанты, такие как рапамицин, циклоспорин и FK506; анти-TNF агенты, такие как этанерцепт, адалимумаб и инфликсимаб; и стероиды. Примеры конкретных природных и синтетических стероидов включают, например: альдостерон, беклометазон, бетаметазон, будесонид, клопреднол, кортизон, кортивазол, дезоксикортон, дезонид, дезоксиметазон, дексаметазон, дифторокортон, флуклоролон, флуметазон, флунизол, флуоцинолон, флуокортинбутил, флуорокортизон, флуорокортолон, флуорометолон, флурандренолон, флутиказон, галцинонид, гидрокортизон, икометазон, мепреднизон, метилпреднизолон, параметазон, преднизолон, преднизон, тиксокортол и триамцинолон.

Подходящие агенты для совместного введения с связывающими доменами, антителами, их антиген-связывающими фрагментами, биспецифическими конструкциями и/или мультиспецифическими конструкциями, описанными в настоящем документе для индукции или усиления иммунного ответа, включают, например, адъюванты и/или иммуностимулирующие агенты, неограничивающие примеры которых были раскрыты здесь ранее. Согласно одному варианту осуществления иммуностимулирующее средство представляет собой агонист TLR3, такой как Poly IC.

Используемый здесь термин «иммуностимулирующий агент» включает, но не ограничивается ими, соединения, способные стимулировать

антигенпрезентирующие клетки (АРС), такие как дендритные клетки (DC) и макрофаги. Например, подходящие иммуностимулирующие агенты для использования в настоящем изобретении способны стимулировать АРС, так что процесс созревания АРС ускоряется, пролиферация АРС увеличивается и/или рекрутинг или высвобождение костимулирующих молекул (например, CD80, CD86, ICAM-1, молекулы МНС и CCR7) и повышающе регулировать провоспалительные цитокины (например, ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-15 и IFN- γ). Подходящие иммуностимулирующие агенты также способны увеличивать пролиферацию Т-клеток. Такие иммуностимулирующие агенты включают, но не ограничиваются ими, лиганд CD40; лиганд FLT 3; цитокины, такие как IFN- α , IFN- β , IFN- γ и ИЛ-2; колониестимулирующие факторы, такие как G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор) и GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор); анти-CTLA-4 антитело, анти-PD1 антитело, анти-41BB антитело или анти-OX-40 антитело; LPS (эндотоксин); оцРНК; дцРНК; бациллу Кальмета-Герена (BCG), гидрохлорид левамизола, внутривенные иммунные глобулины и агонист Toll-подобного рецептора (TLR). Например, иммуностимулирующий агент может быть агонистом TLR3, таким как двухцепочечный полинуклеотид инозин: цитозин (Poly I: C, например, доступный как Ampligen TM от Hemispherx Biopharma, PA, США или Poly IC: LC от Oncovir) или Poly A: U; агонист TLR4, такой как монофосфориллипид А (MPL) или RC-529 (например, доступный от GSK, UK); агонист TLR5, такой как флагеллин; агонист TLR7 или TLR8, такой как имидазохинолиновый агонист TLR7 или TLR 8, например имиквимод (например, AldaraTM) или резиквимод и родственные имидазохинолиновые агенты (например, доступные от 3M Corporation); или агонист TLR 9, такой как дезоксинуклеотид с неметилованными мотивами CpG (так называемый «CpG», например, доступные от Coley Pharmaceutical). Такие иммуностимулирующие агенты можно вводить одновременно, отдельно или последовательно с связывающим доменом, антителами, их антиген-связывающими фрагментами, биспецифическими конструкциями и/или мультиспецифическими конструкциями, описанными в настоящем документе.

Применения и способы согласно настоящему изобретению

Настоящее изобретение обеспечивает способы стимуляции Т-клеточной активности, способы индукции или усиления иммунного ответа и способы лечения состояния или заболевания (*например*, рака) посредством введения биспецифических конструкций, мультиспецифических конструкций, антител или их антиген-связывающих фрагментов, или композиций, описанных в настоящем документе, пациенту, нуждающемуся в этом.

Используемый в настоящем документе термин «Т-клеточный ответ» или «Т-клеточная активность» относится к любому ответу, опосредованному Т-клетками, включая эффекторные Т-клетки (*например*, клетки CD8+) и хелперные Т-клетки (*например*, клетки CD4+). Ответы, опосредованные Т-клетками, включают, *например*, цитотоксичность и пролиферацию Т-клеток. Стимуляцию активности Т-клеток можно оценить с помощью любого из ряда индикаторов активности Т-клеток, известных в данной области техники. *Например*, усиление продукции интерферона-гамма стимулированными ОКТ3 Т-клетками можно использовать как меру активации Т-клеток. Стимуляцию активности Т-клеток также можно оценить с помощью системы репортерных генов, управляемой NF κ B, в клетке, экспрессирующей CD27. Другие подходящие анализы активации Т-клеток хорошо известны в данной области техники.

Термины «индукция иммунного ответа» и «усиление иммунного ответа» используются взаимозаменяемо и относятся к стимуляции иммунного ответа (*т. е.*, как пассивного, так и адаптивного) на определенный антиген.

В настоящем документе термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к терапевтическим или профилактическим мерам, описанным в настоящем документе. В способах «лечения» применяют введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, биспецифической конструкции, мультиспецифической конструкции, антитела, его антиген-связывающего фрагмента или композиции согласно настоящему изобретению, *например*, субъекту, нуждающемуся в усиленном иммунном ответе против конкретного антигена, или субъекту, у которого в конечном итоге может развиваться такое расстройство, чтобы предотвратить, излечить, задержать, уменьшить степень тяжести или улучшить

один или более симптомов расстройства или рецидивирующего расстройства, или для того чтобы продлить период выживания субъекта сверх того, который ожидается при отсутствии такого лечения.

Термин «эффективная доза» или «эффективная дозировка» определяется как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения желательного эффекта. Термин «терапевтически эффективная доза» определяется как количество, достаточное для излечения или по меньшей мере частичного купирования заболевания и его осложнений у пациента, уже страдающего этим заболеванием. Количества, эффективные для такого применения, будут зависеть от степени тяжести расстройства, которое лечат, и общего состояния собственной иммунной системы пациента.

Термин «пациент» включает человека и других субъектов-млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

Используемый в настоящем документе термин «ингибирует рост» (например, относится к клеткам) предназначен для включения любого измеримого снижения роста клетки, например, ингибирования роста клетки по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% или 100%.

Согласно одному аспекту обеспечиваются способы стимуляции Т-клеточной активности, которые включают контакт Т-клеток с любым из антител или их антиген-связывающих фрагментов, биспецифических конструкций, мультиспецифических конструкций или композиций, описанных в настоящем документе. Стимуляция Т-клеточной активности может включать, например, стимуляцию продукции IFN-гамма.

Согласно другому аспекту обеспечиваются способы индукции или усиления иммунного ответа (*например*, против антигена) у субъекта, включающие введение субъекту любого из антител или их антиген-связывающих фрагментов, биспецифических конструкций, мультиспецифических конструкций, или композиций, описанных в настоящем документе, в количестве, эффективном для

индукции или усиления иммунного ответа у субъекта (*например*, против антигена).

Согласно другому аспекту обеспечиваются способы лечения состояния или заболевания у субъекта, где способ включает введение субъекту любого из антител или их антиген-связывающих фрагментов, биспецифических конструкций, мультиспецифических конструкций, или композиций, описанных в настоящем документе, в количестве, эффективном для лечения состояния или заболевания.

Согласно другому аспекту обеспечиваются способы лечения состояния или заболевания у субъекта, где способ включает введение субъекту любого из анти-CD27 антител или их антиген-связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, в комбинации с любым из анти-PD-L1 антител или их антиген-связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Например, согласно одному варианту осуществления:

- (i) анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент выбрано из группы, включающей: (a) анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, и (b) анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно; и
- (ii) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент выбрано из группы, включающей: (a) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 29, 30, и 31, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно; (b) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1,

CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 35, 36, и 37, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно; (с) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 41, 42, и 43, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно; (d) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно; (е) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 53, 54, и 55, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно; и (f) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 59, 60, и 61, соответственно, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно.

Согласно другому варианту осуществления,

- (i) анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент выбрано из группы, включающей: (а) анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18 и (b) анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и
- (ii) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент выбрано из группы, включающей: (а) анти-PD-L1 антитело или его антиген-

связывающий фрагмент, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78; (b) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80; (c) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82; (d) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84; (e) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86; и (f) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, вводят отдельно. Согласно одному варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, вводятся последовательно. Например, анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, может вводиться первым с последующим (например, немедленно сразу после) введением анти-PD-L1 антитела или его антиген-связывающего фрагмента, или наоборот. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, могут вводиться совместно. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, вводятся одновременно. Согласно другому варианту осуществления, анти-CD27 антитело или его антиген-

связывающий фрагмент, и анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, вводятся одновременно в одном составе. Альтернативно, анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, составлены для отдельного введения и вводятся одновременно или последовательно. Такое одновременное или последовательное введение предпочтительно приводит к тому, что оба антитела одновременно присутствуют у подлежащих лечению пациентов.

Согласно определенным вариантам осуществления, введение любого из анти-CD27 антител или их антиген-связывающего фрагмента, описанных в настоящем документе, в комбинации с любым из анти-PD-L1 антител или их антиген-связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, приводит к синергетическим эффектам (*например*, усилению иммунных ответов *in vivo*) по сравнению с применением любого антитела самого по себе.

Субъектом может быть, например, любой, страдающий состоянием или заболеванием, при котором желательна стимуляция иммунного ответа. Согласно одному варианту осуществления, состоянием или заболеванием является рак. Типы рака включают, но не ограничиваются указанными, лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, такой как миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкоз, хронический лейкоз, хронический миелобластный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, лимфому из клеток мантийной зоны, первичную лимфому центральной нервной системы, лимфому Беркитта и В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны, болезнь Ослера, ходжкинскую лимфому, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, солидные опухоли, саркомы и карциномы, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, остеосаркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстой кишки, колоректальную карциному, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточную

карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярную аденокарциному, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, карциному почек, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильма, рак шейки матки, рак матки, опухоль яичек, карциному легких, мелкоклеточную карциному легких, немелкоклеточную карциному легких, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пениалому, гемангиобластому, неврому слухового нерва, олигодендроглиому, менангиому, меланому, нейробластому, ретинобластому, карциному носоглотки, карциному пищевода, базальноклеточную карциному, рак желчных путей, рак мочевого пузыря, рак костей, рак головного мозга и центральной нервной системы (ЦНС), рак шейки матки, хориокарциному, разновидности колоректального рака, рак соединительной ткани, рак пищеварительной системы, рак эндометрия, рак пищевода, рак глаз, рак головы и шеи, рак желудка, внутриэпителиальное новообразование, рак почек, рак гортани, рак печени, рак легких (мелкоклеточный, крупноклеточный), меланому, нейробластому; рак полости рта (например, губы, языка, ротовой полости и глотки), рак яичников, рак поджелудочной железы, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак прямой кишки; рак дыхательной системы, саркому, рак кожи, рак желудка, рак яичек, рак щитовидной железы, рак матки и рак мочевыделительной системы. Конкретные виды рака включают CD27-экспрессирующие опухоли, выбранные из группы, состоящей из хронического лимфобластного лейкоза, лимфомы из клеток мантийной зоны, первичной лимфомы центральной нервной системы, лимфомы Беркитта и В-клеточной лимфомы из клеток краевой зоны.

Другие заболевания включают бактериальные, грибковые, вирусные и паразитарные инфекционные заболевания.

Способы индукции или усиления иммунного ответа (например, против антигена) у субъекта, описанные в настоящем документе, могут дополнительно включать введение антигена субъекту. Используемый в настоящем документе термин

«антиген» относится к любому природному или синтетическому иммуногенному веществу, такому как белок, пептид, гаптен, полисахарид и/или липид. Биспецифическая конструкция, мультиспецифическая конструкция, антитело, его антиген-связывающий фрагмент или композиция, описанные в настоящем документе, и антиген могут быть введены одновременно или, альтернативно, биспецифическая конструкция, мультиспецифическая конструкция, антитело, его антиген-связывающий фрагмент или композиция могут быть введены до или после введения антигена.

Согласно одному варианту осуществления, биспецифическая конструкция, мультиспецифическая конструкция, антитело, его антиген-связывающий фрагмент или композиция, описанные в настоящем документе, вводится в комбинации с вакциной для усиления иммунного ответа против вакцинного антигена, например, опухолевого антигена (чтобы тем самым усилить иммунный ответ против опухоли) или антигена возбудителя инфекционного заболевания (чтобы тем самым усилить иммунный ответ против возбудителя инфекционного заболевания). Соответственно, согласно одному варианту осуществления, вакцинный антиген может включать, например, антиген или антигенную композицию, способную вызывать иммунный ответ против опухоли или патогена инфекционного заболевания, такого как вирус, бактерия, паразит или грибок. Антиген или антигены происходят из опухолей, таких как различные опухолевые антигены, ранее описанные в настоящем документе. Альтернативно, антиген или антигены могут происходить из патогенов, таких как вирусы, бактерии, паразиты и/или грибки.

Предпочтительные антигены для совместного введения с антителами или их антиген-связывающими фрагментами, биспецифическими конструкциями, мультиспецифическими конструкциями или композициями, описанными в настоящем документе, включают опухолевые антигены и вакцинные антигены (например, бактериальные, вирусные или другие патогенные антигены, против которых защитный иммунитет желательно поднять у субъекта в целях вакцинации). Дополнительные примеры подходящих антигенов патогенов включают ассоциированные с опухолью антигены (ТАА), включая, но не

ограничиваясь, последовательности, содержащие всю или часть последовательностей EGFR, EGFRvIII, gp100 или Pmel17, HER2/neu, мезотелина, CEA, MART1, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MUC-1, GPNMB, HMW-MAA, TIM1, ROR1, CD19, и опухолевые антигены, полученные из зародышевых клеток.

Другие подходящие антигены включают вирусные антигены для профилактики или лечения вирусных заболеваний. Примеры вирусных антигенов включают, но не ограничиваются ими, антигены HIV-1 env, HBsAg, HPV, FAS, HSV-1, HSV-2, p17, ORF2 и ORF3. Кроме того, вирусные антигены или антигенные детерминанты могут быть получены, например, из: цитомегаловируса (особенно цитомегаловируса человека, например, gB или его производные); вируса Эпштейна-Барр (например, gp350); флавивирусов (например, вируса желтой лихорадки, вируса денге, вируса клещевого энцефалита, вируса японского энцефалита); вируса гепатита, такого как вирус гепатита В (например, поверхностный антиген гепатита В, такой как антигены PreS1, PreS2 и S, описанные в EP-A-414 374; EP-A-0304 578 и EP-A-198474), вируса гепатита А, вируса гепатита С и вируса гепатита Е; ВИЧ-1 (такие как tat, nef, gp120 или gp160); вирусов герпеса человека, такие как gD или его производные или немедленный ранний белок, такой как ICP27 из ВГЧ 1 или ВГЧ 2; вирусов папилломы человека (например, ВПЧ 6, 11, 16, 18); вируса гриппа (целый живой или инактивированный вирус, расщепленный вирус гриппа, выращенный в яйцах или клетках линии MDCK, или клетках Vero, или виросомы целого вируса (как описано Gluck, Vaccine, 1992,10, 915-920) или их очищенные или рекомбинантные белки, такие как белки NP, NA, HA или M); вируса кори; вируса свинки; вируса парагриппа; вируса бешенства; респираторно-синцитиального вируса (например, белки F и G); ротавируса (включая живые вирусы со сниженной вирулентностью); вируса оспы; вируса ветряной оспы (например, gpI, II и IE63); и ВПЧ, ответственных за рак шейки матки (например, ранние белки E6 или E7, гибридные с белком D-носителем с образованием гибридов белок D-E6 или E7 из ВПЧ 16 или их комбинации; или комбинации E6 или E7 с L2 (см., например, WO 96/26277)).

Примеры бактериальных антигенов включают без ограничения *Toxoplasma gondii* или *Treponema pallidum*. Бактериальные антигены могут использоваться для лечения или профилактики различных бактериальных заболеваний, таких как сибирская язва, ботулизм, столбняк, хламидиоз, холера, дифтерия, болезнь Лайма, сифилис и туберкулез. Бактериальные антигены или антигенные детерминанты могут быть получены, например, из *Bacillus* spp., включая *B. anthracis* (например, токсин ботулизма); *Bordetella* spp., включая *B. pertussis* (например, пертактин, коклюшный токсин, филаментный гемагглютинин, аденилатциклазу, фимбрии); *Borrelia* spp., включая *B. burgdorferi* (например, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (например, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (например, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (например, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Campylobacter* spp., включая *C. jejuni* (например, токсины, адгезины и инвазины) и *C. coli*; *Chlamydia* spp., включая *C. trachomatis* (например, МOMP, связывающие гепарин белки), *C. pneumoniae* (например, МOMP, связывающие гепарин белки), *C. psittaci*; *Clostridium* spp., включая *C. tetani* (такой как столбнячный токсин), *C. botulinum* (например, токсин ботулизма), *C. difficile* (например, клостридиальные токсины А или В); *Corynebacterium* spp., включая *C. diphtheriae* (например, дифтерийный токсин); *Ehrlichia* spp., включая *E. equi* и агент гранулоцитарного эрлихиоза человека; *Rickettsia* spp., включая *R. rickettsii*; *Enterococcus* spp., включая *E. faecalis*, *E. faecium*; *Escherichia* spp., включая энтеротоксическую *E. coli* (например, факторы колонизации, термолабильный токсин или их производные или термостойкий токсин), энтерогеморрагическую *E. coli*, энтеропатогенную *E. coli* (например, токсин, подобный сига-токсину); *Haemophilus* spp., включая *H. influenzae* типа В (например, PRP), нетипируемый штамм *H. influenzae*, например, OMP26, высокомолекулярные адгезины, P5, P6, белок D и липопротеин D, а также фимбрин и пептиды, полученные из фимбрина (см. пример US 5843464); *Helicobacter* spp., включая *H. pylori* (например, уреазу, каталазу, вакуолирующий токсин); *Pseudomonas* spp., включая *P. aeruginosa*; *Legionella* spp., включая *L. pneumophila*; *Leptospira* spp., включая *L. interrogans*; *Listeria* spp., включая *L. monocytogenes*; *Moraxella* spp., включая *M. catarrhalis*, также известный как *Branhamella catarrhalis* (например, высокомолекулярные и низкомолекулярные адгезины и инвазины); *Moraxella catarrhalis* (включая их наружные мембранные везикулы и OMP106 (см., например, W097/41731)); *Mycobacterium* spp., включая *M. tuberculosis* (например, ESAT6, антиген 85A, -B

или -С), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Neisseria* spp., включая *N. gonorrhoea* и *N. meningitidis* (например, капсулярные полисахариды и их конъюгаты, трансферринсвязывающие белки, лактоферринсвязывающие белки, PilC, адгезины); *Neisseria meningitidis* В (включая их наружные мембранные везикулы и NspA (см., например, WO 96/29412), *Salmonella* spp., включая *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *Shigella* spp., включая *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*, *Staphylococcus* spp., включая *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus* spp., включая *S. pneumoniae* (например, капсулярные полисахариды и их конъюгаты, PsaA, PspA, стрептолизин, холинсвязывающие белки) и белковый антиген пневмолизин (Biochem Biophys Acta, 1989,67,1007; Rubins et al., Microbial Pathogenesis, 25,337-342) и их мутированные детоксифицированные производные (см., например, WO 90/06951, WO 99/03884), *Treponema* spp. включая *T. pallidum* (например, белки наружной мембраны), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; *Vibrio* spp., включая *V. cholera* (например, холерный токсин); и *Yersinia* spp., включая *Y. enterocolitica* (например, Yop-белок), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*.

Паразитарные/грибковые антигены или антигенные детерминанты могут быть получены, например, из: *Babesia* spp., включая *B. microti*; *Candida* spp., включая *C. albicans*; *Cryptococcus* spp., включая *C. neoformans*; *Entamoeba* spp., включая *E. histolytica*; *Giardia* spp., включая *G. lamblia*; *Leshmania* spp., включая *L. major*; *Plasmodium falciparum* (MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, секвестрин, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXPI, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 и их аналоги в *Plasmodium* spp.); *Pneumocystis* spp., включая *P. carinii*; *Schistosoma* spp., включая *S. mansoni*; *Trichomonas* spp., включая *T. vaginalis*; *Toxoplasma* spp., включая *T. gondii* (например, SAG2, SAG3, Tg34); *Trypanosoma* spp., включая *T. cruzi*.

Следует понимать, что в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения антигены и антигенные детерминанты можно применять во многих различных формах. Например, антигены или антигенные детерминанты могут присутствовать в виде выделенных белков или пептидов (например, в так называемых «субъединичных вакцинах») или, например, в качестве

ассоциированных с клетками или ассоциированных с вирусами антигенов или антигенных детерминант (например, как в живых патогенных штаммах, так и в мертвых патогенных штаммах). Живые патогены предпочтительно будут ослаблены известным способом. В другом варианте антигены или антигенные детерминанты могут быть получены у субъекта в условиях *in situ* с использованием полинуклеотида, кодирующего антиген или антигенную детерминанту (как при так называемой «ДНК-вакцинации»), хотя следует понимать, что полинуклеотиды, которые можно применять с таким подходом, не ограничены ДНК и также могут включать РНК и модифицированные полинуклеотиды, как обсуждалось выше.

Согласно одному варианту осуществления, вакцинный антиген также может быть нацеленным, например, на конкретные типы клеток или конкретные ткани. Например, вакцинный антиген может быть нацелен на антигенпрезентирующие клетки (APCs), например, посредством применения агентов, таких как антитела, нацеленных на APC-поверхностные рецепторы, такие как DEC-205, например, как раскрывается в WO 2009/061996 (Celldex Therapeutics, Inc), или маннозный рецептор (CD206), например, как раскрывается в WO 03040169 (Medarex, Inc.).

Наборы

Также обеспечиваются наборы (*например*, диагностические наборы), содержащие одно или более из анти-CD27 связывающих доменов, анти-PD-L1 связывающих доменов, биспецифических конструкций, сультаспецифических конструкций или композиций, как описано в настоящем документе, при необходимости с инструкциями по применению. Наборы могут также включать информационные буклеты, например, буклеты, информирующие о том, как использовать реагенты при осуществлении на практике описанного в настоящем документе способа. Термин «буклет» включает любые письменные, маркетинговые или записанные материалы, входящие в набор или идущие вместе с ним, или иным образом сопровождающие набор.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как дополнительное ограничение. Содержание фигур и все ссылки, патенты и опубликованные патентные заявки, цитируемые в настоящей заявке, прямо включены в нее посредством ссылки.

Примеры

Пример1. Получение CD27-специфических моноклональных антител человека

Моноклональные анти- CD27 антитела человека получали путем иммунизации штамма H2L2 трансгенных мышей Harbour® растворимым человеческим антигеном CD27. Трансгенные мыши Harbour® имели нокаутированные последовательности ДНК эндогенной тяжелой цепи (НС) и легкой каппа-цепи (к-цепи) мыши последовательности вариабельных (V) областей человека и константных (С) областей крысы, стабильно включенные в геном мыши.

Антиген и иммунизация: Антиген представлял собой растворимый слитый белок, содержащий внеклеточный домен CD27 с Fc-меткой (R&D Systems). Антиген смешивали с адьювантной системой MPL плюс TDM (Sigma) для иммунизации. 5-25 мкг растворимого рекомбинантного антигена CD27 в PBS смешивали 1: 1 с адьювантом. Мышам вводили 200 мкл приготовленного антигена в брюшную полость каждые 14 дней. Животным, у которых развились титры анти-CD27, вводили внутривенно инъекцию 5-10 мкг растворимого рекомбинантного антигена CD27 за три-четыре дня до слияния. Селезенки мышей собирали и изолированные спленоциты использовали для получения гибридомы.

Получение гибридомы. Для слияний использовали линию клеток миеломы мыши P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580). RPMI 1640 (Invitrogen), содержащий 10% FBS, использовали для культивирования миеломных клеток. К питательной среде для гибридом были добавлены дополнительные добавки, которые включали: до 10% добавки, улучшающей гибридомы (Sigma), 10% FBS (Sigma), L-глутамин (Gibco),

0,1% гентамицин (Gibco), 2-меркаптоэтанол (Gibco) с НАТ (Sigma; $1,0 \times 10^4$ М гипоксантин, $4,0 \times 10^{-7}$ М аминоптерин, $1,6 \times 10^{-5}$ М тимидиновая среда).

Клетки селезенки смешивали с клетками миеломы P3x63Ag8.653 в соотношении 6: 1 и осаждали центрифугированием. Полиэтиленгликоль добавляли по каплям при осторожном перемешивании для облегчения слияния. Гибридомам позволяли расти в течение одной-двух недель, пока не образовались видимые колонии. Супернатант собирали и использовали для первоначального скрининга на IgG крысы с помощью ELISA с использованием растворимого слитого белка CD27 человека и специфического определения Fc крысы. Затем IgG-положительные супернатанты анализировали на специфичность к CD27 с помощью проточной цитометрии. Гибридомы также подвергали скринингу на перекрестную реактивность с CD27 яванских макак, и все они были положительными в отношении связывания.

Клетки гибридомы размножали, а осадок клеток замораживали для выделения РНК и секвенирования. Кодированные области VH и VL человеческих моноклональных антител идентифицировали с использованием РНК из соответствующих гибридом. РНК была обратно транскрибирована в кДНК, кодирующие области V были амплифицированы с помощью ПЦР, и продукты ПЦР были секвенированы, вставлены в вектор IgG1каппа человека, транзientно экспрессированы и очищены с помощью колоночной хроматографии на белке А, что привело к выделению антител, представляющих особый интерес, которые были обозначены как 2В3 и 3С2.

Пример 2. Анализ для определения характеристик связывания человеческого моноклонального антитела с CD27

Микротитровальные планшеты покрывали рекомбинантным человеческим CD27-FLAG-HIS в PBS, а затем блокировали 5% бычьим сывороточным альбумином в PBS. Очищенные человеческие моноклональные антитела к белку А добавляли при различных концентрациях и инкубировали при 37 °С. Планшеты промывали PBS/Tween, а затем инкубировали с Fc-специфическим козым анти-человеческим

IgG поликлональным реагентом, конъюгированным с пероксидазой хрена, при 37 °С. После промывания планшеты проявляли субстратом HRP и анализировали при OD 450-650 нм с использованием устройства для считывания микротитровальных планшетов. На Фиг. 1 показано, что анти-CD27 антитела 2B3 и 3C2 связывают человеческий CD27.

Чтобы установить, что яванские макаки являются подходящей моделью для тестирования анти- CD27 моноклональных антител, микротитровальные планшеты покрывали яванских макак рекомбинантным CD27-FLAG-HIS в PBS, а затем блокировали 5% бычьим сывороточным альбумином в PBS. Добавляли супернатанты гибридом или контрольный IgG крыс и инкубировали при 37 °С. Планшеты промывали PBS/Tween, а затем инкубировали с Fc-специфическим анти-крысиным IgG поликлональным реагентом, конъюгированным с пероксидазой хрена, при 37 °С. После промывания планшеты проявляли субстратом HRP и анализировали при OD 450-650 нм с использованием устройства для считывания микротитровальных планшетов. На Фиг. 2 показано, что анти-CD27 антитела 2B3 и 3C2 связывают CD27 яванских макак.

Пример 3. Связывание с CD27 клетками

Способность анти-CD27 моноклональных антител человека связываться с CD27 на клетках, экспрессирующих человеческий CD27 на их поверхности, исследовали с помощью проточной цитометрии следующим образом:

Антитела тестировали на связывание с клеточной линией человека, экспрессирующей CD27 человека на своей поверхности. Очищенные человеческие моноклональные антитела к белку А (3 мкг/мл) инкубировали с клетками Ramos, экспрессирующими человеческий CD27, при комнатной температуре на шейкере для планшетов. Через 20 минут клетки промывали PBS, содержащим 0,1% BSA и 0,05% NaN₃ (РВА), и связанные антитела выявляли путем инкубации клеток с Fc-специфическим козым анти- человеческим IgG зондом, меченным PE. Избыток зонда отмывали с клеток с помощью РВА и определяли ассоциированную с клетками флуоресценцию с помощью анализа с

использованием прибора FACSCanto ПТМ (BD Biosciences, Нью-Джерси, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Как показано на Фиг. 3, человеческие анти-CD27 моноклональные антитела продемонстрировали высокие уровни связывания с клетками, экспрессирующими человеческий CD27.

Пример 4. Связывание с Т-клетками человека

Способность анти-CD27 человеческих моноклональных антител связывать с CD27 на человеческих Т-клетках исследовали с помощью проточной цитометрии следующим образом:

Антитела тестировали на связывание с человеческими Т-клетками CD3⁺, которые экспрессируют человеческий CD27 на своей поверхности. Мононуклеарные клетки периферической крови человека выделяли из лейкоцитов с использованием разделения Ficoll, а клетки CD3⁺ дополнительно выделяли из PBMC с использованием технологии разделения на магнитных шариках от Miltenyi Biotec. Очищенные человеческие моноклональные антитела к белку А (3 мкг/мл) инкубировали с Т-клетками при комнатной температуре на шейкере для планшетов. Через 20 минут клетки промывали PBS, содержащим 0,1% BSA и 0,05% NaN₃ (РВА), и связанные антитела выявляли путем инкубации клеток с Fc-специфическим козьим анти-человеческим IgG зондом, меченным PE. Избыток зонда отмывали с клеток с помощью РВА и определяли флуоресценцию, связанную с клетками, путем анализа с использованием прибора FACSCanto ПТМ (BD Biosciences, NJ, USA) в соответствии с инструкциями производителя.

Как показано на Фиг. 4 анти-CD27 человеческие моноклональные антитела продемонстрировали высокие уровни связывания с человеческими Т-клетками.

Пример 5. Блокирование CD70 связывания

Эффект человеческих моноклональных антител на связывание растворимого CD70 с CD27 на поверхности клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. Клетки Ramos, экспрессирующие CD27, инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре с антителами (50 мкг/мл) с последующим добавлением человеческого CD70-биотина ([конечный] = 0,5 мкг/мл) в течение 20 минут при комнатной температуре на шейкере для планшетов. CD27 захваченный CD70 детектировали с помощью стрептавидина PE и анализировали на приборе FACSCanto II™ (BD Biosciences, Нью-Джерси, США). На Фиг. 5 показано, что анти-CD27-антитела 2B3 и 3C2 блокируют связывание CD70 с CD27 на клетках.

Пример 6. Активация NFκB

Линию репортерных клеток люциферазы, экспрессирующих CD27, инкубировали в течение 6 часов при 37 °C, 6% CO₂ с различными концентрациями человеческих анти-CD27 антител. Люцифераза экспрессируется при активации и обнаруживается с помощью системы анализа люциферазы от Promega в соответствии с рекомендациями производителя. На Фиг. 6 показан высокий уровень активации NFκB, индуцированный антителами 2B3 и 3C2, в зависимости от концентрации антител.

Пример 7. Пролиферация Т-клеток

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC), выделенные из препаратов лейкоцитарной пленки, и клетки CD3⁺ дополнительно выделяли из PBMC с использованием технологии разделения на магнитных шариках от Miltenyi Biotec. Т-клетки метили 1 мМ сукцинимидилового сложного эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE) при комнатной температуре при вращении в течение 5 минут. PBMC, меченные CFSE (1×10^6), разливали в лунки, покрытые сухим способом анти-CD3-антителом (ОКТ3, eBioscience) при концентрации 1 мкг/мл и анти-CD27-антителами или контрольным IgG1 человека при концентрации 10 мкг/мл. Планшеты инкубировали при 37 °C, 5% CO₂ в течение

72 часов. Клетки собирали и анализировали проточной цитометрией на приборе FACSCanto II™ (BD Biosciences, Нью-Джерси, США) в соответствии с инструкциями производителя. На Фиг. 7 показано, что антитела 2B3 и 3C2 значительно увеличивают пролиферацию Т-клеток.

Пример 8. Получение PD-L1-специфических моноклональных антител человека

Моноклональные анти-PD-L1 антитела человека получали путем иммунизации штамма H2L2 трансгенных мышей Harbour® растворимым антигеном PD-L1 человека. У трансгенных мышей Harbour® были нокаутированы последовательности ДНК эндогенной тяжелой цепи (НС) и легкой каппа-цепи (к-цепи) мыши, и были обнаружены последовательности переменных (V) областей человека и константных (С) областей крысы, стабильно включенные в геном мыши.

Антиген и иммунизация: Антиген представлял собой растворимый слитый белок, содержащий внеклеточный домен PD-L1 с меткой HIS (R&D Systems), или рекомбинантный химерный белок PD-L1 – msG2a человека (полученный собственными силами). Антиген смешивали с адъювантной системой MPL плюс TDM (Sigma) для иммунизации. 5-25 мкг растворимого рекомбинантного антигена PD-L1 в PBS смешивали при соотношении 1: 1 с адъювантом. Мышам вводили 200 мкл приготовленного антигена в брюшную полость каждые 14 дней. Животным, у которых развились титры анти-PD-L1, внутривенно вводили 5-10 мкг растворимого рекомбинантного антигена PD-L1 за три-четыре дня до слияния. Селезенки мышей собирали и изолированные спленоциты использовали для получения гибридомы.

Получение гибридомы. Для слияния использовали линию клеток миеломы мыши P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580). RPMI 1640 (Invitrogen), содержащий 10% FBS, использовали для культивирования миеломных клеток. К питательной среде для гибридом были добавлены дополнительные добавки, которые включали: до 10% добавки, улучшающей гибридомы (Sigma), 10% FBS (Sigma), L-глутамин (Gibco),

0,1% гентамицин (Gibco), 2-меркаптоэтанол (Gibco) с НАТ (Sigma; $1,0 \times 10^4$ М гипоксантин, $4,0 \times 10^{-7}$ М аминоптерин, $1,6 \times 10^{-5}$ М тимидиновая среда).

Клетки селезенки смешивали с клетками миеломы P3x63Ag8.653 при соотношении 6: 1 и осаждали центрифугированием. Полиэтиленгликоль добавляли по каплям при осторожном перемешивании для облегчения слияния. Гибридомам позволяли расти в течение одной-двух недель, пока не образовались видимые колонии. Супернатант собирали и использовали для первоначального скрининга на IgG крысы с помощью ELISA с использованием растворимого слитого белка PD-L1 человека и специфического определения Fc крысы. Затем IgG-положительные супернатанты анализировали на специфичность PD-L1 с помощью проточной цитометрии. Гибридомы также подвергали скринингу на перекрестную реакционную способность с PD-L1 яванских макак, и все они были положительными в отношении связывания.

Клетки гибридомы размножали, а осадок клеток замораживали для выделения РНК и секвенирования. Кодированные области V_H и V_L человеческих моноклональных антител идентифицировали с использованием РНК из соответствующих гибридом. РНК была обратно транскрибирована в кДНК, кодирующие области V были амплифицированы с помощью ПЦР, и продукты ПЦР были секвенированы, вставлены в вектор IgG1kappa человека, транзientно экспрессированы и очищены с помощью колоночной хроматографии на белке А, что привело к выделению ряда антител, представляющих особый интерес, которые были обозначены как 1В3, 3В6, 4А3, 7Н7, 8В1 и 9Н9.

Пример 9. Анализ для определения характеристик связывания моноклонального антитела человека с PD-L1

Микротитровальные планшеты покрывали рекомбинантным человеческим PD-L1-msFc в PBS, а затем блокировали 5% бычьим сывороточным альбумином в PBS. Очищенные человеческие моноклональные антитела к белку А добавляли при различных концентрациях и инкубировали при 37 °С. Планшеты промывали PBS/Tween, а затем инкубировали с Fc-специфическим козым анти-человеческим

IgG поликлональным реагентом, конъюгированным с пероксидазой хрена, при 37 °С. После промывания планшеты проявляли субстратом HRP и анализировали при OD 450-650 нм с использованием устройства для считывания микротитровальных планшетов. На Фиг. 8 показано, что антитела анти-PD-L1 прочно связывают человеческий PD-L1 как функция от концентрации антитела.

Чтобы установить, что яванские макаки являются подходящей моделью для тестирования моноклональных анти-PD-L1 антител, микротитровальные планшеты покрывали рекомбинантным яванских макак PD-L1-FLAG-HIS в PBS, а затем блокировали 5% бычьим сывороточным альбумином в PBS. Добавляли супернатанты гибридом или контрольный IgG крысы и инкубировали при 37 °С. Планшеты промывали PBS/Tween, а затем инкубировали с Fc-специфическим мышинным анти-крысиным IgG поликлональным реагентом, конъюгированным с пероксидазой хрена, при 37 °С. После промывания планшеты проявляли субстратом HRP и анализировали при OD 450-650 нм с использованием устройства для считывания микротитровальных планшетов. На фиг.9 показано, что антитела анти-PD-L1 связывают PD-L1 яванских макак.

Пример10. Блокирование связывания PD1

Эффект человеческих моноклональных антител на связывание растворимого PD1 с PD-L1 на поверхности клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. Клетки 293, экспрессирующие PD-L1, инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре с антителами с последующим добавлением человеческого PD1-биотина ([конечная] = 0,5 мг/мл). PD-L1, захваченный PD1, был обнаружен с помощью стрептавидина PE и проанализирован на приборе FACSCanto ПТМ (BD Biosciences, Нью-Джерси, США). На Фиг. 10 показано, что анти-PD-L1 антитела блокируют связывание PD-L1 с PD1 как функция от концентрации антитела.

Пример 11. Связывание с PD-L1 клетками

Способность анти-PD-L1 человеческих моноклональных антител связываться с PD-L1 на клетках, экспрессирующих PD-L1 на их поверхности, была исследована посредством проточной цитометрии следующим образом:

Антитела тестировали на связывание с клеточной линией человека, экспрессирующей PD-L1 человека на своей поверхности. Очищенные человеческие моноклональные антитела к белку А инкубировали с клетками 293, экспрессирующими человеческий PD-L1, при комнатной температуре на шейкере для планшетов. Через 20 минут клетки промывали PBS, содержащим 0,1% BSA и 0,05% NaN₃ (РВА), и связанные антитела выявляли путем инкубации клеток с Fc-специфическим козым анти-человеческим IgG зондом, меченным PE. Избыток зонда отмывали с клеток с помощью РВА и определяли ассоциированную с клетками флуоресценцию с помощью анализа с использованием прибора FACSCanto ИТМ (BD Biosciences, Нью-Джерси, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Как показано на Фиг. 11, человеческие моноклональные анти-PD-L1 антитела продемонстрировали высокие уровни связывания с клетками, экспрессирующими человеческий PD-L1, как функцию от концентрации антител.

Пример 12. Связывание с человеческими дендритными клетками

Способность анти-PD-L1 человеческих моноклональных антител связываться с PD-L1 на человеческих дендритных клетках исследовали посредством проточной цитометрии следующим образом:

Антитела тестировали на связывание с дендритными клетками человека, которые экспрессируют PD-L1 человека на своей поверхности. Дендритные клетки генерировали следующим образом: РМВС добавляли в колбы T175 см² и моноцитам давали возможность прикрепиться в течение ~ 2 часов при 37 °С, 6% CO₂. Неприкрепленные клетки удаляли, и моноциты культивировали в течение 7

дней в RPMI, содержащей 10% FBS, 10 нг/мл ИЛ-4 (R&D Systems) и 100 нг/мл GM-CSF (R&D Systems). Собирали неприлипшие клетки и подтверждали, что они являются дендритными клетками по экспрессии CD11c (не показано). Очищенные человеческие моноклональные антитела к белку А инкубировали с дендритными клетками при комнатной температуре на шейкере для планшетов. Через 20 минут клетки промывали PBS, содержащим 0,1% BSA и 0,05% NaN₃ (PBA), и связанные антитела выявляли путем инкубации клеток с Fc-специфическим козьим античеловеческим IgG зондом, меченным PE. Избыток зонда отмывали с клеток с помощью PBA и определяли ассоциированную с клетками флуоресценцию с помощью анализа с использованием прибора FACSCanto ПТМ (BD Biosciences, Нью-Джерси, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Как показано на Фиг. 12, человеческие моноклональные анти-PD-L1 антитела продемонстрировали высокие уровни связывания с дендритными клетками человека как функция от концентрации антител.

Пример 13. Биоанализ Т клеточной PD1/PD-L1 блокады

Влияние антител PD-L1 на блокаду взаимодействия PD1/PD-L1 определяли с использованием анализа блокады PD1/ PD-L1 от Promega. Две сконструированные клеточные линии, эффекторные клетки PD1 и клетки PD-L1 aAPC/CHO-K1, совместно культивировали в присутствии антител в течение 6 часов. Блокирование взаимодействия PD1/PD-L1 приводит к активации TCR и вызывает люминесценцию через путь NFAT. Люминесценцию регистрировали добавлением реагента Bio-Glo и количественно определяли на люминометре Perkin Elmer Victor X. Как показано на Фиг. 13, анти-PD-L1 антитела эффективно блокируют взаимодействие PD1/PD-L1 между клетками, что приводит к активации пути NFAT.

Пример 14. Смешанная лимфоцитарная реакция

Мононуклеарные клетки периферической крови человека выделяли из лейкоцитов с использованием разделения Ficoll, а клетки CD4⁺ дополнительно выделяли из

PMBC с использованием технологии разделения на магнитных шариках от Miltenyi Biotec. Аллогенные дендритные клетки генерировали следующим образом: PMBC добавляли в колбы T175 см² и моноцитам давали возможность прикрепиться в течение ~ 2 часов при 37 °C, 6% CO₂. Неприкрепленные клетки удаляли, и моноциты культивировали в течение 7 дней в RPMI, содержащей 10% FBS, 10 нг/мл ИЛ-4 (R&D Systems) и 100 нг/мл GM-CSF (R&D Systems). Собирали неприлипшие клетки и подтверждали, что они являются дендритными клетками по экспрессии CD11c (не показано). Клетки CD4⁺ и DC совместно инкубировали при соотношении 10: 1 в присутствии разведенных антител в течение 3 дней. Супернатанты собирали и анализировали на продукцию ИЛ-2 с помощью ELISA (R&D Systems). Как показано на Фиг. 14, анти-PD-L1-антитела способны вызывать значительный смешанный лимфоцитарный ответ.

Пример 15. Разработка и функциональное тестирование биспецифических конструкций

Тетравалентные биспецифические конструкции были разработаны с использованием полного остова человеческого IgG1 для моноклонального антитела PD-L1 и scFv моноклонального антитела CD27, генетически связанного с С-концом тяжелой цепи. Альтернативные биспецифические конструкции также были разработаны с использованием полного остова человеческого IgG1 для моноклонального антитела CD27 и scFv моноклонального антитела PD-L1. На Фиг. 15А показан типичный вектор, содержащий легкую цепь CD27, тяжелую цепь CD27 и одноцепочечный полипептид Fv (VL + VH) с-концевого PD-L1. Фиг. 15В и 15С представляют собой два альтернативных изображения биспецифического формата CD27/PD-L1. На Фиг. 15В показан белок биспецифического антитела CD27/PD-L1, в котором анти-PD-L1 антитело связано с scFv анти-CD27 (называемое здесь «CDX-527», когда антитело анти-PD-L1 представляет собой 9H9, а антитело анти-CD27 scFv происходит из 2B3. В ином случае AbXx2B3), а на Фиг. 15С показан белок биспецифического антитела CD27/PD-L1, где анти-CD27 антитело связано с анти-PD-L1 scFv. Фиг. 15D представляет собой таблицу созданных иллюстративных биспецифических конструкций анти-CD27/анти-PD-L1.

Полный 9H9x2B3 (CDX-527) последовательность тяжелой цепи была следующей (с последовательностью константного участка IgG1, выделенной жирным шрифтом):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGIISTYWMSWVRQAPGKGLEWVANIK
 QDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRVEDTAMYYCARDRPVAG
 ASALWGQGTLLTVSS**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV**
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSSGGGGSEIVMT
 QSPATLSVSPGERATLSCRASQSIRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA
 RFSGSGSGTEFTLTISSLQSENFVYYCQQYNNWPLTFGCGTKVEIKGGGGSGG
GGSGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTGYYIHWRQ
 APGQCLEWMGWINPNSGGTNSAQKFQDRVTITRVTSINTAYMELSRLRSDDTA
 VYFCARDRLVLPWFGEIFDAFDIWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:179)

9H9x2B3 (CDX-527) последовательность легкой цепи была следующей (с последовательностью константного участка, показанной жирным шрифтом):

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSIGWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSL
 ESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYYGSSRTFGQGTNVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC (SEQ ID NO:180)

Пример 16. Анализ определения характеристик связывания и функциональной активности биспецифического моноклонального антитела

Связывание биспецифических конструкций с CD27 и PD-L1 оценивали с помощью двухфакторного анализа ELISA. Антитело AbX представляет известное

моноклональное анти-PD-L1 антитело. Вкратце, микротитровальный планшет был покрыт человеческим CD27-FLAG-HIS. Разбавленным биспецифическим конструкциям позволяли связываться перед добавлением человеческого PD-L1-msFc, который был обнаружен с помощью меченного HRP козьего анти-мышинного IgG (Fc-специфического) антитела. Характерные кривые связывания для трех биспецифических конструкций (CD27xAbX, CD27x8B1 и CD27x9H9) показаны на Фиг. 16. Все три антитела продемонстрировали значительное связывание с CD27 и PD-L1.

Активацию пути CD27 оценивали путем измерения активации NFκB. Вкратце, CD27 трансфицировали в линию репортерных клеток NFκB-люциферазы (Signosis). Клетки инкубировали в течение 6 часов с каждой биспецифической конструкцией или антителом (1F5xAbX, 2B3x8B1, 2B3x9H9, 1F5, 2B3 или huIgG1) и экспрессию люциферазы определяли с помощью системы Brite-Glo™ (Promega). Примечание: линия репортерных клеток положительна в отношении PD-L1 человека. На Фиг. 17 показан уровень активации NFκB, индуцированной антителами, как функция от концентрации. Кроме того, биспецифическая конструкция 1F5xAbX, 2B3x8B1 и 2B3x9H9 показала значительно более высокую активацию NFκB, чем только 1F5 или 2B3.

Блокаду передачи сигнала PD-1 оценивали путем измерения активации пути NFAT. Вкратце, эффекторные клетки PD-1 и клетки PD-L1 aAPC совместно культивировали в присутствии разведений каждой биспецифической конструкции или контрольного антитела (CD27xAbX, CD27x8B1, CD27x9H9 или huIgG1). Активация пути NFAT посредством блокады PD-L1/PD-1 обнаруживается при добавлении реагента Bio-Glo™. (Имеющийся в продаже набор от Promega). Как показано на Фиг. 18, биспецифическая конструкция индуцировала сильную активацию пути NFAT в зависимости от концентрации антител.

Продукцию/секрецию ИЛ-2 также измеряли в смешанной лимфоцитарной реакции. Вкратце, клетки CD4 инкубировали в присутствии аллогенных дендритных клеток и разведениях каждой биспецифической конструкции или антитела (CD27xAbX, CD27x8B1, CD27x9H9, huIgG1, AbX, 8B1 или 9H9) в

течение 3 дней. Собирали супернатанты и оценивали уровни ИЛ-2 с помощью ELISA (R&D Systems). Типичные кривые концентрации ИЛ-2 показаны на Фиг. 19. Биспецифические конструкции CD27xAbX, CD27x8B1 и CD27x9H9 показали значительно более высокую продукцию/секрецию ИЛ-2, чем AbX (известное моноклональное анти-PD-L1 антитело), 8B1 или 9H9 только (например, примерно в 2 раза большую продукцию ИЛ-2).

Пример 17. Анализ для определения In vivo активности биспецифических конструкций CD27/PD-L1

Мышам HuCD27-Tg вводили 0,1 мг биспецифической конструкции CD27xAbX (BsAb) или CD27 моноспецифического антитела (mAb) и 5 мг овальбумина в день 0, как указано на оси x каждого графика. На 7 день собирали клетки селезенки и определяли внутриклеточный цитокин IFN γ и ИЛ-2, а также цитолитический фермент гранзим В (GrB) анализом проточной цитометрии со стимуляцией ex-vivo пептидом SIINFEKL и без нее. Показаны процентное содержание SIINFEKL-специфичных IFN- γ ⁺ и ИЛ-2⁺ в CD8 Т-клетках (Фиг. 20А) и процентное содержание GrB⁺ в CD8 Т-клетках без стимуляции SIINFEKL (Фиг. 20В), что указывает на то, что биспецифическая конструкция CD27xAbX индуцирует значительный ответ CD8 Т-клеток по сравнению с одним CD27 моноклональным антителом (например, ответ в от примерно 2,5 до примерно 8 раз выше).

Рост опухоли, выживаемость и количество опухолевых инфильтратов также измеряли у мышей, получавших BsAb или mAb. Мышам HuCD27-Tg вводили внутривенно клетки BCL1 (5×10^6) в день 0. Антитела или биспецифическую конструкцию вводили внутрибрюшинно (0,2 мг) на 5 день. Мышей разделяли на две группы. Одна группа была использована для измерения выживаемости (n = 8). На Фиг. 21 показан процент выживаемости во времени мышей, получавших моноклональное антитело CD27, моноклональное антитело PD-L1, комбинацию моноклональных антител CD27 + PD-L1 и CD27xAbX BsAb. Мыши, получавшие антитела к CD27 + PD-L1, выживали значительно дольше, чем мыши, получавшие моноклональное антитело CD27, моноклональное антитело PD-L1 или только Hu IgG1 (например, в 1,5-2 раза дольше). Более того, мыши, получавшие CD27xAbX

BsAb, выживали значительно дольше, чем мыши, получавшие любое из других тестируемых антител по отдельности или в комбинации. Фактически, от 70% до 80% мышей, получавших CD27xAbX BsAb, были все еще живы через 80 дней после инокуляции опухоли, тогда как все мыши в других группах погибли. Трех выжившим мышам повторно вводили такое же количество клеток BCL1 через 180 дней наблюдения, и они были защищены от повторного заражения.

Вторую группу мышей использовали для измерения массы опухоли и уровней Т-клеток на 11 день. Фиг. 22А-22D показывают массу опухоли, процент CD8 Т-клеток, процент CD4 Т-клеток и IFN γ и GrB дважды положительных CD8 Т-клеток, соответственно. Подобно данным о выживаемости, CD27xAbX BsAb значительно снижал массу опухоли (например, в 1,5–3 раза меньше) и значительно увеличивал количество и активность Т-клеток (например, в 1,5–4 раза больше) по сравнению с любым из других протестированных антител отдельно или в комбинации. На Фиг. 23А и 23В показано повышение уровня экспрессии PD-L1 на поверхности клеток лимфомы BCL1 (Фиг. 23А) и клеток, инфильтрированных в микроокружение опухоли (Фиг. 23В) при обработке с mAb к CD27 (CDX-1127), что дает обоснование для комбинации или BsAb анти-CD27 и анти-PD-L1.

Пример 18. Двухфакторный анализ ELISA

Были проанализированы характеристики и связывание биспецифической конструкции CDX-527 (полученной, как в примере 15). На Фиг. 15Е показана характеристика биспецифического антитела CDX-527 с помощью ВЭЖХ и гель-электрофореза (восстанавливающие условия). Связывание как с CD27, так и с PD-L1 определяли с помощью двухфакторного анализа ELISA, как описано в Примере 16. Результаты показаны на Фиг. 24, из которой можно видеть, что CDX-527 продемонстрировало значительное связывание с CD27 и PD-L1.

Пример 19. Активация NF κ B посредством биспецифической конструкции CDX-527

Активацию NFκB биспецифической конструкцией CDX-527 (полученной, как в Примере 15) определяли в общем, как описано в Примере 16, за исключением того, что вместо BriteGlo™ использовали реагент SteadyGlo™ от Promega.

Результаты показаны на Фиг. 25, которая показывает более высокий уровень активации CDX-527 по сравнению с моноспецифическими анти-CD27 антителами 1F5 и 2B3 отдельно. Активацию также измеряли в присутствии растворимого FcγR1, который дополнительно увеличивал активацию NFκB, как показано.

Пример 20. Смешанная лимфоцитарная реакция

Способность биспецифической конструкции CDX-527 (полученной, как в примере 15) вызывать смешанный лимфоцитарный ответ определяли способом, описанным в целом в Примере 14, с тестированием на ИЛ-2.

Результаты показаны на Фиг. 26, из которой можно увидеть, что CDX-527 было способно вызывать значительный смешанный лимфоцитарный ответ, который также был значительно выше, чем для моноспецифических антител 2B3 и 9H9 при использовании по отдельности или в комбинации.

Пример 21. Т-клеточная активация

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из препаратов лейкоцитарной пленки, а CD3⁺ клетки дополнительно выделяли из PBMC с использованием технологии разделения магнитными шариками от Miltenyi Biotec. Клетки CD3⁺ (1×10^5) помещали в лунки, покрытые анти-CD3-антителом (ОКТ3, eBioscience) и растворимым человеческим PD-L1. Антитела 2B3 и 9H9 или CDX-527 (полученные, как в Примере 15) добавляли к клеткам при концентрациях от 0,1 нМ до 10 нМ. Планшеты инкубировали при 37 ° C, 5% CO₂ в течение 72 часов, после чего измеряли уровни ИЛ-2 в супернатантах.

Результаты показаны на Фиг. 27, из которой можно увидеть, что CDX-527 значительно активировал Т-клетки и делал это в значительно большей степени, чем моноспецифические антитела 2В3 и 9Н9 при использовании в комбинации.

Пример 22. Фармакокинетика

Фармакокинетика CDX-527 изучалась на нечеловеческих приматах (NHP) при уровне дозы 7,0 мг/кг и объеме 3,0 мл/кг внутривенно. Никаких значительных изменений каких-либо клинических параметров в течение 21 дня исследования не наблюдалось. Уровни CDX-527 в сыворотке определяли с помощью ELISA.

Результаты показаны на Фиг. 28. Фармакокинетический анализ показал $T_{1/2}$ около 110 часа.

Пример 23. Анализ блокирования PD1/PDL1 на основе клеток

Биспецифические антитела 9Н9х2В3 и противоположную конфигурацию 2В3х9Н9 сравнивали в анализе блокирования PD1/PDL1 на основе клеток, как в общем описано в Примере 13.

Результаты показаны на Фиг. 29, из которого можно увидеть, что конфигурация 9Н9х2В3 была более эффективной при блокаде передачи сигналов PD-1, чем конфигурация 2В3х9Н9.

Пример 24. Смешанная лимфоцитарная реакция

Биспецифические антитела 9Н9х2В3 и противоположную конфигурацию 2В3х9Н9 сравнивали в смешанной лимфоцитарной реакции, как правило, как описано в Примере 14.

Результаты показаны на Фиг. 30, из которой можно увидеть, что конфигурация 9Н9х2В3 была более сильной при активации Т-клеток, чем конфигурация 2В3х9Н9.

Пример 25. Вызванный вакциной CD8 Т-клеточный ответ

Биспецифические антитела AbXх2В3 и 2В3хAbX с противоположной конфигурацией сравнивали на вакцинной модели Т-клеточного ответа в целом, как описано в Примере 17.

Результаты показаны на Фиг. 31, из которой видно, что AbXх2В3 было более эффективным, чем 2В3хAbX при стимуляции индуцированного вакциной CD8+ Т-клеточного ответа.

Пример 26. Опухолевая модель BCL1

Биспецифические антитела AbXх2В3 и 2В3хAbX с противоположной конфигурацией сравнивали на модели опухоли BCL1, как описано в Примере 17.

Результаты показаны на Фиг. 32, из которой видно, что AbXх2В3 имело более высокую противоопухолевую активность, чем 2В3хAbX.

Пример 27. Блокирование связывания PD-L1 с CD80

Микротитровальный планшет покрывали рекомбинантным CD80 человека, затем блокировали. Биотинилированный huPD-L1 предварительно инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с 50 мкг/мл контрольного huIgG1 или анти-PD-L1 антител (AbX или 9Н9), затем добавляли на планшет. Стрептавидин-HRP использовали для обнаружения связывания PD-L1 с CD80.

Результаты показаны на Фиг. 33, из которой видно, что анти-PD-L1 антитела полностью блокировали связывание PD-L1 с CD80.

Пример 28. Связывание 2B3 с huCD27

Полноразмерный внеклеточный домен (ECD) дикого типа человеческого CD27 или человеческого CD27 с мутированными аминокислотами 85, 87, 88 и 89 (A85S, R87A, N88A и G89A; см. Фиг. 34) наносили на планшет, а затем блокировали. Добавляли супернатант транзientно трансфицированных клеток, экспрессирующих mAb 2B3, и связывание обнаруживали с помощью конъюгированного с HRP козьего анти-человеческого IgG Fc поликлонального антитела.

Результаты показаны на Фиг. 35, из которого можно увидеть, что анти-CD27 антитело 2B3 не связывалось с мутированным CD27 ECD. Соответственно, это указывает на то, что антитело 2B3 связывается с эпитопом на человеческом CD27, содержащего или включающего один или несколько остатков аминокислот 80-95, например, один или несколько остатков аминокислот 85-89 внеклеточного домена (ECD) человеческого CD27 (SEQ ID NO: 183), например, аминокислоты 85, 87, 88 и/или 89 ECD человеческого CD27 (SEQ ID NO: 183).

Пример 29. Увеличение экспрессии 9H9x2B3 посредством конструирования белка 9H9-2B3 (DD)

Для увеличения экспрессии биспецифического продукта каждый из редкого остатка валина (V) в H72 в FR3 тяжелой цепи 2B3 и редкого остатка аспарагина (N) в L82 в FR3 легкой цепи 2B3 были заменены на остатки аспарагиновой кислоты (D) (т.е. V72D и N82D соответственно).

Последовательность тяжелой цепи модифицированного 2B3 была следующей (CDR подчеркнуты, и модифицированный остаток в FR3 дважды подчеркнут):

**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYIHWVRQAPGQGLEWMGWI
NPNSGGTNSAOKFQDRVTITRDTSINTAYMELSRRLRSDDTAVYFCARDRRLVLP
WFGEIFPDAFDIWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:177)**

Последовательность легкой цепи модифицированного 2B3 была следующей (CDR подчеркнуты, и модифицированный остаток в FR3 дважды подчеркнут):

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTR
ATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFGGGGTKVEIK
 (SEQ ID NO:178)

Эти последовательности (обозначенные 2B3 (DD)) использовали в формате scFv, который был генетически связан с С-концом тяжелых цепей антитела 9H9. Полученное биспецифическое антитело 9H9x2B3 (DD) было обозначено как 9H9x2B3 (DD).

Последовательность тяжелой цепи 9H9x2B3(DD) полной длины была следующей (где константная последовательность «основной цепи» IgG1 выделена жирным шрифтом):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGIISTYWMSWVRQAPGKGLEWVANIK
 QDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTAMYYCARDRPVAG
 ASALWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
 SNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
 VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTA
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSSGGGGSEIVMT
 QSPATLSVSPGERATLSCRASQSIRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA
 RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFGCGTKVEIKGGGGSGG
GGSGGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYIHWRQ
 APGQCLEWMGWINPNSGGTNSAQKFQDRVTITRDTSINTAYMELSRLRSDDTA
 VYFCARDRLVLPWFGEIFPDADFIDWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:181)

Последовательность тяжелой цепи 9H9x2B3(DD) была следующей (с константным участком, показанной жирным шрифтом):

DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISGWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSL
 ESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQYYGSSRTFGQGTNVEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC (SEQ ID NO:182)

Последовательность ДНК последовательности переменного домена
 9H9x2B3(DD) была следующей:

GAAGTGCAACTGGTGGAGTCGGGTGGTGGACTCGTGCAGCCCGGCGGATCC
 CTGAGACTCTCTTGTGCCGCATCGGGCGGCATTATTAGCACTTACTGGATGT
 CATGGGTCAGACAGGCACCGGAAAGGGCTTGAATGGGTGGCGAATATC
 AAGCAGGATGGATCCGAGAAGTACTACGTGGACTCCGTGAAGGGCAGATTC
 ACCATTTCCCGGACAACGCCAAGAAGTCTGCTCTATCTGCAAATGAACTCGT
 TGCGGGTGGAAAGATACTGCCATGTACTACTGCGCCCGGACCGGCCTGTGG
 CCGGGGCGTTCGGCCCTCTGGGGCCAGGGCACTCTGGTCACCGTGTCTCT
 (SEQ ID NO:185)

Последовательность ДНК последовательности домена scFv 9H9x2B3(DD) была
 следующей (коннекторная и линкерная последовательности показаны жирным
 шрифтом):

GGCTCCAGCGGGGGTGGCGGTTCCGAGATCGTGATGACTCAGAGCCCGG
 CAACCCTGTCCGTGTCTCCGGGGGAGCGGGTACTCTTTCCTGCCGGGCATC
 CCAGTCCATCCGGTCGAACCTTGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGACAGGC
 GCCCGCCTGCTGATCTACGGGGCGTCGACTAGGGCCACCGGCATCCCGGC
 CCGCTTCTCCGGGTCCGGATCCGGCACCGAATTCACCCTACCATCTCGAGC
 CTGCAGTCCGAAAACCTTCGCCGTCTACTACTGCCAGCAGTACAACAACCTGG
 CCGCTGACATTCGGATGCGGAACCAAGTGGAAATCAAG**GGCGGCGGCGG**
ATCCGGCGGTGGCGGCAGCGGCGGTGGAGGATCCGGTGGCGGCGGTT
CACAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGCGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGGGCC
 AGCGTGAAAGTCAGCTGCAAGGCTTCCGGATACACCTTCACGGGTACTAC
 ATTCACTGGGTTCGCCAAGCGCCCGGGCAGTGTCTGGAGTGGATGGGATGG

ATCAACCCTAACTCGGGGGGAACCAACTCGGCCCAAAGTTCCAGGACCGG
 GTCACCATTACAAGAGTCACGTCCATCAACACTGCCTACATGGAGTTGAGC
 CGGCTGCGATCAGACGACACCGCCGTGTACTTCTGCGCGAGGGACCGCCTC
 GTCCTCCCGTGGTTTGGAGAGATCTTCCCGGATGCCTTCGACATTTGGGGAC
 AGGGGACCCTCGTGACTGTGTCCAGC (SEQ ID NO:186)

Последовательность ДНК варибельной последовательности легкой цепи 9H9x2B3(DD) была следующей:

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCCACCCTTTCGCGAGCGTCGGCGAC
 AGAGTGACCATTACTIONTGTTCGGGCCTCGCAAAGCATCTCCGGCTGGCTGGCTT
 GGTACCAGCAAAAGCCTGGAAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACAAGGCCT
 CATCCCTGGAGTCCGGAGTGCCTTCACGCTTTTCGGGGAGCGGATCGGGGA
 CTGAGTTCACCCTCACCATTTCTCCCTGCAACCCGACGATTTTCGCGACATA
 CTACTIONGCCAGCAGTACTACGGTTCCTCGCGCACGTTTCGGACAGGGCACTAA
 CGTCGAGATCAAG (SEQ ID NO:187)

Как видно из Фиг. 36, транзиентные трансфекции показали улучшенную продукцию (экспрессию) модифицированной конструкции 9H9-2B3 (DD) по сравнению с исходной (немодифицированной) конструкцией 9H9-2B3.

Обзор перечня последовательностей

SEQ ID NO:1 3C2 V _H CDR1	GYYWS
SEQ ID NO:2 3C2 V _H CDR2	YNYYSGSTNYPNPSLKS
SEQ ID NO:3 3C2 V _H CDR3	YPLIRGAFDY
SEQ ID NO:4 3C2 V _L CDR1	RSSQNLLHTNGYNYLD
SEQ ID NO:5 3C2 V _L CDR2	LGSNRAS
SEQ ID NO:6 3C2 V _L CDR3	MQALQTPLT
SEQ ID NO:7 2B3 V _H CDR1	GYYIH

SEQ ID NO:8 2B3 V _H CDR2	WINPNSGGTNSAQKFQD
SEQ ID NO:9 2B3 V _H CDR3	DRLVLPWFGEIFPDAFDI
SEQ ID NO:10 2B3 V _L CDR1	RASQSIRSNLA
SEQ ID NO:11 2B3 V _L CDR2	GASTRAT
SEQ ID NO:12 2B3 V _L CDR3	QQYNNWPLT
SEQ ID NO:13 3C2 V _H – с сигнальной последовательн остью	MKHLWFCLLLVAAPRWVLSQAQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSTGSIS GYYWSWIRQPPGKGLEWIGYNYYSGSTNYPNPSLKSRVTISIDTSKNQFS LKLNSVTAADTAVYYCARYPLIRGAFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:14 3C2 V _L – с сигнальной последовательн остью	MRLPAQLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQNL LHTNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDF LKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPLTFGGGKVEIK
SEQ ID NO:15 2B3 V _H – с сигнальной последовательн остью	MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGY TFTGYYIHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNSAQKFQDRVTITRVT SINTAYMELSRLSDDTAVYFCARDRLVLPWFGEIFPDAFDIWDGQGT LVTVSS
SEQ ID NO:16 2B3 V _L – с сигнальной последовательн остью	MEAPAQLLFLLLWLPDSTGEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIR SNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQ SENFVYYCQQYNNWPLTFGGGKVEIK
SEQ ID NO:17 3C2 V _H – без сигнальной последовательн ости	QAQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSTGSISGYYWSWIRQPPGKGLEWIG YNYYSGSTNYPNPSLKSRVTISIDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCARY PLIRGAFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:18 3C2 V _L – без сигнальной последовательн ости	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQNLHTNGYNYLDWYLQKPGQSP QLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAL QTPLTFGGGKVEIK
SEQ ID NO:19 2B3 V _H – без сигнальной последовательн ости	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYYIHWVRQAPGQGLE WMGWINPNSGGTNSAQKFQDRVTITRVTISINTAYMELSRLSDDTAVY FCARDRLVLPWFGEIFPDAFDIWDGQGT LVTVSS
SEQ ID NO:20 2B3 V _L – без сигнальной последовательн ости	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIRSNLAWYQQKPGQAPRLLIY GASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSENFVYYCQQYNNWPLTF GGGKVEIK

<p>SEQ ID NO:21 3C2 V_H ДНК последовательность – с сигнальной последовательностью</p>	<p>ATGAAACATCTGTGGTTCTGCCTTCTCCTGGTGGCAGCTCCCAGATG GGTCCTGTCCCAGGCGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTACTGGCTC CATCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAG GGACTGGAGTGGATTGGGTATAATTATTACAGTGGGAGCACCAACT ACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAATAGACACGTC CAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAATTCTGTGACCGCTGCGGAC ACGGCCGTATATTACTGTGCGAGATATCCTCTGATTCGGGGAGCTTT TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA</p>
<p>SEQ ID NO:22 3C2 V_L ДНК последовательность – с сигнальной последовательностью</p>	<p>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAATGCTCTGGGTCTC TGGATCCAGTGGGGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGC CCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGTAGGTCTAGTCAG AACCTCCTGCATACTAATGGCTACAACCTATTTGGATTGGTACCTGCA GAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTCTAATC GGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCAC AGATTTTACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGG GTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAACTCCGCTCACTTTCGGCGG AGGGACCAAGGTGGAGATCAAA</p>
<p>SEQ ID NO:23 2B3 V_H ДНК последовательность – с сигнальной последовательностью</p>	<p>ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCACAG GAGCCCACTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAA GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATAC ACCTTACCCGGCTACTATATACTGGGTGCGACAGGCCCTGGAC AAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCAC AACTCTGCACAGAAGTTTCAGGACAGGGTCACCATCACCAGGGTC ACGTCCATCAACACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGACTGAGATCTG ACGACACGGCCGTGATTTCTGTGCGAGAGATCGGCTCGTATTACCA TGTTTCGGGGAAATATTCAGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGG GACATTGGTCAACCGTCTCTCA</p>
<p>SEQ ID NO:24 2B3 V_L ДНК последовательность – с сигнальной последовательностью</p>	<p>ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCCTCCTGCTACTCTGGCTCCC AGATTCCACTGGAGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTG TCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTC AGAGTATTAGGAGCAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTA TCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTC ACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAAATTTTGCAGTTTATTACTGTCA GCAGTATAATAACTGGCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTG GAGATCAAA</p>
<p>SEQ ID NO:25 3C2 V_H ДНК последовательность – без сигнальной последовательности</p>	<p>CAGGCGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGG AGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTACTGGCTCCATCAGTGGT TACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGCCCCAGGGAAGGGACTGGAGT GGATTGGGTATAATTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCCCTC CCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAATAGACACGTCCAAGAACCAG TTCTCCCTGAAGCTGAATTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTATA TACTGTGCGAGATATCCTCTGATTCGGGGAGCTTTTGACTACTGGG GCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA</p>
<p>SEQ ID NO:26 3C2 V_L ДНК последовательность – без сигнальной</p>	<p>GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCAACCCCTGG AGAGCCGGCCTCCATCTCCTGTAGGTCTAGTCAGAACCTCCTGCATA CTAATGGCTACAACCTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCA GTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTCTAATCGGGCCTCCGGGG TCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACTG</p>

последовательности	AAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCA TGCAAGCTCTACAAACTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGT GGAGATCAAA
SEQ ID NO:27 2B3 V _H ДНК последовательность – без сигнальной последовательности	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGG CCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGC TACTATATACACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGT GGATGGGATGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCACAACCTCTGCACA GAAGTTTCAGGACAGGGTCACCATCACCAGGGTCACGTCCATCAAC ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGACTGAGATCTGACGACACGGCCG TGTATTTCTGTGCGAGAGATCGGCTCGTATTACCATGGTTCGGGGAA ATATTTCCAGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACATTGGTCCAC CGTCTCTTCA
SEQ ID NO:28 2B3 V _L ДНК последовательность – без сигнальной последовательности	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGG GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTAGGAGC AACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCC TCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTC AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCAGCC TGCAGTCTGAAAATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAAC TGGCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
SEQ ID NO:29 7H7 V _H CDR1	TSWMS
SEQ ID NO:30 7H7 V _H CDR2	NIKQDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO:31 7H7 V _H CDR3	DRPVAGASAL
SEQ ID NO:32 7H7 V _L CDR1	RASQSIGWLA
SEQ ID NO:33 7H7 V _L CDR2	KASSLES
SEQ ID NO:34 7H7 V _L CDR3	QQYYGSSRT
SEQ ID NO:35 1B3 V _H CDR1	TSWMS
SEQ ID NO:36 1B3 V _H CDR2	NIKQDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO:37 1B3 V _H CDR3	DRPVAGASAL
SEQ ID NO:38 1B3 V _L CDR1	RASQSIGWLA
SEQ ID NO:39 1B3 V _L CDR2	KASSLES
SEQ ID NO:40 1B3 V _L CDR3	QQYYGSSRT
SEQ ID NO:41 3B6 V _H CDR1	TYWMS
SEQ ID NO:42 3B6 V _H CDR2	NIKQDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO:43 3B6 V _H CDR3	DRPVAGASAL
SEQ ID NO:44	RASQSIGWLA

3B6 V _L CDR1	
SEQ ID NO:45 3B6 V _L CDR2	KASSLES
SEQ ID NO:46 3B6 V _L CDR3	QQYYGSSRT
SEQ ID NO:47 8B1 V _H CDR1	THWMS
SEQ ID NO:48 8B1 V _H CDR2	NIKQDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO:49 8B1 V _H CDR3	DRPVAGASAL
SEQ ID NO:50 8B1 V _L CDR1	RASQSISGWLA
SEQ ID NO:51 8B1 V _L CDR2	KASSLES
SEQ ID NO:52 8B1 V _L CDR3	QQYYGSSRT
SEQ ID NO:53 4A3 V _H CDR1	SSWMS
SEQ ID NO:54 4A3 V _H CDR2	NIKQDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO:55 4A3 V _H CDR3	DRPVAGASAL
SEQ ID NO:56 4A3 V _L CDR1	RASQSISGWLA
SEQ ID NO:57 4A3 V _L CDR2	KASSLES
SEQ ID NO:58 4A3 V _L CDR3	QQYYGSSRT
SEQ ID NO:59 9H9 V _H CDR1	TYWMS
SEQ ID NO:60 9H9 V _H CDR2	NIKQDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO:61 9H9 V _H CDR3	DRPVAGASAL
SEQ ID NO:62 9H9 V _L CDR1	RASQSISGWLA
SEQ ID NO:63 9H9 V _L CDR2	KASSLES
SEQ ID NO:64 9H9 V _L CDR3	QQYYGSSRT
SEQ ID NO:65 7H7 V _H – с сигнальной последовательн остью	MELGLSXVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTIS TSWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRVEDTAIYYCARDRPVAGASALWGQGTLTVSS
SEQ ID NO:66 7H7 V _L – с сигнальной	MRVPAQLLGLLLLWLPGAKCDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSI SGWLAWYQQKQKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYYGSSRTFGQGTNVEIK

последовательн остью	
SEQ ID NO:67 1B3 V _H – с сигнальной последовательн остью	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTI STSWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRVEDTAMYYCARDRPVAGASALWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO:68 1B3 V _L – с сигнальной последовательн остью	MRVPAQLLGLLLLWLPQAKCDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSI SGWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ PDDFATYYCQYYGSSRTFGQGTNVEIK
SEQ ID NO:69 3B6 V _H – с сигнальной последовательн остью	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTT STYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AK KNSLNLQMNSLRVEDTAIYYCARDRPVAGASALWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO:70 3B6 V _L – с сигнальной последовательн остью	MRVPAQLLGLLLLWLPQAKCDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSI SGWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ PDDFATYYCQYYGSSRTFGQGTNVEIK
SEQ ID NO:71 8B1 V _H – с сигнальной последовательн остью	MELGLSWVFLVAILEGVKCEVRLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIIS THWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNTLRVEDTAIYYCTRDRPVAGASALWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO:72 8B1 V _L – с сигнальной последовательн остью	MRVPAQLLGLLLLWLPQAKCDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSI SGWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPLRFSGSGSGTEFTLTISSL QPDDFATYYCQYYGSSRTFGQGTNVEIK
SEQ ID NO:73 4A3 V _H – с сигнальной последовательн остью	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGIIS SSWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AK DLLYLQMNSLRVEDTALYYCARDRPVAGASALWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO:74 4A3 V _L – с сигнальной последовательн остью	MRVPAQLLGLLLLWLPQAKCDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSI SGWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ PDDFATYYCQYYGSSRTFGQGTNVEIK
SEQ ID NO:75 9H9 V _H – с сигнальной последовательн остью	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGIIS TYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRVEDTAMYYCARDRPVAGASALWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO:76 9H9 V _L – с сигнальной	MRVPAQLLGLLLLWLPQAKCDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSI SGWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ PDDFATYYCQYYGSSRTFGQGTNVEIK

последовательн остью	
SEQ ID NO:77 7H7 V _H – без сигнальной последовательн ости	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRSCAASGGTISTSWMSWVRQAPGKGLEW VANI KQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRVEDTAIYY CARDRPVAGASALWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:78 7H7 V _L – без сигнальной последовательн ости	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGWLAWYQQKQGKAPKLLIY KASSLES GVP SRFSGSGSGTEFTLTISLQPD DFATYYCQQYYGSSRTFG QGTNVEIK
SEQ ID NO:79 1B3 V _H – без сигнальной последовательн ости	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRSCAASGGTISTSWMSWVRQAPGKGLEW VANI KQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRVEDTAMY YCARDRPVAGASALWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:80 1B3 V _L – без сигнальной последовательн ости	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLES GVP SRFSGSGSGTEFTLTISLQPD DFATYYCQQYYGSSRTFG QGTNVEIK
SEQ ID NO:81 3B6 V _H – без сигнальной последовательн ости	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRSCAASGGTTSTYWMSWVRQAPGKGLE WVANI KQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLNLQMNSLRVEDTAIY YCARDRPVAGASALWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:82 3B6 V _L – без сигнальной последовательн ости	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLES GVP SRFSGSGSGTEFTLTISLQPD DFATYYCQQYYGSSRTFG QGTNVEIK
SEQ ID NO:83 8B1 V _H – без сигнальной последовательн ости	EVR L VESGGGLVQP GGSRLRSCAASGDIISTHWMSWVRQAPGKGLEW VANI KQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNTLRVEDTAIYY CTRDRPVAGASALWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:84 8B1 V _L – без сигнальной последовательн ости	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLES GVP LRFSGSGSGTEFTLTISLQPD DFATYYCQQYYGSSRTFG QGTNVEIK
SEQ ID NO:85 4A3 V _H – без сигнальной последовательн ости	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRSCAASGGIISSSWMSWVRQAPGKGLEWV ANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKDLLYLQMNSLRVEDTALYYC ARDRPVAGASALWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:86 4A3 V _L – без сигнальной	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSIGWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLES GVP SRFSGSGSGTEFTLTISLQPD DFATYYCQQYYGSSRTFG QGTNVEIK

последовательн ости	
SEQ ID NO:87 9H9 V _H – без сигнальной последовательн ости	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGIISTYWMSWVRQAPGKGLEW VANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTAMY YCARDRPVAGASALWGQGLVTVSS
SEQ ID NO:88 9H9 V _L – без сигнальной последовательн ости	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSSISGWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYYGSSRTFG QGTNVEIK
SEQ ID NO:89 7H7 V _H ДНК последовательн ость – с сигнальной последовательн остью	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGNGTTTTTCCTTGTTGCTATTTTAGAAGG TGTCCAGTGTGAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGGCA CCATTAGTACCTCTTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA GGGGCTGGAATGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAA ATATTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA ACGCCAAGAACTCACTGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGA GGACACGGCTATATATTACTGTGCGAGAGATCGTCCAGTGGCTGGT GCGTCGGCCCTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCCCGTCTCCTCA
SEQ ID NO:90 7H7 V _L ДНК последовательн ость – с сигнальной последовательн остью	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCC AGGTGCCAAATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCA GAGTATAAGTGGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACAAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGT CCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTC ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCA ACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAATGTGG AAATCAAA
SEQ ID NO:91 1B3 V _H ДНК последовательн ость – с сигнальной последовательн остью	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTTCCTTGTTGCTATTTTAGAAGG TGTCCAGTGTGAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGGCA CCATTAGTACCTCTTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA GGGGCTGGAATGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAA ATATTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA ACGCCAAGAACTCACTGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGA AGACACGGCTATGTATTACTGTGCGAGAGATCGTCCAGTGGCTGGT GCGTCGGCCCTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCCCGTCTCCTCA
SEQ ID NO:92 1B3 V _L ДНК последовательн ость – с сигнальной последовательн остью	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCC AGGTGCCAAATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCA GAGTATTAGTGGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGT CCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTC ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCA ACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAATGTGG AAATCAAA
SEQ ID NO:93 3B6 V _H ДНК	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTTCCTTGTTGCTATTTTAGAAGG TGTCCAGTGTGAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC

последовательность – с сигнальной последовательностью	CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGGCA CAACCAGTACCTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAA GGGGCTGGAATGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAA ATATTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA ACGCCAAGAACTCACTGAATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGA GGACACGGCTATATATTACTGTGCGAGAGATCGTCCAGTGGCTGGT GCGTCGGCCCTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO:94 3B6 V _L ДНК последовательность – с сигнальной последовательностью	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCC AGGTGCCAAATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCA GAGTATTAGTGGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGT CCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTC ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCA ACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAATGTGG AAATCAAA
SEQ ID NO:95 8B1 V _H ДНК последовательность – с сигнальной последовательностью	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTGCTATTTTAGAAGG TGTC AAGTGTGAGGTGCGACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGACAT AATTAGTACCATTTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAG GGGCTGGAATGGGTGGCCAACATAAAACAAGATGGAAGTGAGAAG TATTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA CGCCAAGAACTCACTGTATTTGCAAATGAACACCCTGAGAGTCGAG GACACGGCTATATATTACTGTACGAGAGATCGTCCAGTGGCTGGTG CGTCGGCCCTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO:96 8B1 V _L ДНК последовательность – с сигнальной последовательностью	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCC AGGTGCCAAATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCA GAGTATTAGTGGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGT CCCATTAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTC ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCA ACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAATGTGG AAATCAAA
SEQ ID NO:97 4A3 V _H ДНК последовательность – с сигнальной последовательностью	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTGCTATTTTAGAAGG TGTC CAGTGTGAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC CAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGGCA TCATTAGTTCTTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAG GGGCTGGAATGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAA TATTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA CGCCAAAGACTTACTGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAG GACACGGCTTTATATTACTGTGCGAGAGATCGTCCAGTGGCTGGTGC GTCGGCCCTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTACCGTCTCCTCT
SEQ ID NO:98 4A3 V _L ДНК последовательность – с сигнальной последовательностью	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCC AGGTGCCAAATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCA GAGTATTAGTGGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGT CCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTC ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCA

	ACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAATGTGG AAATCAAA
SEQ ID NO:99 9Н9 V _H ДНК последовательн ость – с сигнальной последовательн остью	ATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTGCTATTTTAGAAGG TGCCAGTGTGAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGGCAT CATAGTACCTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAATGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAA TATTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA CGCCAAGAACTACTGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAG GACACGGCTATGTATTACTGTGCGAGAGATCGTCCAGTGGCTGGTG CGTCGGCCCTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO:100 9Н9 V _L ДНК последовательн ость – с сигнальной последовательн остью	ATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCCC AGGTGCCAAATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCA GAGTATTAGTGGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGT CCCATCAAGGTTACAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTC ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCA ACAGTATTATGGTTCTTCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAATGTGG AAATCAAA
SEQ ID NO:101 7Н7 V _H ДНК последовательн ость – без сигнальной последовательн ости	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGGCACCATTAGTACC TCTTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAAT GGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATATTATGTGGA CTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC TCACTGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTA TATATTACTGTGCGAGAGATCGTCCAGTGGCTGGTGCCTCGGCCCTC TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO:102 7Н7 V _L ДНК последовательн ость – без сигнальной последовательн ости	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGG AGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATAAGTGGC TGTTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACAAGGGAAAGCCCCTAAGCTCC TGATCTATAAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACCATCAGCAGCC TGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATTATGGT TCTTCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAATGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO:103 1В3 V _H ДНК последовательн ость – без сигнальной последовательн ости	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGGCACCATTAGTACC TCTTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAAT GGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATATTATGTGGA CTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC TCACTGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAAGACACGGCTA TGTATTACTGTGCGAGAGATCGTCCAGTGGCTGGTGCCTCGGCCCTC TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO:104 1В3 V _L ДНК последовательн ость – без сигнальной последовательн ости	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGG AGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTGGC TGTTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCC TGATCTATAAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTCTCACCATCAGCAGCC TGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATTATGGT TCTTCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAATGTGGAAATCAAA

SEQ ID NO:105 3B6 V _H ДНК последовательность – без сигнальной последовательности	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGGCACAACCAGTACC TATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAAT GGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATATTATGTGGA CTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC TCACTGAATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTA TATATTACTGTGCGAGAGATCGTCCAGTGGCTGGTGCCTCGGCCCTC TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO:106 3B6 V _L ДНК последовательность – без сигнальной последовательности	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGG AGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTGGC TGTTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCCTAAGCTCC TGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACCATCAGCAGCC TGCAGCCTGATGATTTTGCACCTTATTACTGCCAACAGTATTATGGT TCTTCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAATGTGGAAATCAA
SEQ ID NO:107 8B1 V _H ДНК последовательность – без сигнальной последовательности	GAGGTGCGACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGACATAATTAGTACC CATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAAT GGGTGGCCAACATAAACAAGATGGAAGTGAGAAGTATTATGTGGA CTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC TCACTGTATTTGCAAATGAACACCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTA TATATTACTGTACGAGAGATCGTCCAGTGGCTGGTGCCTCGGCCCTC TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO:108 8B1 V _L ДНК последовательность – без сигнальной последовательности	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGG AGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTGGC TGTTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCCTAAGCTCC TGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATTAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACCATCAGCAGCC TGCAGCCTGATGATTTTGCACCTTATTACTGCCAACAGTATTATGGT TCTTCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAATGTGGAAATCAA
SEQ ID NO:109 4A3 V _H ДНК последовательность – без сигнальной последовательности	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGGCATCATTAGTTCC TCTTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAAT GGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATATTATGTGGA CTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAC TACTGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTTT ATATTACTGTGCGAGAGATCGTCCAGTGGCTGGTGCCTCGGCCCTC GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCT
SEQ ID NO:110 4A3 V _L ДНК последовательность – без сигнальной последовательности	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGG AGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTGGC TGTTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCCTAAGCTCC TGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACCATCAGCAGCC TGCAGCCTGATGATTTTGCACCTTATTACTGCCAACAGTATTATGGT TCTTCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAATGTGGAAATCAA
SEQ ID NO:111 9H9 V _H ДНК последовательность – без сигнальной	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGG GGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGGCATCATTAGTACC TATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAAT GGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATATTATGTGGA CTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC

последовательности	TCACTGTATTTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTA TGTATTACTGTGCGAGAGATCGTCCAGTGGCTGGTGCCTCGGCCCTC TGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO:112 9H9 V _L ДНК последовательность – без сигнальной последовательности	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGG AGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTGGC TGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCC TGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTC AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCCTCTCACCATCAGCAGCC TGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATTATGGT TCTTCTCGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAATGTGGAAATCAA
SEQ ID NO:113 3C2 V _H CDR1 (Chothia)	TGSISGY
SEQ ID NO:114 3C2 V _H CDR2 (Chothia)	YYSGS
SEQ ID NO:115 3C2 V _H CDR3 (Chothia)	YPLIRGAFDY
SEQ ID NO:116 3C2 V _L CDR1 (Chothia)	RSSQNLLHTNGYNYLD
SEQ ID NO:117 3C2 V _L CDR2 (Chothia)	LGSNRAS
SEQ ID NO:118 3C2 V _L CDR3 (Chothia)	MQALQTPLT
SEQ ID NO:119 2B3 V _H CDR1 (Chothia)	GYTFTGY
SEQ ID NO:120 2B3 V _H CDR2 (Chothia)	NPNSGG
SEQ ID NO:121 2B3 V _H CDR3 (Chothia)	DRLVLPWFGEIFPDAFDI
SEQ ID NO:122 2B3 V _L CDR1 (Chothia)	RASQSIRSNLA
SEQ ID NO:123 2B3 V _L CDR2 (Chothia)	GASTRAT
SEQ ID NO:124 2B3 V _L CDR3 (Chothia)	QQYNNWPLT
SEQ ID NO:125 7H7 V _H CDR1 (Chothia)	GGTISTS
SEQ ID NO:126	KQDGSE

7H7 V _H CDR2 (Chothia)	
SEQ ID NO:127 7H7 V _H CDR3 (Chothia)	DRPVAGASAL
SEQ ID NO:128 7H7 V _L CDR1 (Chothia)	RASQSISGWLA
SEQ ID NO:129 7H7 V _L CDR2 (Chothia)	KASSLES
SEQ ID NO:130 7H7 V _L CDR3 (Chothia)	QQYYGSSRT
SEQ ID NO:131 1B3 V _H CDR1 (Chothia)	GGTOSTS
SEQ ID NO:132 1B3 V _H CDR2 (Chothia)	KQDGSE
SEQ ID NO:133 1B3 V _H CDR3 (Chothia)	DRPVAGASAL
SEQ ID NO:134 1B3 V _L CDR1 (Chothia)	RASQSISGWLA
SEQ ID NO:135 1B3 V _L CDR2 (Chothia)	KASSLES
SEQ ID NO:136 1B3 V _L CDR3 (Chothia)	QQYYGSSRT
SEQ ID NO:137 3B6 V _H CDR1 (Chothia)	GGTTSTY
SEQ ID NO:138 3B6 V _H CDR2 (Chothia)	KQDGSE
SEQ ID NO:139 3B6 V _H CDR3 (Chothia)	DRPVAGASAL
SEQ ID NO:140 3B6 V _L CDR1 (Chothia)	RASQSISGWLA
SEQ ID NO:141 3B6 V _L CDR2 (Chothia)	KASSLES
SEQ ID NO:142 3B6 V _L CDR3 (Chothia)	QQYYGSSRT

SEQ ID NO:143 8B1 V _H CDR1 (Chothia)	GDIISTH
SEQ ID NO:144 8B1 V _H CDR2 (Chothia)	KQDGSE
SEQ ID NO:145 8B1 V _H CDR3 (Chothia)	DRPVAGASAL
SEQ ID NO:146 8B1 V _L CDR1 (Chothia)	RASQSISGWLA
SEQ ID NO:147 8B1 V _L CDR2 (Chothia)	KASSLES
SEQ ID NO:148 8B1 V _L CDR3 (Chothia)	QQYYGSSRT
SEQ ID NO:149 4A3 V _H CDR1 (Chothia)	GGIISS
SEQ ID NO:150 4A3 V _H CDR2 (Chothia)	KQDGSE
SEQ ID NO:151 4A3 V _H CDR3 (Chothia)	DRPVAGASAL
SEQ ID NO:152 4A3 V _L CDR1 (Chothia)	RASQSISGWLA
SEQ ID NO:153 4A3 V _L CDR2 (Chothia)	KASSLES
SEQ ID NO:154 4A3 V _L CDR3 (Chothia)	QQYYGSSRT
SEQ ID NO:155 9H9 V _H CDR1 (Chothia)	GGIISTY
SEQ ID NO:156 9H9 V _H CDR2 (Chothia)	KQDGSE
SEQ ID NO:157 9H9 V _H CDR3 (Chothia)	DRPVAGASAL
SEQ ID NO:158 9H9 V _L CDR1 (Chothia)	RASQSISGWLA
SEQ ID NO:159 9H9 V _L CDR2	KASSLES

(Chothia)	
SEQ ID NO:160 9H9 V _L CDR3 (Chothia)	QQYYGSSRT
SEQ ID NO:161 CD27 антитело V _H CDR1 консенсусная последовательность (по Кэбату)	GYY(W,I)(S,H)
SEQ ID NO:162 CD27 антитело V _H CDR2 консенсусная последовательность (по Кэбату)	(-,W)(Y,I)N(Y,P)(Y,N)SG(S,G)TN(Y,S)(N,A)(P,Q)(S,K)(L,F)(K,Q) (S,D)
SEQ ID NO:163 CD27 антитело V _H CDR3 консенсусная последовательность (по Кэбату)	(-,D)(-,R)(-,L)(-,V)(-,L)(-,P)(-,W)(-,F)(-,G)(-,E)(-,I)(-,Y,F)P(L,-)(I,-)(R,-) (G,D)AFD(Y,I)
SEQ ID NO:164 CD27 антитело V _L CDR1 консенсусная последовательность (по Кэбату)	R(S, A)SQ(-,S)(-,I)(-,R)(-,S)NL(L,A)(H,-)(T,-)(N,-)(G,-)(Y,-)(N,-)(Y,-)(L,-) (D,-)
SEQ ID NO:165 CD27 антитело V _L CDR2 консенсусная последовательность (по Кэбату)	(L,G)(G,A)S(N,T)RA(S,T)
SEQ ID NO:166 CD27 антитело V _L CDR3 консенсусная последовательность (по Кэбату)	(M,Q)Q(A,Y)(L,N)(Q,N)(T,W)PLT
SEQ ID NO:167 PD-L1 антитело V _H CDR1 консенсусная	(T,S)(S,Y,H)WMS

последовательность (по Кэбату)	
SEQ ID NO:168 PD-L1 антитело V _H CDR2 консенсусная последовательность (по Кэбату)	NIKQDGSEKYYVDSVKG
SEQ ID NO:169 PD-L1 антитело V _H CDR3 консенсусная последовательность (по Кэбату)	DRPVAGASAL
SEQ ID NO:170 PD-L1 антитело V _L CDR1 консенсусная последовательность (по Кэбату)	RASQSISGWLA
SEQ ID NO:171 PD-L1 антитело V _L CDR2 консенсусная последовательность (по Кэбату)	KASSLES
SEQ ID NO:172 PD-L1 антитело V _L CDR3 консенсусная последовательность (по Кэбату)	QQYYGSSRT
SEQ ID NO:173 CD27 аминокислотная последовательность (№ доступа АН12160.1)	MARPHPWWLCVLGTLVGLSATPAPKSCPERHYWAQGKLCQMCPEGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFSPDHHTRPHCESCRHCNSGLLVRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPNPSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRS LCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP
SEQ ID NO:174 CD70 аминокислотная	MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTP LARGDTLCTNLGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP

последовательность (№ доступа NP_001243)	
SEQ ID NO: 175 PD1 аминокислотная последовательность (№ доступа NP_005009)	MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEG DNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRF RVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELR VTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVI CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDY GELDFQWREKTPEPPVP CVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL
SEQ ID NO: 176 PD-L1 аминокислотная последовательность (предшественник изоформы b) (№ доступа NP_001254635)	MRIFAVFIFMTYWHELLNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKA EVIWTTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRR LDPEENHTAELVIPPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKG RMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
SEQ ID NO: 177 2B3 V _H (модифицированный)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFT <u>GY^YI^H</u> WVRQAPGQGLE WMGWINPNSGGTNSA <u>QK^FQ^DR^VT^IT^R<u>D</u></u> TSINTAYMELSR ^L R ^S DDTAVY FCARD <u>R^LV^LP^WF^GE^IF^PD^AF^DI^WG^QG^TL^VT^VS^S</u>
SEQ ID NO: 178 2B3 V _L (модифицированный)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSIRSNLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASTRATGIPARFSGSGGTEFTLTIS^SLQSE^DFAVYYCQ^QYNNWPLTFG</u> GGTKVEIK
SEQ ID NO: 179 Полный 9H9-2B3 (CDX-527) последовательность тяжелой цепи была следующей (с последовательностью константной области IgG1, выделенной жирным шрифтом)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGIISTYWMSWVRQAPGKGLEW VANI ^K QDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN ^A KNSLYLQMN ^S LRVEDTAMY YCARD ^R PVAGASALWGQ ^G TLVT ^V SSAST ^K GPSV ^F PLAPSS ^K STSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS^GVHT^FPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK^KVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYP^SDIAVEWESNGQPENNYK^TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNV^FSCSV^MHEALHNHYTQKSLSLSPGK^GSSGGGGSEIVMT QSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSIRSNLA</u> WYQQKPGQAPRLLIY <u>GASTR</u> <u>ATGIPARFSGSGGTEFTLTIS^SLQSENFAVYYCQ^QYNNWPLTFGCGTK</u> <u>VEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCK</u> <u>ASGYTFTGY^YI^HWVRQAPGQCLEWMGWINPNSGGTNSA QK^FQ^DR^VT^IT^R</u> <u>TRVTSINTAYMELSR^LR^SDDTAVYFCARD^RL^VL^PW^FG^EI^FP^DA^FD^IW^G</u> <u>GTLVT^VS^S</u>
SEQ ID NO: 180 9H9-2B3 (CDX-	DIQMTQSPSTLSASVGD ^R VTITCRASQ ^S ISGWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESGVPSRFSGSGGTEFTLTIS ^S LQPD ^D FATYYCQ ^Q YYGSSRTFG QGTNVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV

<p>527) последовательность легкой цепи была следующей (с последовательностью константной области, показанной жирным шрифтом)</p>	<p>QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>SEQ ID NO:181 Полный 9H9-2B3(DD) последовательность тяжелой цепи была следующей (с константной последовательностью «основной цепи» IgG1, показанной жирным шрифтом)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGIISTYWMSWVRQAPGKGLEW VANIQDQDSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRVEDTAMY YCARDRPVAGASALWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSSGGGGSEIVMT QSPATLSVSPGERATLSCRASQSIRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTR ATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFGCGTK VEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSK ASGYTFTGYYIHWVRQAPGQCLEWMGWINPNSGGTNSAQKFQDRVTI TRDTSINTAYMELSRRLSDDTAVYFCARDRLVLPWFGEIFPDAFDIWGW GTLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO:182 9H9-2B3(DD) последовательность легкой цепи была следующей (с константной областью, показанной жирным шрифтом)</p>	<p>DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASQSIGWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDEFATYYCQQYYGSSRTFG QGTNVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>SEQ ID NO:183 ECD huCD27</p>	<p>TPAPKSCPER HYWAQGLCC QMCEPGTFLV KDCDQHRKAA QCDPCIPGVS FSPDHHTRPH CESCRCNSG LLVRNCTITA NAECACRNGW QCRDKECTEC DPLPNPSLTA RSSQALSPHP QPTHLPYVSE MLEARTAGHM QTLADFRQLP ARTLSTHWPP QRSLCSD</p>

SEQ ID NO:184 ECD мутированного huCD27	TPAPKSCPER HYWAQGLKCC QMCEPGTFLV KDCDQHRKAA QCDCPIPGVS FSPDHHTRPH CESCRRHCNSG LLVRNCTITA NAECSCAAAW QCRDKECTEC DPLPNPSLTA RSSQALSPHP QPTHLPYVSE MLEARTAGHM QTLADFRQLP ARTLSTHWPP QRSLCSSD
SEQ ID NO:185 NA последовательность 9Н9х2В3(DD) варибельного домена	GAAGTGCAACTGGTGGAGTCGGGTGGTGGACTCGTGCAGCCCGGCG GATCCCTGAGACTCTCTTGTGCCGCATCGGGCGGCATTATTAGCACT TACTGGATGTCATGGGTCAGACAGGCACCGGGAAAGGGCTTGGAAAT GGGTGGCGAATATCAAGCAGGATGGATCCGAGAAGTACTACGTGGA CTCCGTGAAGGGCAGATTCACCATTTCCCGGGACAACGCCAAGAAC TCGCTCTATCTGCAAATGAACTCGTTGCGGGTGGAAAGATACTGCCAT GTAATACTGCGCCCGGGACCGGCCTGTGGCCGGGGCGTCGGCCCTC TGGGGCCAGGGCACTCTGGTCACCGTGTCTCT
SEQ ID NO:186 NA последовательность 9Н9х2В3(DD) scFv домена (коннекторная и линкерная последовательности показаны жирным шрифтом)	GGCTCCAGCGGGGGTGGCGGTTCCGAGATCGTGATGACTCAGAG CCCGGCAACCCTGTCCGTGTCTCCGGGGAGCGGGCTACTCTTTCCT GCCGGGCATCCCAGTCCATCCGGTCGAACCTTGCCTGGTACCAACA GAAGCCTGGACAGGCGCCCCGCCTGCTGATCTACGGGGCGTCGACT AGGGCCACCGGCATCCCGGCCCGCTTCTCCGGGTCCGGATCCGGCA CCGAATTCACCCTACCATCTCGAGCCTGCAGTCCGAAAACCTTCGCC GTCTACTACTGCCAGCAGTACAACAAGTGGCCGCTGACATTCCGGAT GCGGAACCAAAGTGGAATCAAGGGCGGCGGGCGGATCCGGCGGT GGCGGCAGCGGCGGTGGAGGATCCGGTGGCGGCGGTTCA CAAG TGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGGGCCAG CGTGAAAGTCAGCTGCAAGGCTTCCGGATACACCTTCACGGGTTACT ACATTCACTGGGTTCGCCAAGCGCCCGGGCAGTGTCTGGAGTGGAT GGGATGGATCAACCCTAACTCGGGGGGAACCAACTCGGCCCAAAG TTCCAGGACCGGGTCACCATTAACAAGAGTCACGTCCATCAACACTG CCTACATGGAGTTGAGCCGGCTGCGATCAGACGACACCGCCGTGTA CTTCTGCGCGAGGGACCGCCTCGTCCTCCCGTGGTTTGGAGAGATCT TCCCGGATGCCTTCGACATTTGGGGACAGGGGACCCTCGTGAAGTGTG TCCAGC
SEQ ID NO:187 NA последовательность 9Н9х2В3(DD) варибельного домена легкой цепи	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCCACCCTTTCGCGAGCGTCCG GCGACAGAGTGACCATTACTTGTCCGGCCTCGCAAAGCATCTCCGG CTGGCTGGCTTGGTACCAGCAAAAGCCTGGAAAGGCCCTAAGCTG CTGATCTACAAGGCTCATCCCTGGAGTCCGGAGTGCCTTCACGCTT TTCGGGGAGCGGATCGGGGACTGAGTTCACCCTACCATTTCCCTCCC TGCAACCCGACGATTTGCGGACATACTACTGCCAGCAGTACTACGGT TCCTCGCGCACGTTCCGGACAGGGCACTAACGTCGAGATCAAG (SEQ ID NO:187)

Эквиваленты

Специалисты в данной области техники будут осведомлены или смогут установить с использованием обычных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в

настоящем документе. Подразумевается, что такие эквиваленты включены в объем нижеследующей формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Биспецифическая конструкция, содержащая анти-CD27 связывающий домен, связанный с анти-PD-L1 связывающим доменом, где:

(i) анти-CD27 связывающий домен содержит:

a. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, или

b. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

(ii) анти-PD-L1 связывающий домен содержит:

a. CDR1 переменного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из консенсусной последовательности: (T,S)(S,Y,H)WMS (SEQ ID NO:167) или ее консервативные модификации последовательности;

b. CDR2 переменного участка тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:168 или ее консервативные модификации последовательности;

c. CDR3 переменного участка тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:169 или ее консервативные модификации последовательности;

d. CDR1 варибельного участка легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:170 или ее консервативные модификации последовательности;

e. CDR2 варибельного участка легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:171 или ее консервативные модификации последовательности; и

f. CDR3 варибельного участка легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:172 или ее консервативные модификации последовательности.

2. Биспецифическая конструкция, содержащая анти-CD27 связывающий домен, связанный с анти-PD-L1 связывающим доменом, где:

(i) анти-CD27 связывающий домен содержит:

a. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, или

b. CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно; или их консервативные модификации последовательности и

(ii) анти-PD-L1 связывающий домен содержит:

a. варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им;

b. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им;

c. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им;

d. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им;

e. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им; или

f. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им.

3. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18.

4. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20.

5. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 29, 30, и 31, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка

легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

6. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78.

7. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 35, 36, и 37, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

8. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80.

9. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 41, 42, и 43, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

10. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82.

11. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка

легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

12. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84.

13. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 53, 54, и 55, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

14. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86.

15. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 59, 60, и 61, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

16. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

17. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

а. анти-CD27 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3,

соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно; или их консервативные модификации последовательности, и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:29, 30, и 31, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 32, 33, и 34, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

18. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78.

19. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1,2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:35, 36, и 37,

соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 38, 39, и 40, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

20. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80.

21. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:41, 42, и 43, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

22. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82.

23. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:47, 48, и 49, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

24. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84.

25. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

а. анти-CD27 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

б. анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:53, 54, и 55, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

26. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

а. анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18; и

б. анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86.

27. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

а. анти-CD27 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID

NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 62, 63, и 64, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

28. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

29. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:29, 30, и 31, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID

NO:32, 33, и 34, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

30. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78.

31. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:35, 36, и 37, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

32. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80.

33. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:41, 42, и 43, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

34. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82.

35. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

а. анти-CD27 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

б. анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:47, 48, и 49, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

36. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

а. анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и

б. анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84.

37. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

а. анти-CD27 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID

NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:53, 54, и 55, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

38. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86.

39. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID

NO:62, 63, и 64, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

40. Биспецифическая конструкция по п. 1 или 2, где:

a. анти-CD27 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и

b. анти-PD-L1 связывающий домен содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

41. Биспецифическая конструкция согласно любому из предшествующих пунктов, где (a) анти-PD-L1 связывающий домен дополнительно содержит константный домен человеческого IgG1 или (b) анти-CD27 связывающий домен дополнительно содержит константный домен человеческого IgG1.

42. Биспецифическая конструкция согласно любому из предшествующих пунктов, где (a) анти-CD27 связывающий домен связан с C-концом тяжелой цепи анти-PD-L1 связывающего домена или (b) анти-PD-L1 связывающий домен связан с C-концом тяжелой цепи анти-CD27 связывающего домена.

43. Биспецифическая конструкция согласно любому из предшествующих пунктов, где анти-CD27 связывающий домен представляет собой scFv, или (b) анти-PD-L1 связывающий домен представляет собой scFv.

44. Биспецифическая конструкция согласно любому из предшествующих пунктов, где анти-PD-L1 связывающий домен и анти-CD27 связывающий домен являются генетически слитыми.

45. Биспецифическая конструкция согласно любому из предшествующих пунктов, где анти-PD-L1 связывающий домен и анти-CD27 связывающий домен являются химически конъюгированными.

46. Биспецифическая конструкция, содержащая анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

(i) анти-CD27 scFv содержит:

a. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, или

b. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

(ii) анти-PD-L1 антитело содержит:

a. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 29, 30, и 31, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно, или их консервативные модификации последовательности;

b. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 35, 36, и 37, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи,

как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно, или их консервативные модификации последовательности;

с. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 41, 42, и 43, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно, или их консервативные модификации последовательности;

d. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно, или их консервативные модификации последовательности;

e. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 53, 54, и 55, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; или

f. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 59, 60, и 61, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

g. константный домен человеческого IgG1.

47. Биспецифическая конструкция, содержащая анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

(i) анти-CD27 scFv содержит:

a. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18; или

b. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и

(ii) анти-PD-L1 антитело содержит:

a. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78;

b. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80;

c. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82;

d. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84;

e. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86; или

f. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88; и

g. константный домен человеческого IgG1.

48. Биспецифическая конструкция, содержащая анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

(i) анти-CD27 scFv содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как описано в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как описано в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

(ii) анти-PD-L1 антитело содержит а CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как описано в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как описано в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и константный домен человеческого IgG1.

49. Биспецифическая конструкция, содержащая анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

(i) анти-CD27 scFv содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и

(ii) анти-PD-L1 антитело содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84, и константный домен человеческого IgG1.

50. Биспецифическая конструкция, содержащая анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

(i) анти-CD27 scFv содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как описано в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как описано в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

(ii) анти-PD-L1 антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно или их консервативные модификации последовательности, и константный домен человеческого IgG1.

51. Биспецифическая конструкция, содержащая анти-PD-L1 антитело, связанное с анти-CD27 scFv, где:

(i) анти-CD27 scFv содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и

(ii) анти-PD-L1 антитело содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88, и константный домен человеческого IgG1.

52. Биспецифическая конструкция, содержащая анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

(i) анти-CD27 антитело содержит:

a. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, или

b. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи,

как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

с. константный домен человеческого IgG1; и

(ii) анти-PD-L1 scFv содержит:

а. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 29, 30, и 31, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно, или их консервативные модификации последовательности;

б. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 35, 36, и 37, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно, или их консервативные модификации последовательности;

в. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 41, 42, и 43, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно, или их консервативные модификации последовательности;

г. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно, или их консервативные модификации последовательности;

д. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 53, 54, и 55, соответственно, или их консервативные модификации

последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; или

f. CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 59, 60, и 61, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

53. Биспецифическая конструкция, содержащая анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

(i) анти-CD27 антитело содержит:

a. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18; или

b. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20; и

c. константный домен человеческого IgG1; и

(ii) анти-PD-L1 scFv содержит:

a. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78;

b. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80;

c. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82;

d. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84;

e. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86; или

f. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

54. Биспецифическая конструкция, содержащая анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

(i) анти-CD27 антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и константный домен человеческого IgG1; и

(ii) анти-PD-L1 scFv содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

55. Биспецифическая конструкция, содержащая анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

(i) анти-CD27 антитело содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20, и константный домен человеческого IgG1; и

(ii) анти-PD-L1 scFv содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84.

56. Биспецифическая конструкция, содержащая анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

(i) анти-CD27 антитело содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и константный домен человеческого IgG1; и

(ii) анти-PD-L1 scFv содержит CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

57. Биспецифическая конструкция, содержащая анти-CD27 антитело, связанное с анти-PD-L1 scFv, где:

(i) анти-CD27 антитело содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20, и константный домен человеческого IgG1; и

(ii) анти-PD-L1 scFv содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

58. Анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, где антитело связывается с одним или более остатками внутри аминокислотных остатков 85-89, внеклеточного домена (ECD) человеческого CD27 (SEQ ID NO: 183).

59. Анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, где антитело связывается с ECD дикого типа человеческого CD27 (SEQ ID NO: 183), но не связывается с мутированным вариантом ECD дикого типа человеческого CD27, имеющим следующие аминокислотные замещения: A85S, R87A, N88A, и G89A.

60. Анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

61. Анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им.

62. Анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

63. Анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им.

64. Анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из п.п. 58-63, где анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, имеет одну или более из следующих характеристик:

- a. индуцирует или усиливает Т-клеточный иммунный ответ;
- b. блокирует связывание sCD70 с CD27;
- c. связывается с человеческим CD27 с равновесной константой диссоциации K_d , равной 10^{-9} М или менее, или, альтернативно, с равновесной константой ассоциации K_a , равной 10^{+9} М⁻¹ или более;
- d. индуцирует специфическую комплемент-опосредованную цитотоксичность (CDC) CD27-экспрессирующих клеток;
- e. индуцирует антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC)-специфический лизис CD27-экспрессирующих клеток;
- f. индуцирует или усиливает антиген-специфические иммунные ответы *in vivo* в комбинации с вакциной или эндогенным антигеном;
- g. индуцирует или усиливает антиген-специфические TH1 иммунные ответы *in vivo* в комбинации с вакциной или эндогенным антигеном;
- h. индуцирует или усиливает антиген-специфическую Т-клеточную пролиферацию или активацию *in vivo* в комбинации с вакциной или эндогенным антигеном; и/или

i. индуцирует или усиливает активность Т-клеток при комбинации с одновременной, отдельной или последовательной активацией TCR.

65. Биспецифическая конструкция, содержащая анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из п.п. 58-63, связанное с анти-PD-L1 связывающим доменом.

66. Биспецифическая конструкция по п. 64, где анти-PD-L1 связывающий домен выбран из группы, включающей:

a. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 29, 30, и 31, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно, или их консервативные модификации последовательности;

b. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 35, 36, и 37, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно, или их консервативные модификации последовательности;

c. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 41, 42, и 43, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно, или их консервативные модификации последовательности;

d. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ

ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно, или их консервативные модификации последовательности;

e. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 53, 54, и 55, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

f. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 59, 60, и 61, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

67. Биспецифическая конструкция по п. 65 или 66, где анти-PD-L1 связывающий домен выбран из группы, включающей:

a. варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78;

b. варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80;

c. варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82;

d. варибельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и варибельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84;

e. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86; и

f. переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

68. Биспецифическая конструкция по любому из п.п. 64-66, где анти-PD-L1 связывающий домен представляет собой scFv.

69. Анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:29, 30, и 31, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

70. Анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им.

71. Анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:35, 36, и 37, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

72. Анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им.

73. Анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:41, 42, и 43, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

74. Анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им.

75. Анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:47, 48, и 49, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

76. Анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им.

77. Анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:53, 54, и 55, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

78. Анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и

вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им.

79. Анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:59, 60, и 61, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

80. Анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88, или последовательности на по меньшей мере 95% идентичные им.

81. Анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из п.п. 69-80, где анти-PD-L1 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, имеет одну или более из следующих характеристик:

- a. блокирует связывание PD1 с PD-L1;
- b. индуцирует активацию пути NFAT; и/или
- c. индуцирует смешанный лимфоцитарный ответ.

82. Биспецифическая конструкция, содержащая анти-PD-L1 антиген-связывающий фрагмент по любому из п.п. 69-80, связанный с анти-CD27 связывающим доменом.

83. Биспецифическая конструкция по п. 82, где анти-CD27 связывающий домен выбран из группы, включающей:

а. анти-CD27 антитело, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и

б. анти-CD27 антитело, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

84. Биспецифическая конструкция по п. 82 или 83, где анти-CD27 связывающий домен выбран из группы, включающей:

а. анти-CD27 антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18; и

б. анти-CD27 антитело, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20.

85. Биспецифическая конструкция по любому из п.п. 82-84, где анти-CD27 связывающий домен дополнительно содержит константный домен человеческого IgG1.

86. Мультиспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 антитело, имеющее Fc домен, где по меньшей мере одно анти-CD27 антитело связывающий домен связано с Fc доменом.

87. Мультиспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 антитело, имеющее Fc домен, где по меньшей мере один анти-CD27 scFv пептид связан с Fc доменом.

88. Мультиспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 антитело, имеющее Fc домен, где анти-CD27 scFv пептид связан с карбокси-концом по меньшей мере одной из тяжелых цепей антитела.

89. Мультиспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 антитело, имеющее Fc домен, где анти-CD27 scFv пептид связан с карбокси-концом по меньшей мере одной из тяжелых цепей антитела, и другой scFv пептид связан с карбокси-концом другой тяжелой цепи.

90. Композиция, содержащая биспецифическую конструкцию по любому из п.п. 1-57, 65-68, и 82-85 или антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из п.п. 58-64 и 69-81, или мультиспецифическое антитело по любому из п.п. 86-89 и фармацевтически приемлемый носитель.

91. Набор, содержащий биспецифическую конструкцию по любому из п.п. 1-57, 65-68, и 82-85 или антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по любому из п.п. 58-64 и 69-81, или мультиспецифическое антитело по любому из п.п. 86-89, или композицию по п. 90, и инструкции по применению.

92. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую переменный участок антитела, где переменный участок антитела содержит аминокислотную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:17, 18, 19, 20, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, или 88.

93. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, как изложено в SEQ ID NO:25, 26, 27, 28, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, или 112.

94. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела, где переменные участки тяжелой и легкой цепи антитела содержат аминокислотные последовательности, как изложено в SEQ ID NO:17 и 18, SEQ ID

NO:19 и 20, SEQ ID NO:77 и 78, SEQ ID NO:79 и 80, SEQ ID NO:81 и 82, SEQ ID NO: 83 и 84, SEQ ID NO:85 и 86, или SEQ ID NO:87 и 88, соответственно.

95. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая биспецифическую конструкцию по любому из п.п. 1-57, 65-68, и 82-85.

96. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 92-95 в форме экспрессионного вектора.

97. Молекула нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 92-96 в форме экспрессионного вектора, который экспрессирует биспецифическую конструкцию, при введении субъекту *in vivo*.

98. Способ стимуляции Т-клеточной активности, включающий контакт Т-клеток с биспецифической конструкцией по любому из п.п. 1-57, 65-68, и 82-85, антителом или его антиген-связывающим фрагментом, по любому из п.п. 58-64 и 69-81, мультиспецифического антитела по любому из п.п. 86-89, или композиции по п. 90.

99. Способ индукции или усиления иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту биспецифической конструкции по любому из п.п. 1-57, 65-68, и 82-85, антитела или его антиген-связывающего фрагмента, по любому из п.п. 58-64 и 69-81, мультиспецифического антитела по любому из п.п. 86-89, или композиции по п. 88 в количестве, эффективном для индукции или усиления иммунного ответа у субъекта.

100. Способ лечения состояния или заболевания у субъекта, где способ включает введение субъекту биспецифической конструкции по любому из п.п. 1-57, 65-68, и 82-85, антитела или его антиген-связывающего фрагмента, по любому из п.п. 58-64 и 69-81, мультиспецифического антитела по любому из п.п. 86-89, или композиции по п. 88 в количестве, эффективном для лечения состояния или заболевания.

101. Способ лечения состояния или заболевания у субъекта, где способ включает введение субъекту анти-CD27 антитела или его антиген-связывающего фрагмента, в комбинации с анти-PD-L1 антителом или его антиген-связывающим фрагментом, где:

(i) анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент выбрано из группы, включающей:

a. анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:1, 2, и 3, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:4, 5, и 6, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и

b. анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO:7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

(ii) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент выбрано из группы, включающей:

a. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 29, 30, и 31, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 переменного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:32, 33, и 34, соответственно, или их консервативные модификации последовательности;

b. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 35, 36, и 37, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:38, 39, и 40, соответственно, или их консервативные модификации последовательности;

c. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 41, 42, и 43, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:44, 45, и 46, соответственно, или их консервативные модификации последовательности;

d. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 47, 48, и 49, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:50, 51, и 52, соответственно, или их консервативные модификации последовательности

e. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 53, 54, и 55, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи, как изложено в SEQ ID NO:56, 57, и 58, соответственно, или их консервативные модификации последовательности; и

f. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка тяжелой цепи, как изложено в SEQ ID NO: 59, 60, и 61, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного участка легкой цепи,

как изложено в SEQ ID NO:62, 63, и 64, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

102. Способ лечения состояния или заболевания у субъекта, где способ включает введение субъекту анти-CD27 антитела или его антиген-связывающего фрагмента, в комбинации с анти-PD-L1 антителом или его антиген-связывающим фрагментом, где:

(i) анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент выбрано из группы, включающей:

a. анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:17, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:18 и

b. анти-CD27 антитело, или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее SEQ ID NO:19, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:20;
и

(ii) анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент выбрано из группы, включающей:

a. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:77, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:78;

b. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:79, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:80;

с. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:81, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:82;

d. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:83, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:84;

e. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:85, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:86; и

f. анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее переменный участок тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO:87, и переменный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO:88.

103. Способ по п. 101 или 102, где анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, вводят отдельно.

104. Способ по п. 101 или 102, где анти-CD27 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и анти-PD-L1 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, вводят совместно.

105. Способ по любому из п.п. 98-104, где субъект страдает состоянием или заболеванием, при котором желательна стимуляция иммунного ответа.

106. Способ по п. 105, где состоянием или заболеванием является рак.

107. Способ по п. 106, где рак выбран из группы, включающей колоректальный рак, рак яичников, почечноклеточную карциному, плоскоклеточный рак головы и шеи и глиобластому.

108. Биспецифическое тетравалентное антитело, содержащее:

- i) две тяжелые цепи IgG;
- ii) две легкие цепи; и
- iii) два одноцепочечных домена Fv (scFv);

где две тяжелые цепи IgG и две легкие цепи образуют фрагмент IgG, который специфически связывается с PD-L1 человека, причем каждый из двух доменов scFv специфически связывается с CD27 человека, и где каждый домен scFv соединен с С-концевым остатком одной из тяжелых цепей IgG посредством коннекторной последовательности.

109. Биспецифическое тетравалентное антитело по п. 108, где тяжелые цепи IgG представляют собой тяжелые цепи IgG1.

110. Биспецифическое тетравалентное антитело по п. 108 или 109, где легкие цепи представляют собой легкие каппа-цепи.

111. Биспецифическое тетравалентное антитело по любому из п.п. 108 – 110, где каждый scFv домен имеет порядок структуры либо i) N-конец—вариабельный домен тяжелой цепи—линкер—вариабельный домен легкой цепи—С-конец, либо ii) N-конец- вариабельный домен легкой цепи -линкер- вариабельный домен тяжелой цепи -С конец, и где в каждом случае линкер содержит аминокислотную последовательность (G4S)_m; где m представляет собой целое число, равное по меньшей мере 3.

112. Биспецифическое тетравалентное антитело по любому из п.п. 108 – 111, где коннекторная последовательность содержит аминокислотную последовательность G4S.

113. Биспецифическое тетравалентное антитело по любому из п.п. 108 – 112, где коннекторная последовательность содержит аминокислотную последовательность GS2G4S.

114. Биспецифическое тетравалентное антитело по любому из п.п. 108 – 113, где линкерная последовательность содержит аминокислотную последовательность (G4S)4.

115. Биспецифическое тетравалентное антитело по любому из п.п. 108 – 114, где по меньшей мере один из анти-CD27 scFv доменов содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO: 7, 8, и 9, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO: 10, 11, и 12, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

116. Биспецифическое тетравалентное антитело по любому из п.п. 108 – 115, где по меньшей мере одна из анти-PD-L1 IgG тяжелых цепей содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO: 59, 60, и 61, соответственно, или их консервативные модификации последовательности, и по меньшей мере одна из анти-PD-L1 легких цепей содержит CDR1, CDR2 и CDR3 домены легкой цепи, имеющие последовательности, как изложено в SEQ ID NO: 62, 63, и 64, соответственно, или их консервативные модификации последовательности.

117. Композиция, содержащая биспецифическое тетравалентное антитело по любому из п.п. 108 - 116 и фармацевтически приемлемый носитель.

118. Набор, содержащий биспецифическое тетравалентное антитело по любому из п.п. 108 – 116 или композицию по п. 117, и инструкции по применению.

119. Способ стимуляции Т-клеточной активности, включающий контакт Т-клеток с биспецифическим тетравалентным антителом по любому из п.п. 108 - 116, или композиции по п. 117.

120. Способ индукции или усиления иммунного ответа у субъекта, где способ включает введение субъекту биспецифического тетравалентного антитела по любому из п.п. 108 - 116, или композиции по п. 117, в количестве, эффективном для индукции или усиления иммунного ответа у субъект.

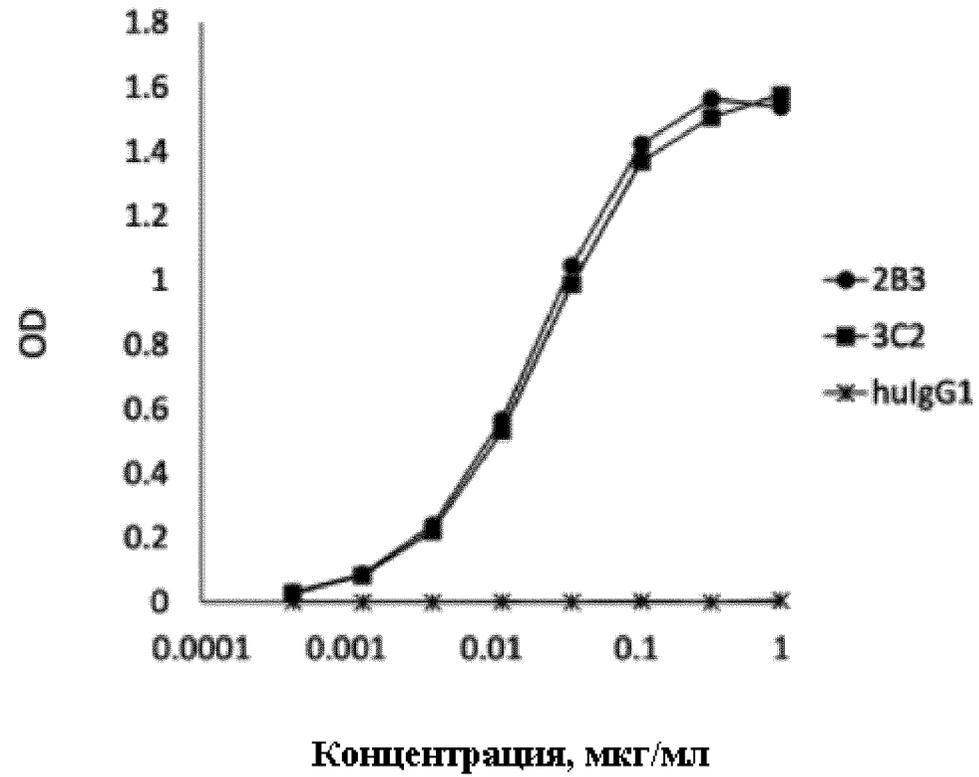
121. Способ лечения состояния или заболевания у субъекта, где способ включает введение субъекту биспецифического тетравалентного антитела по любому из п.п. 108 - 116, или композиции по п. 117, в количестве, эффективном для лечения состояния или заболевания.

122. Способ по любому из п.п. 119 - 121, где субъект страдает состоянием или заболеванием, при котором желательна стимуляция иммунного ответа.

123. Способ по п. 122, где состоянием или заболеванием является рак.

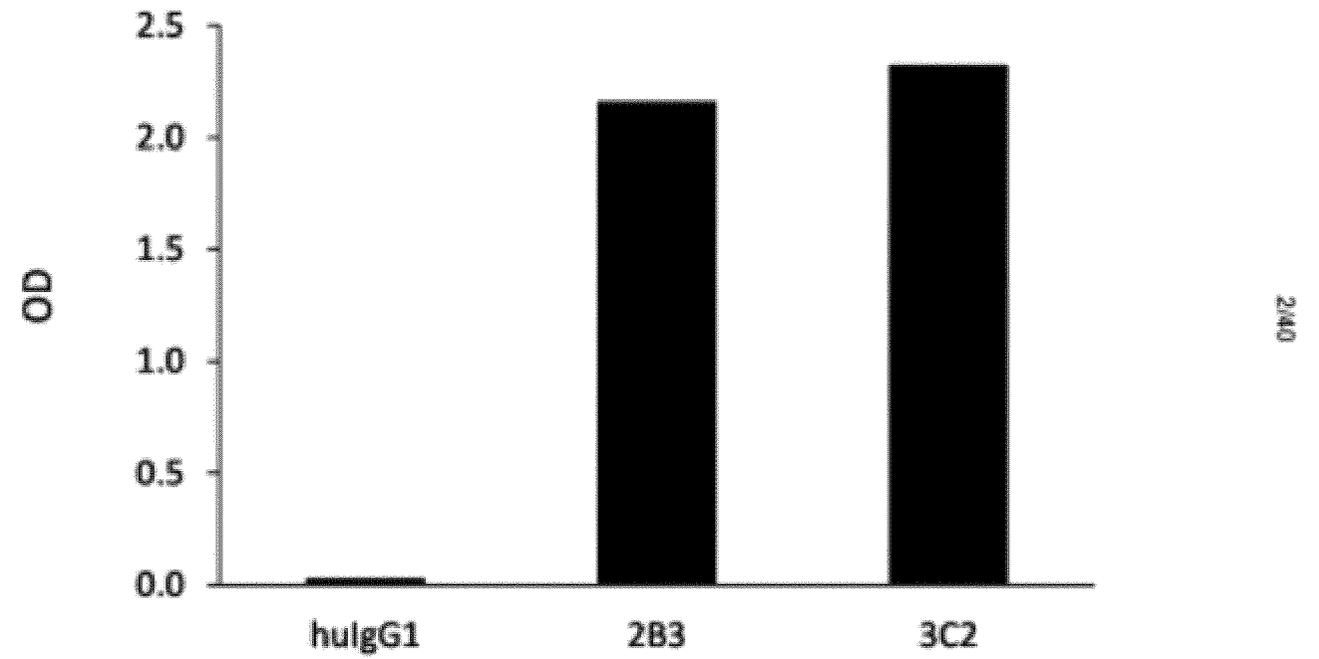
124. Способ по п. 123, где рак выбран из группы, включающей колоректальный рак, рак яичников, почечноклеточную карциному, плоскоклеточный рак головы и шеи и глиобластому.

Связывание с человеческим CD27



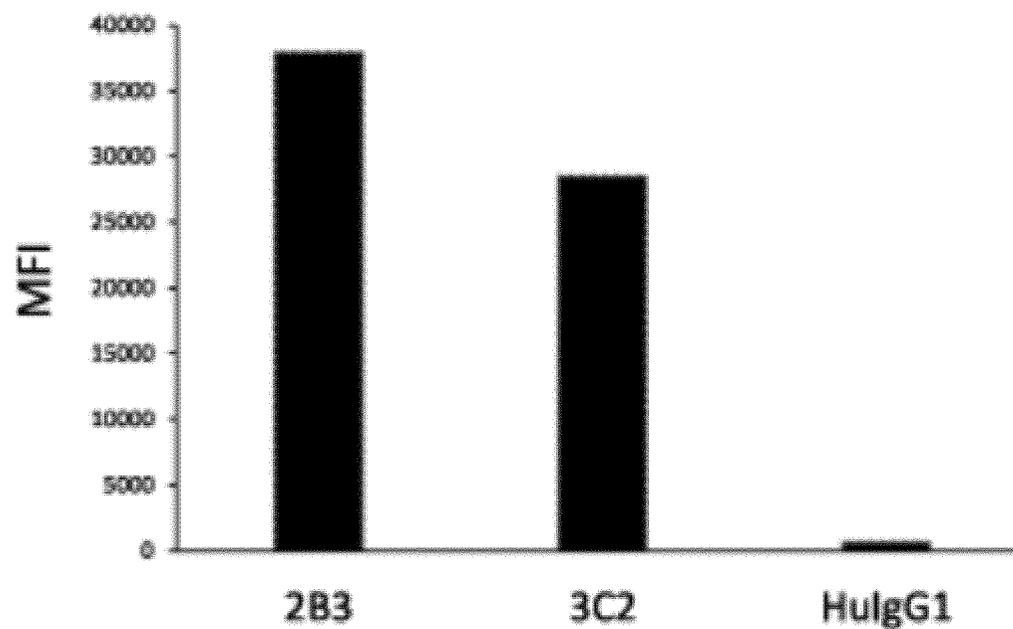
Фиг. 1

Связывание с CD27 яванских макак



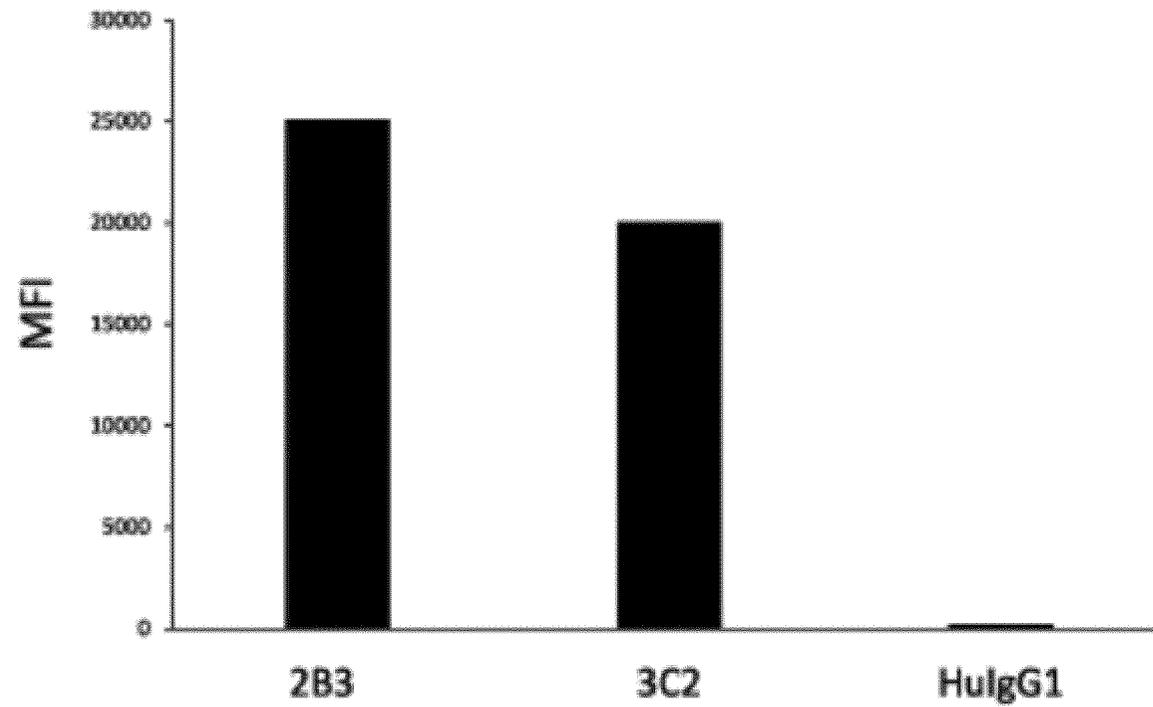
Фиг.2

Связывание с клетками Ramos



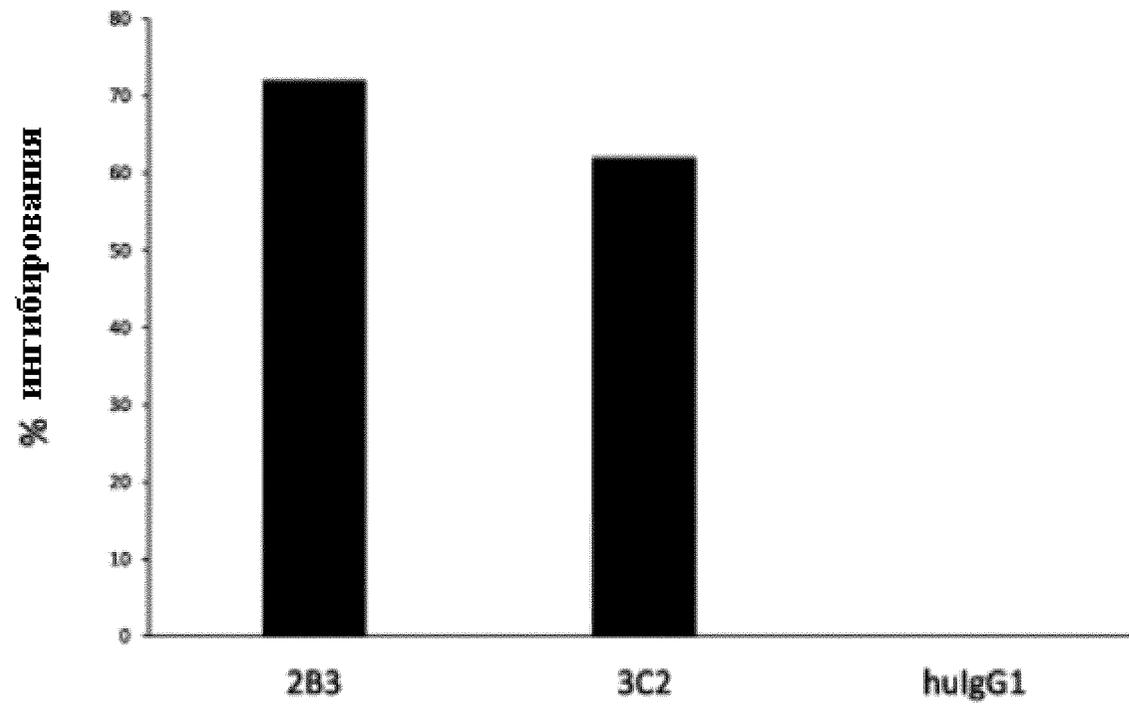
Фиг.3

Связывание с Т-клетками человека

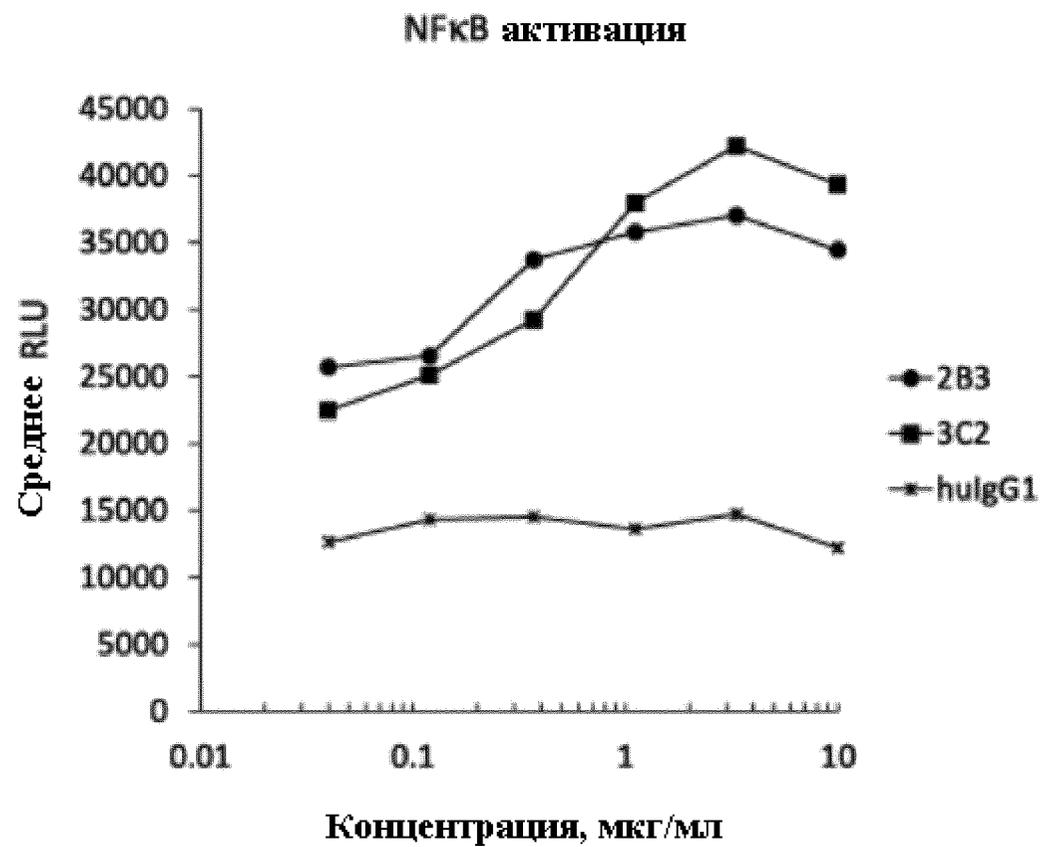


Фиг.4

CD70 блокирование

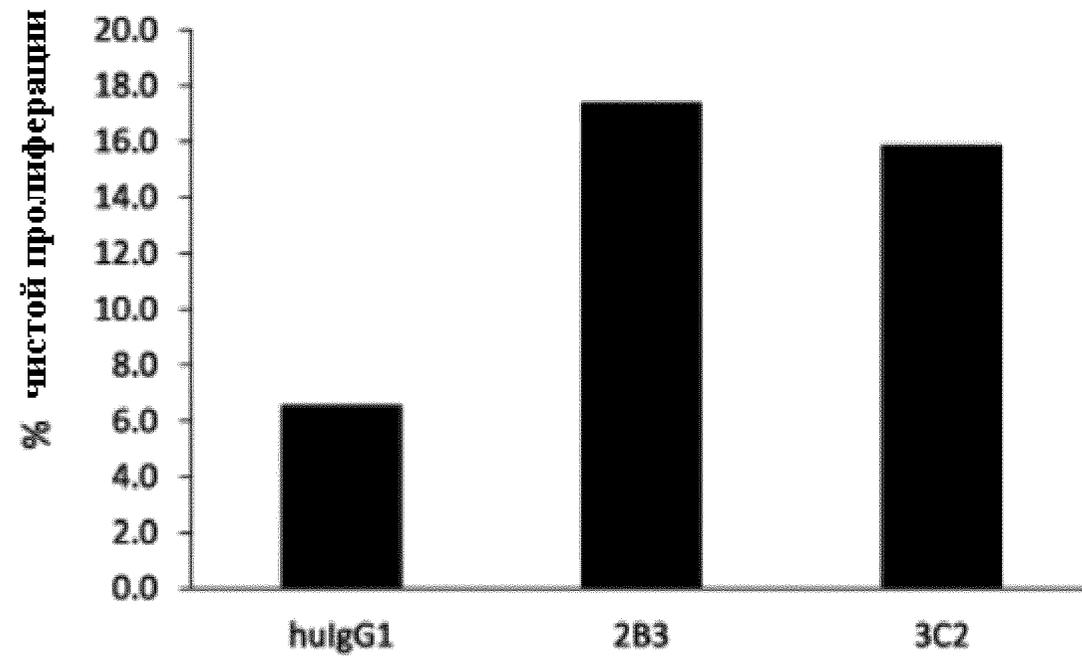


Фиг.5



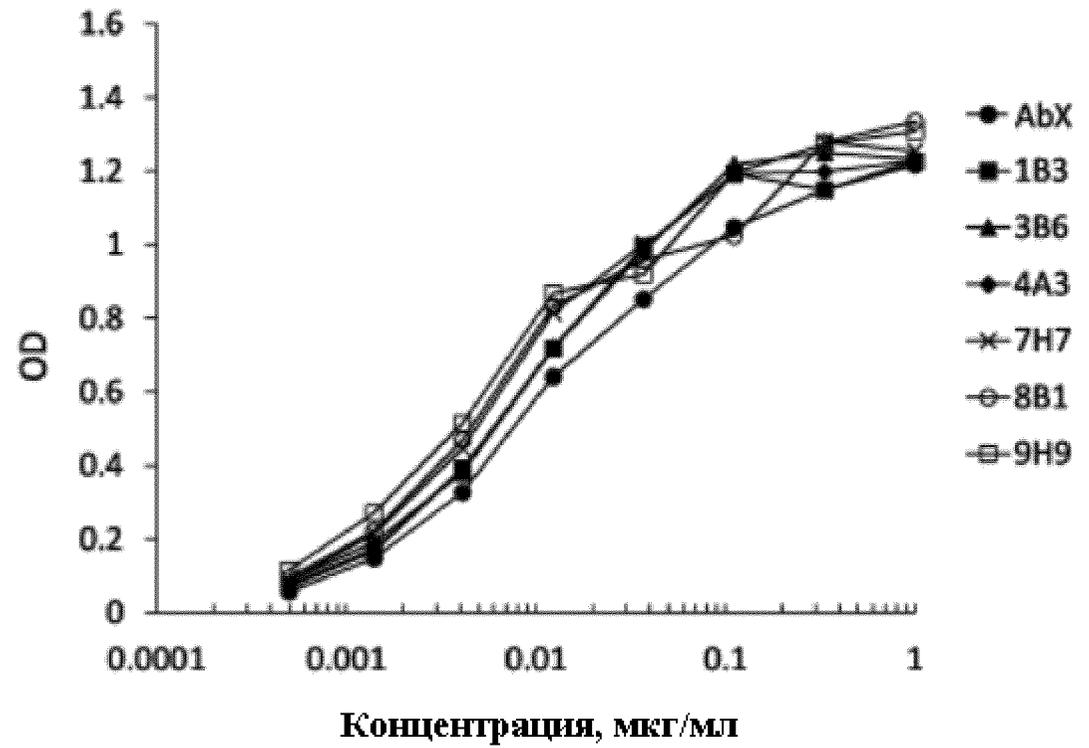
Фиг.6

Пролиферация Т-клеток



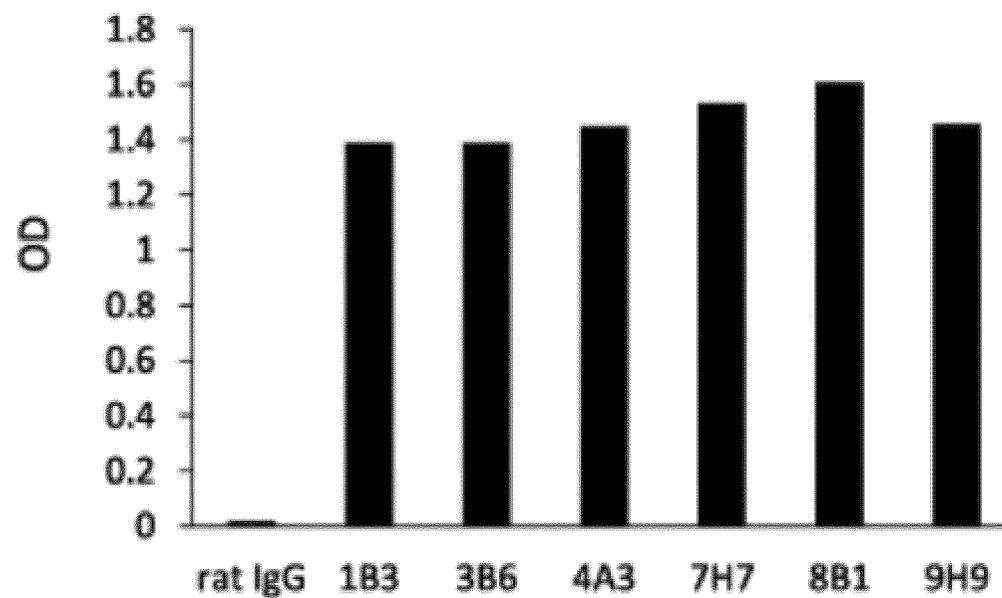
Фиг.7

СВЯЗЫВАНИЕ С ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ PD-L1



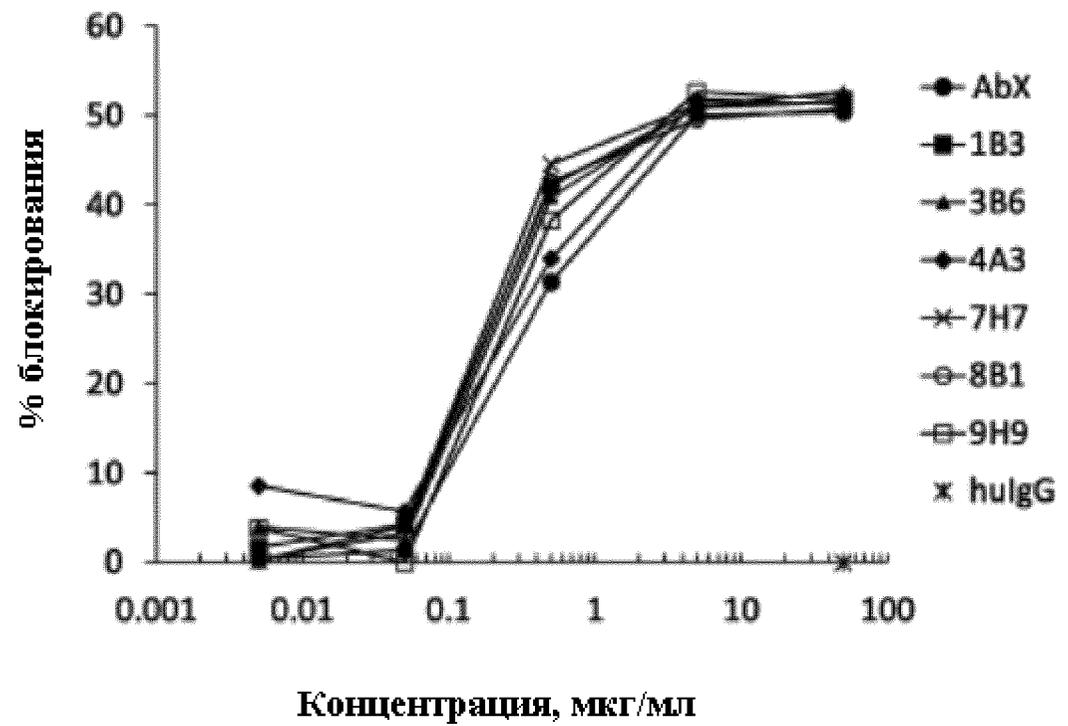
Фиг.8

Связывание с PD-L1 яванских макак



Фиг.9

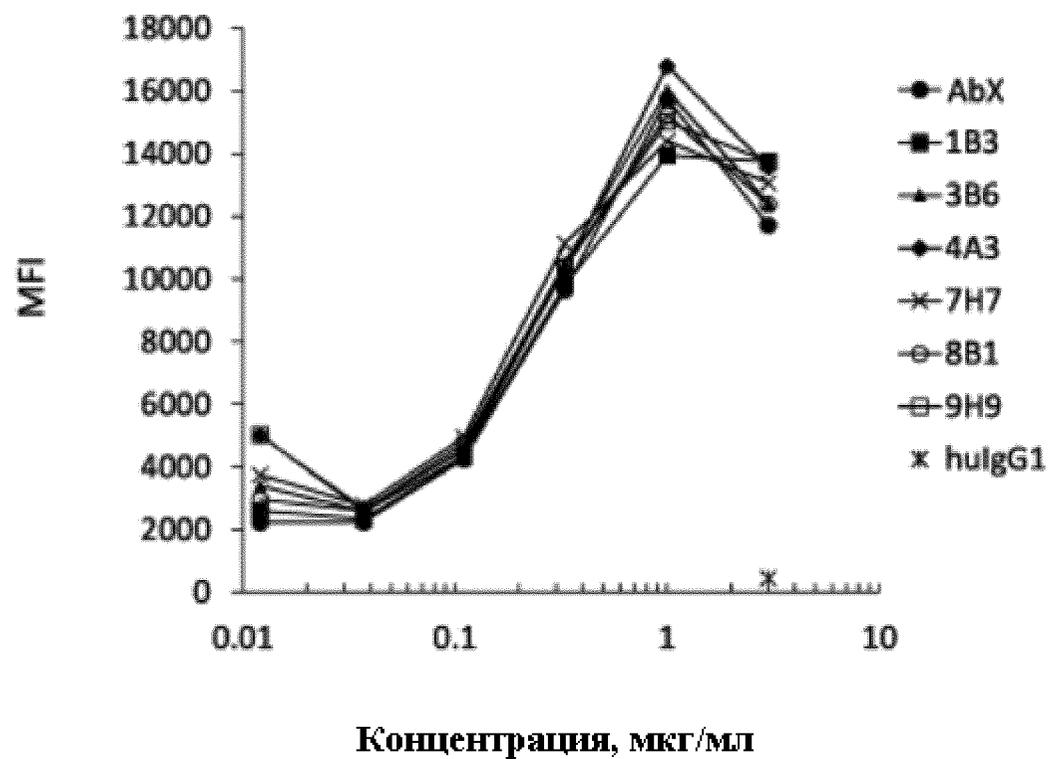
Блокирование связывания PD1 с PD-L1



10/40

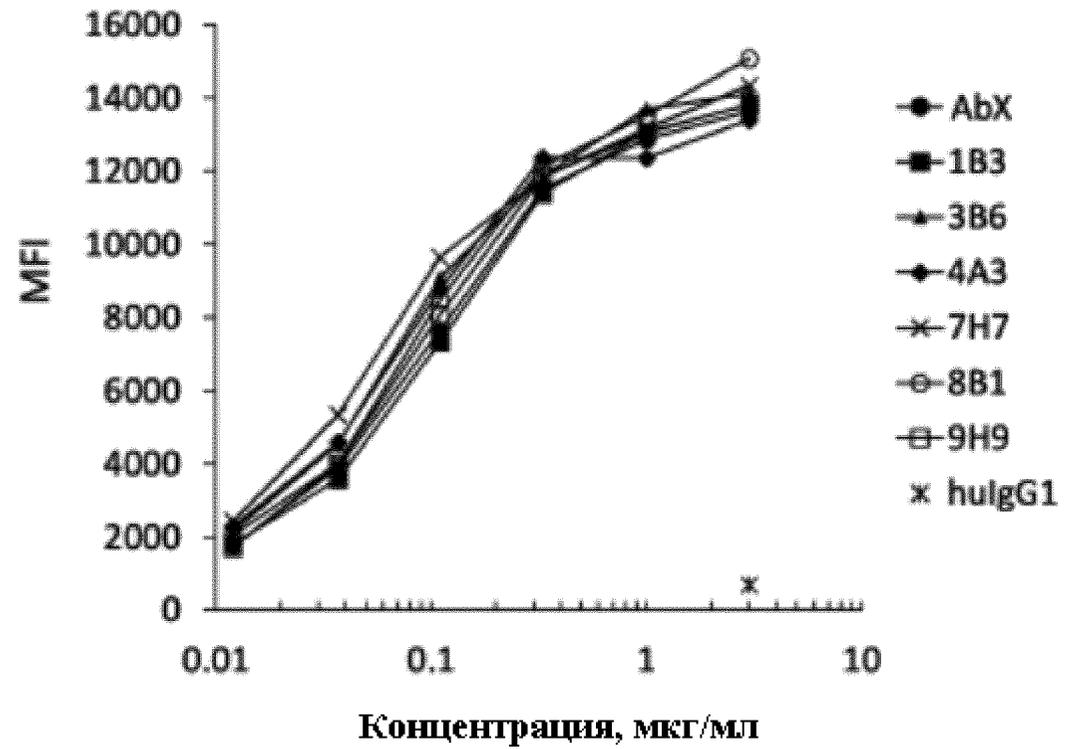
Фиг.10

Связывание антител PD-L1 с клетками 293-PD-L1



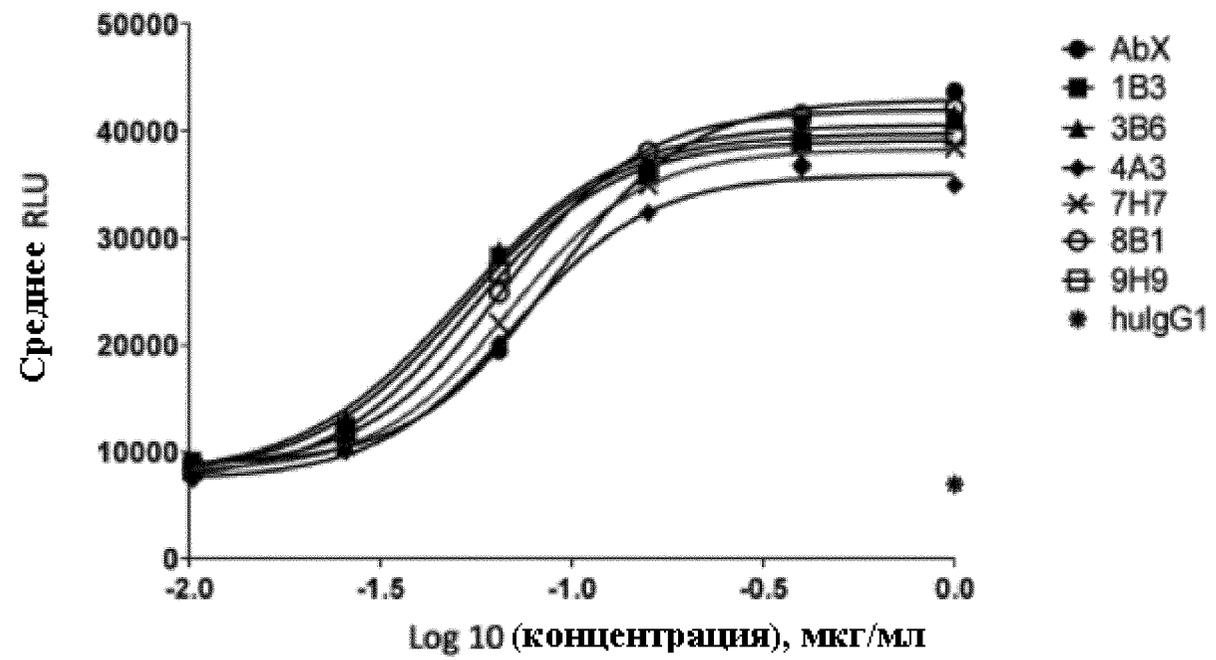
Фиг.11

Связывание антител PD-L1 с дендритными клетками



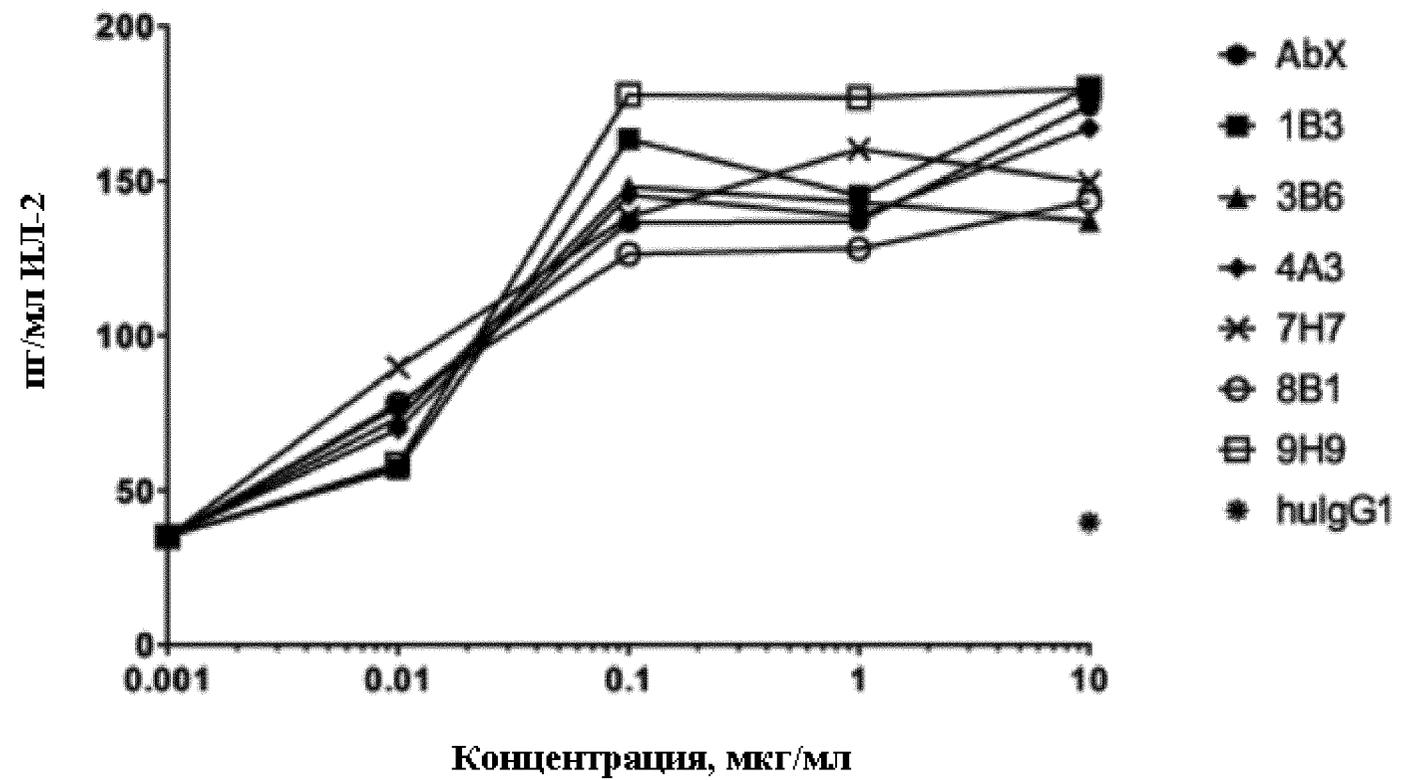
Фиг.12

Т-клеточная PD1/PD-L1 блокада

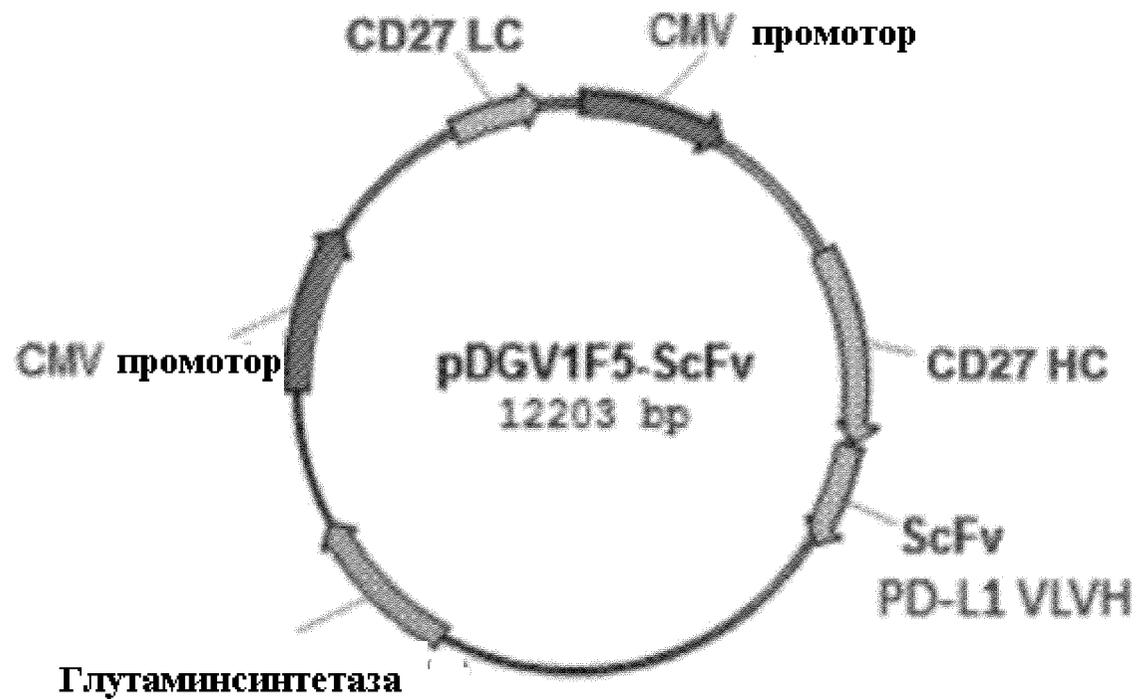


Фиг.13

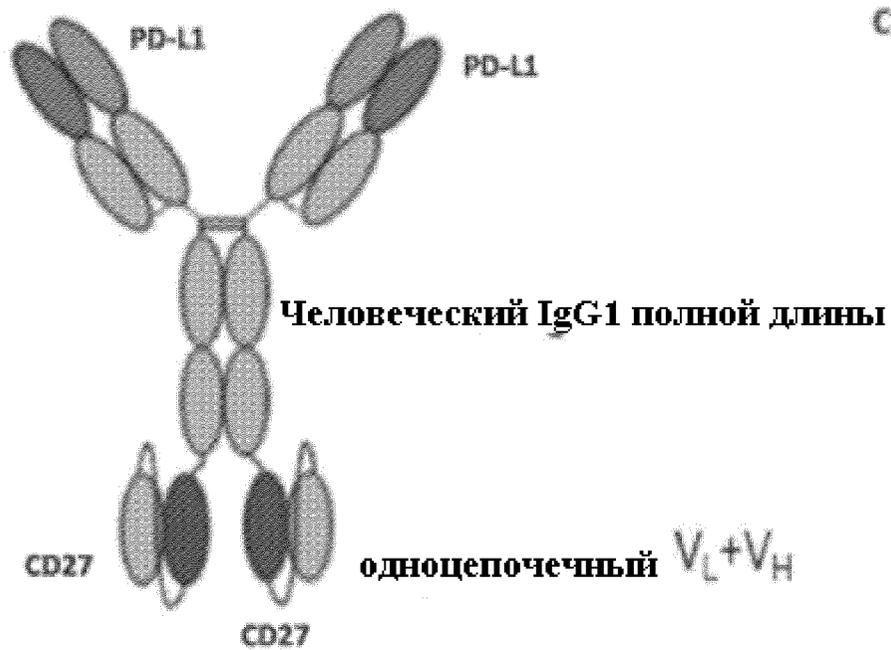
Смешанная лимфоцитарная реакция



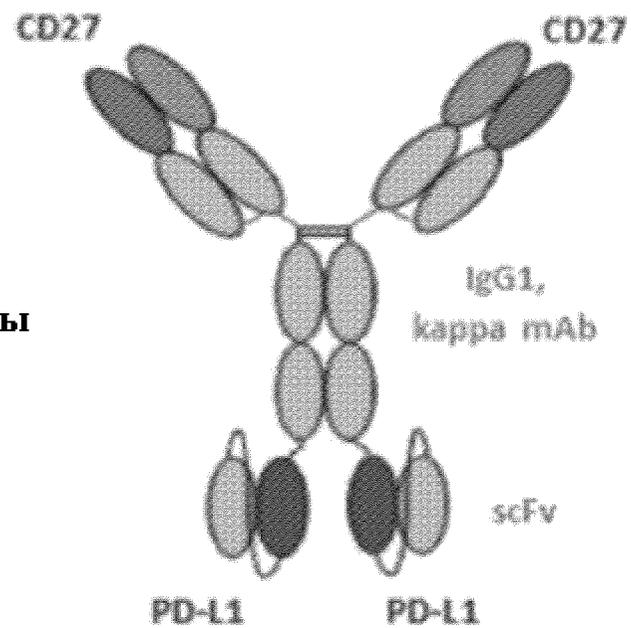
Фиг.14



Фиг.15А



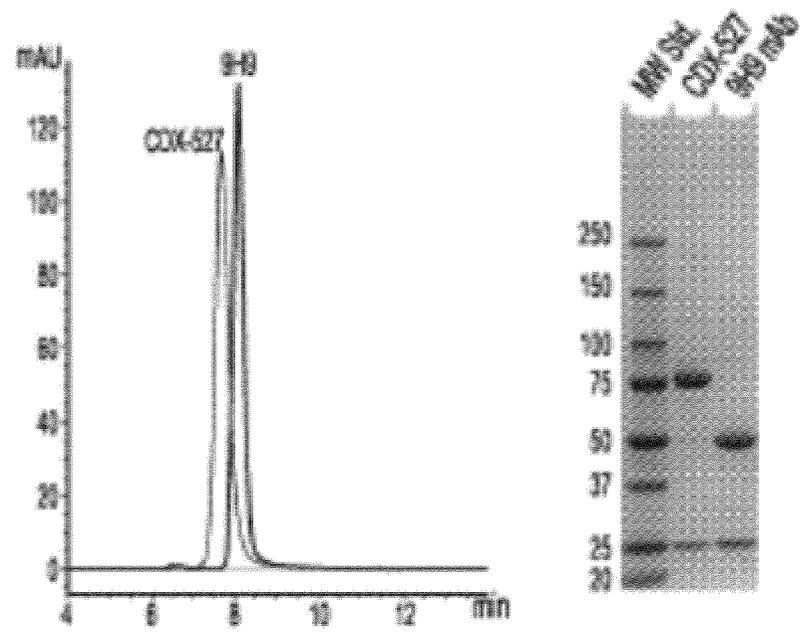
Фиг. 15В



Фиг. 15С

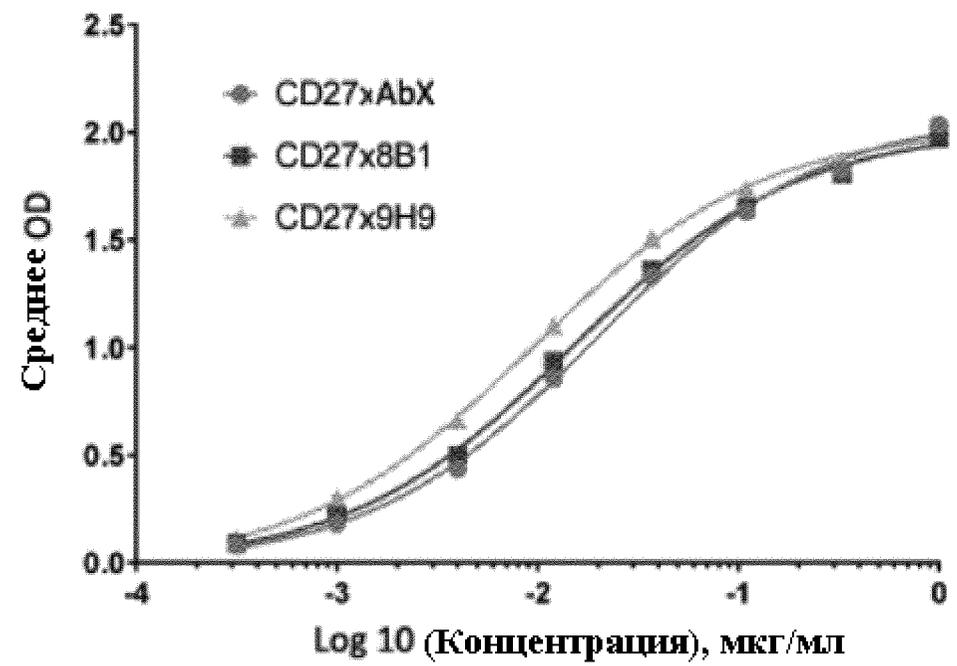
BsAb	АНТИ- CD27 mAb	АНТИ- PD-L1 mAb	Реакционно- способность с МЫШИНЬМ PD-L1
CD27xAbX	1F5	AbX	Да
CD27x8B1	2B3	8B1	Нет
CD27x9H9	2B3	9H9	Нет

Фиг.15D



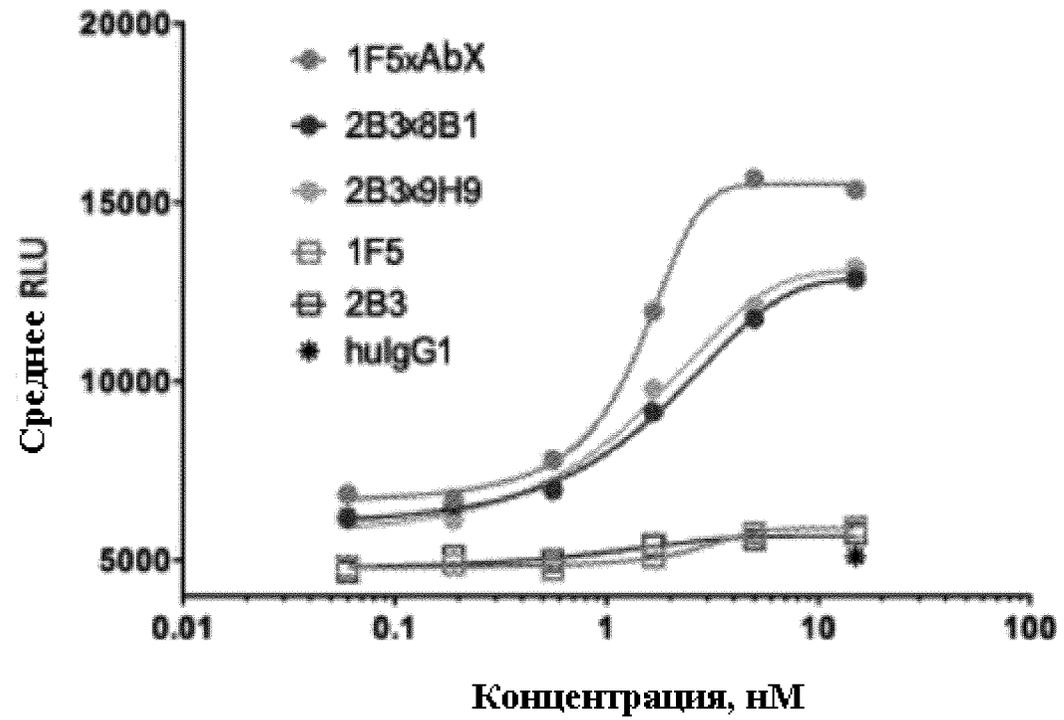
Фиг.15Е

Двухфакторный анализ ELISA



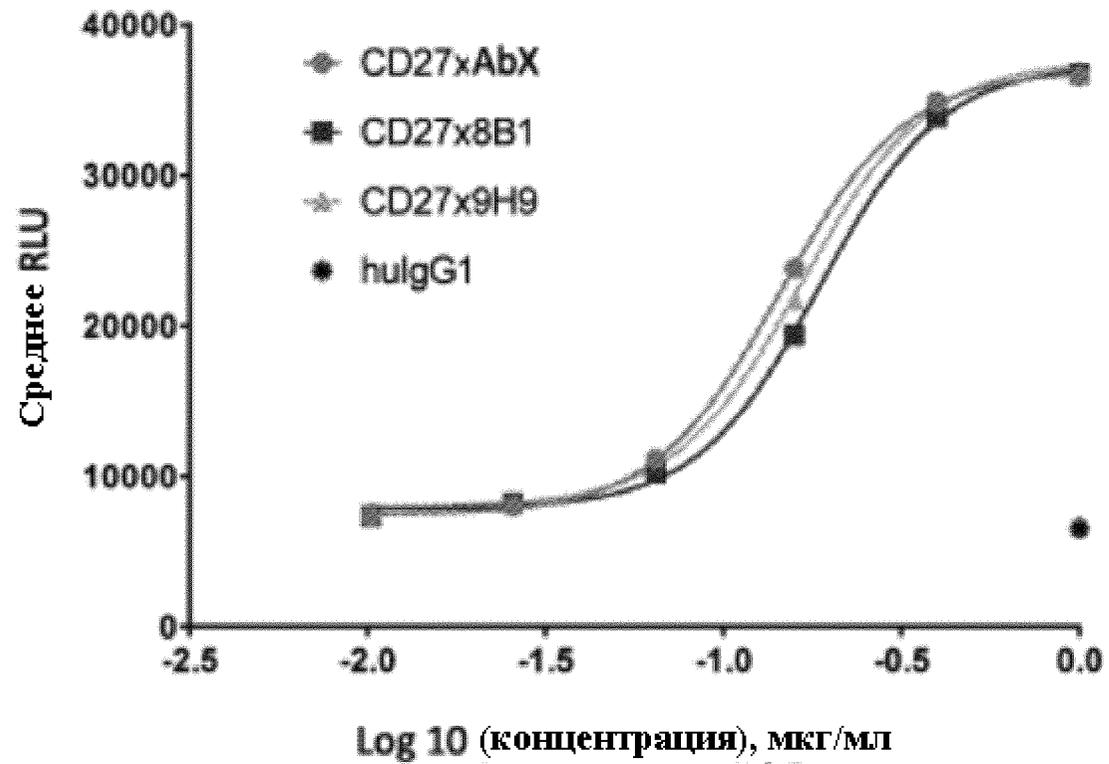
Фиг. 16

Репортерный анализ NFκB (передача сигнала CD27)



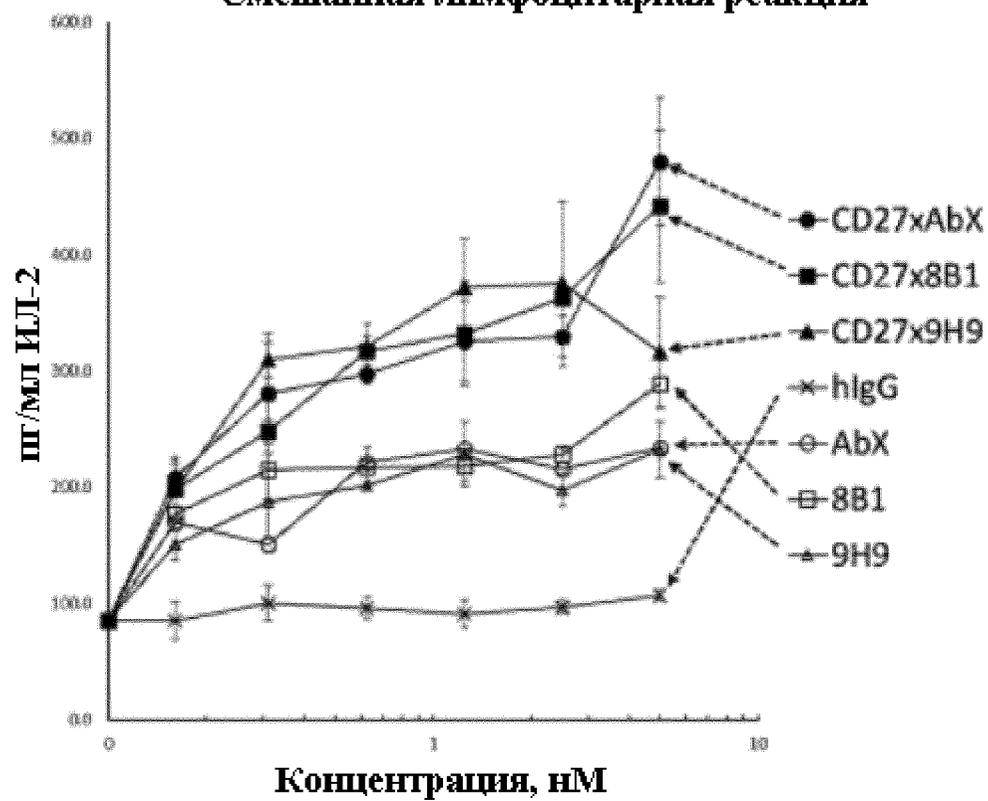
Фиг.17

NFAT репортерный анализ (блокада передачи сигнала PD-1)



Фиг.18

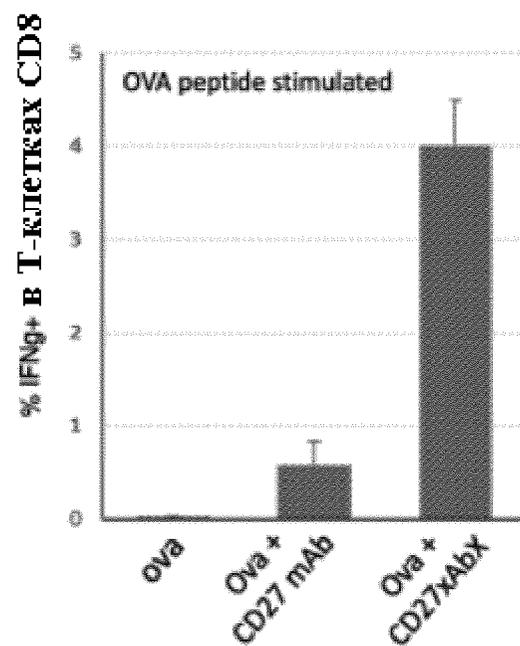
Смешанная лимфоцитарная реакция



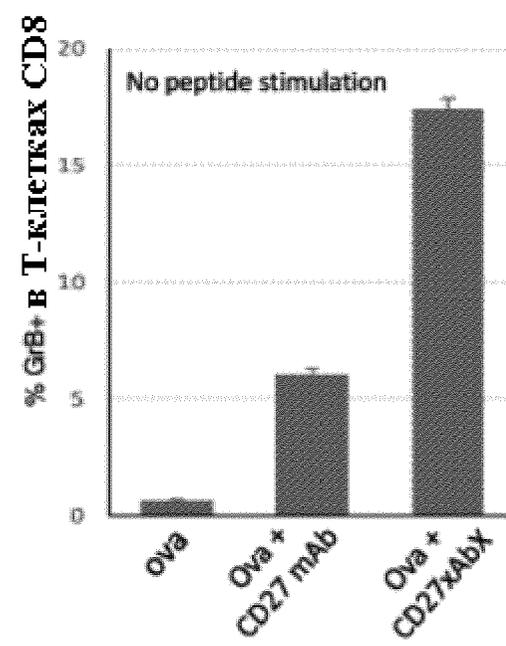
Фиг. 19

Антиген-специфический CD8 Т клеточный ответ

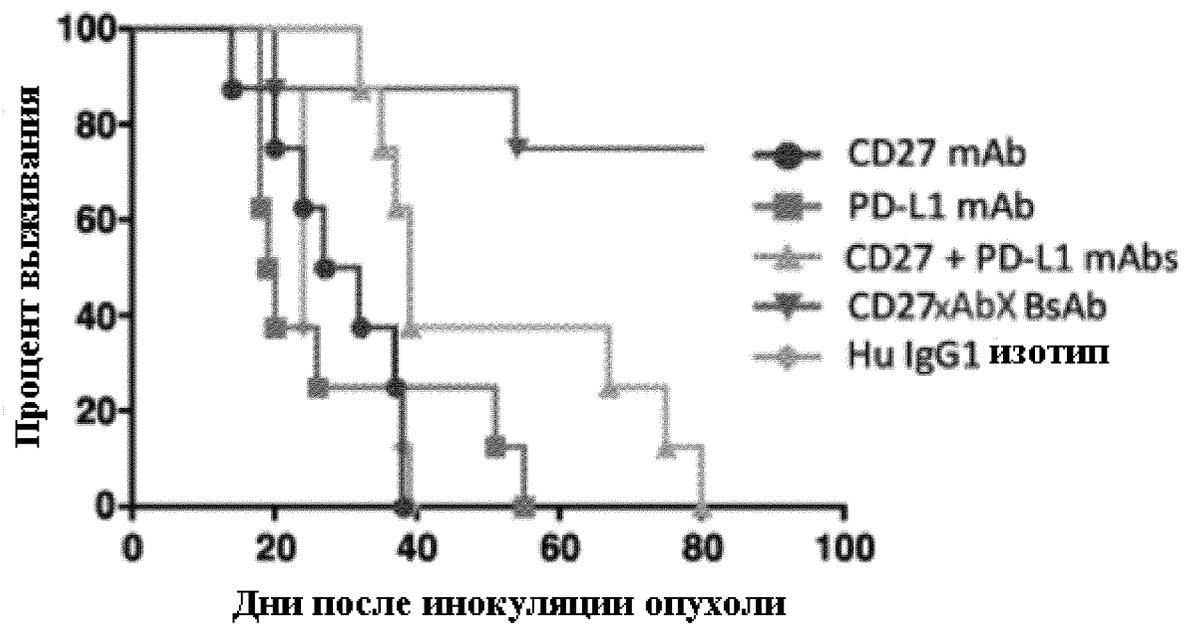
CD8 клеточный ответ



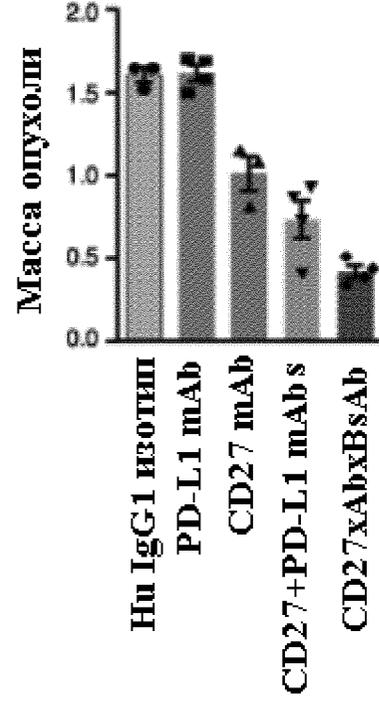
Фиг.20А



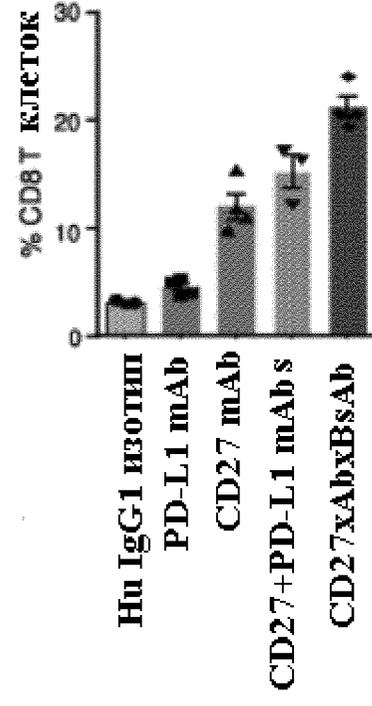
Фиг. 20В



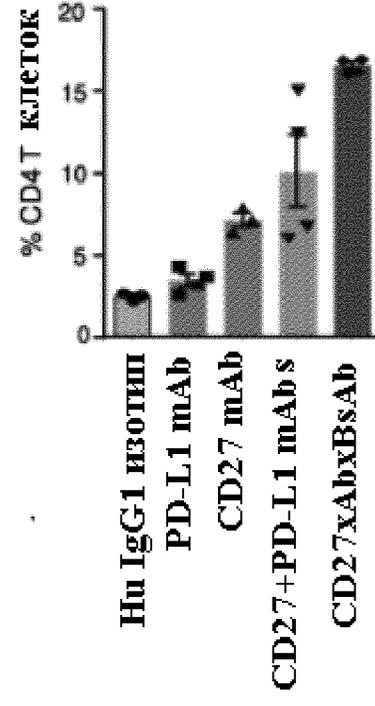
Фиг.21



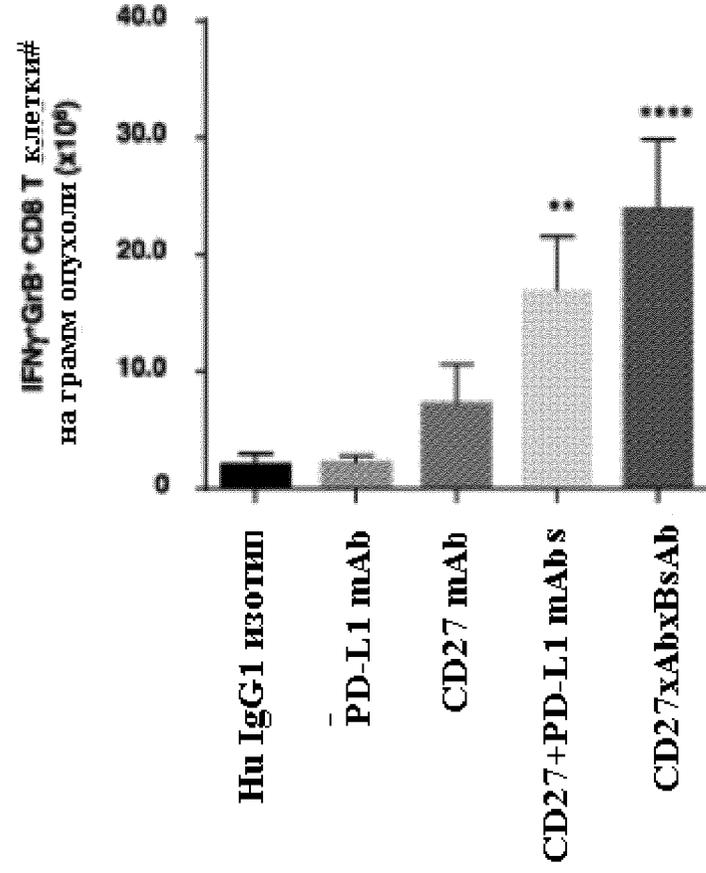
Фиг.22А



Фиг.22В

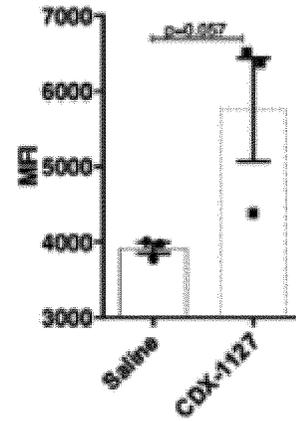


Фиг.22С



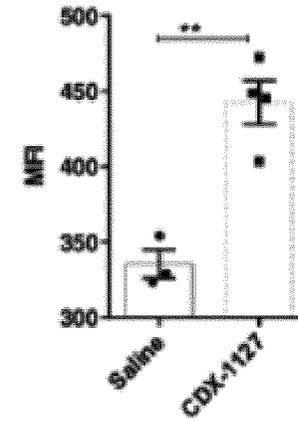
Фиг.22D

Уровень PD-L1 в
опухолевых клетках

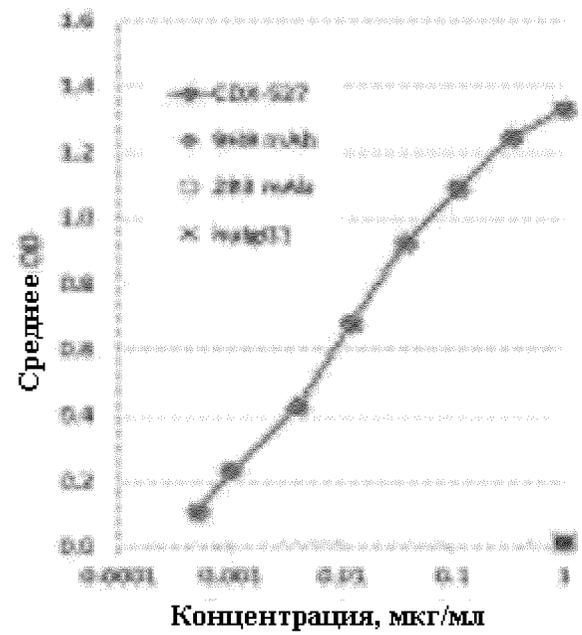


Фиг.23А

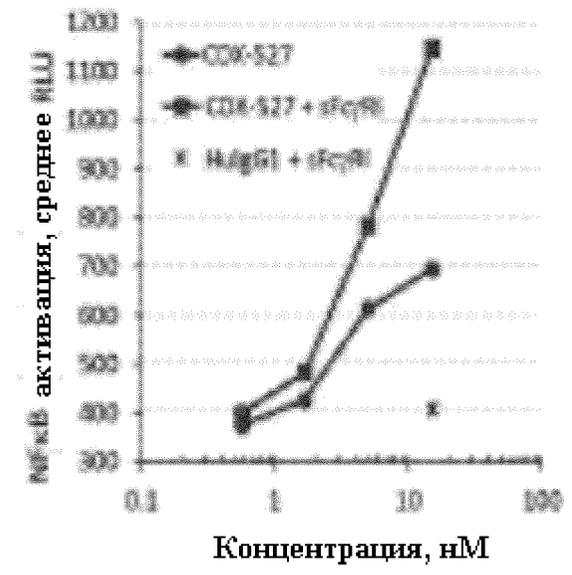
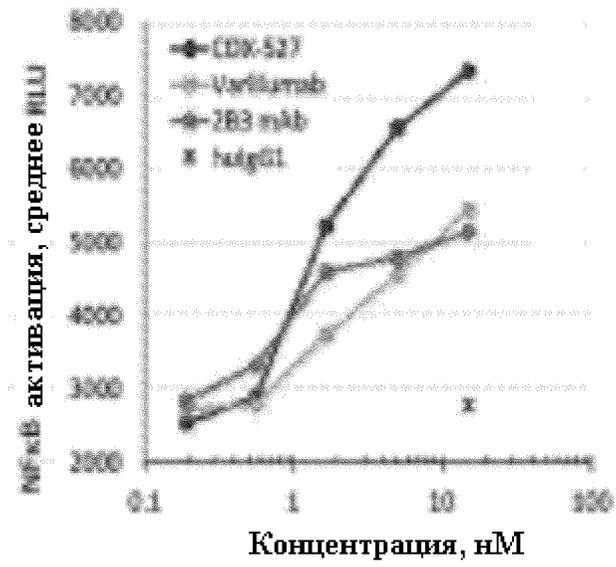
Уровень PD-L1 в
инфильтрующих клетках



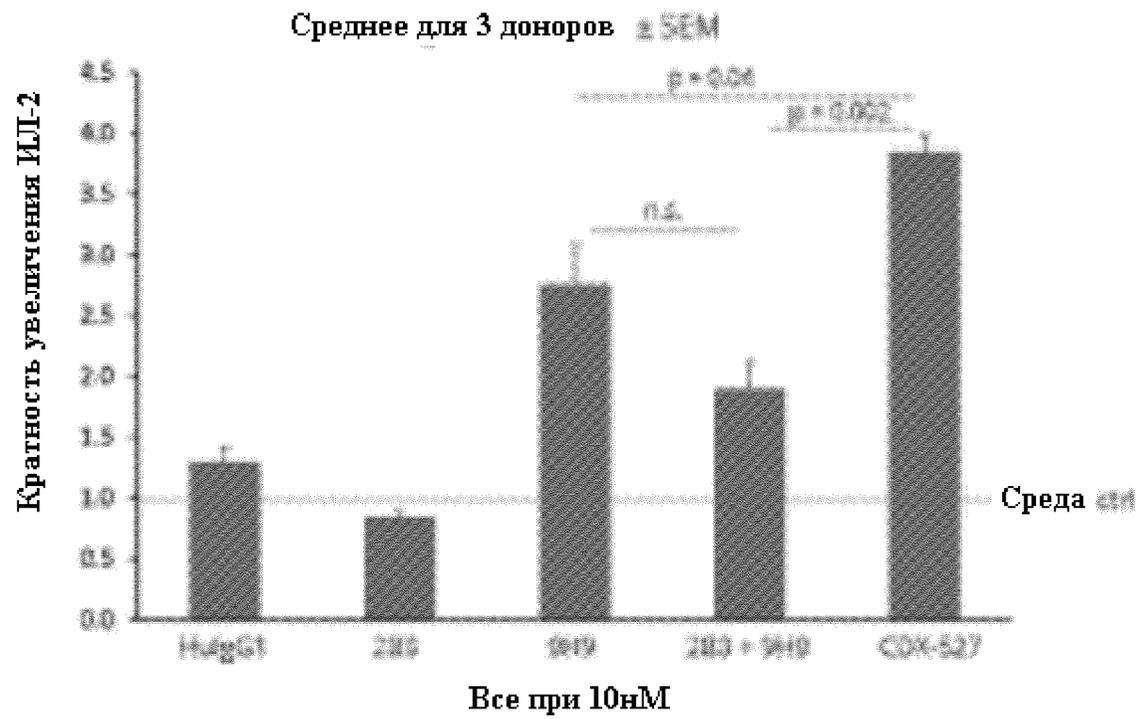
Фиг.23В



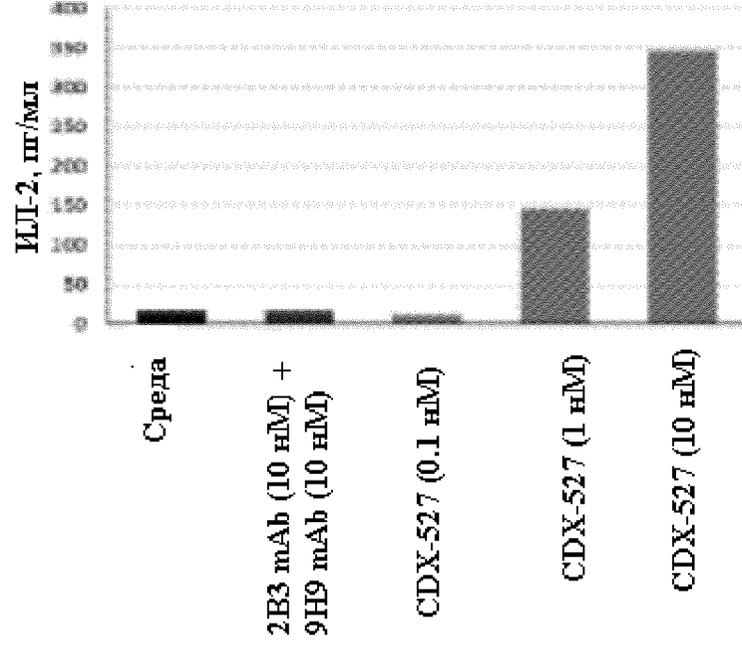
Фиг.24



Фиг.25

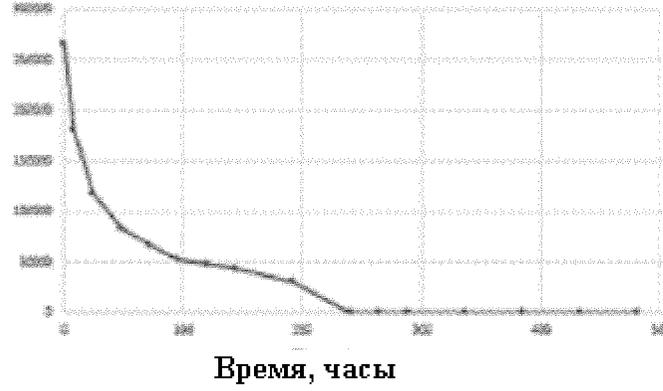


Фиг.26



Фиг.27

Концентрация CDX-527, нг/мл



Фиг.28

9H9x2B3 is more potent at blockade of PD-1 signaling than 2B3x9H9

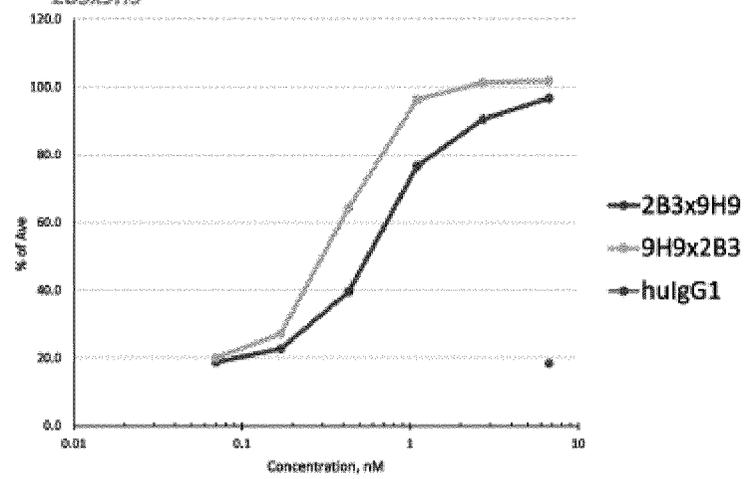
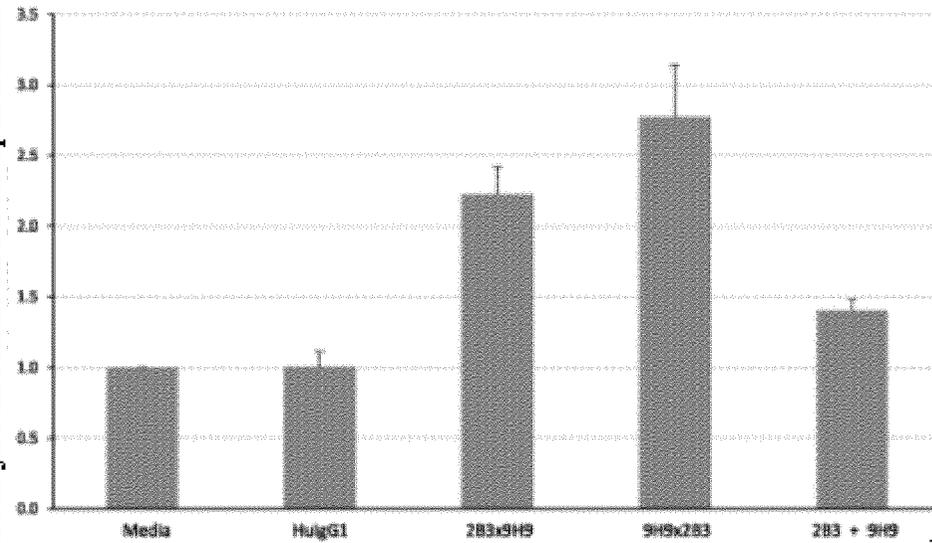


Fig. 29

Кратность увеличения ИЛ-2 по сравнению с контролем

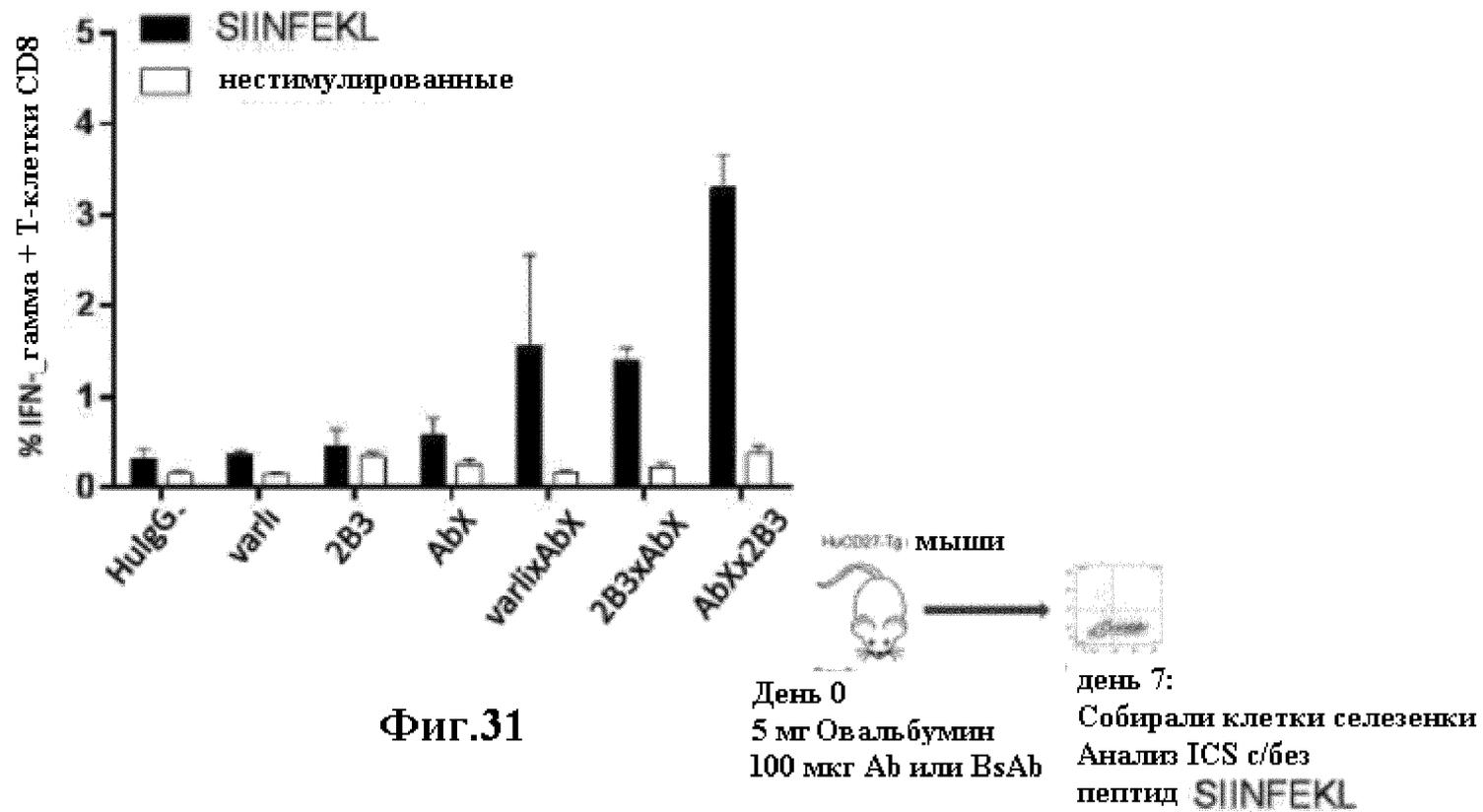
9H9x283 более эффективно при T-клеточной активации чем 283x9H9

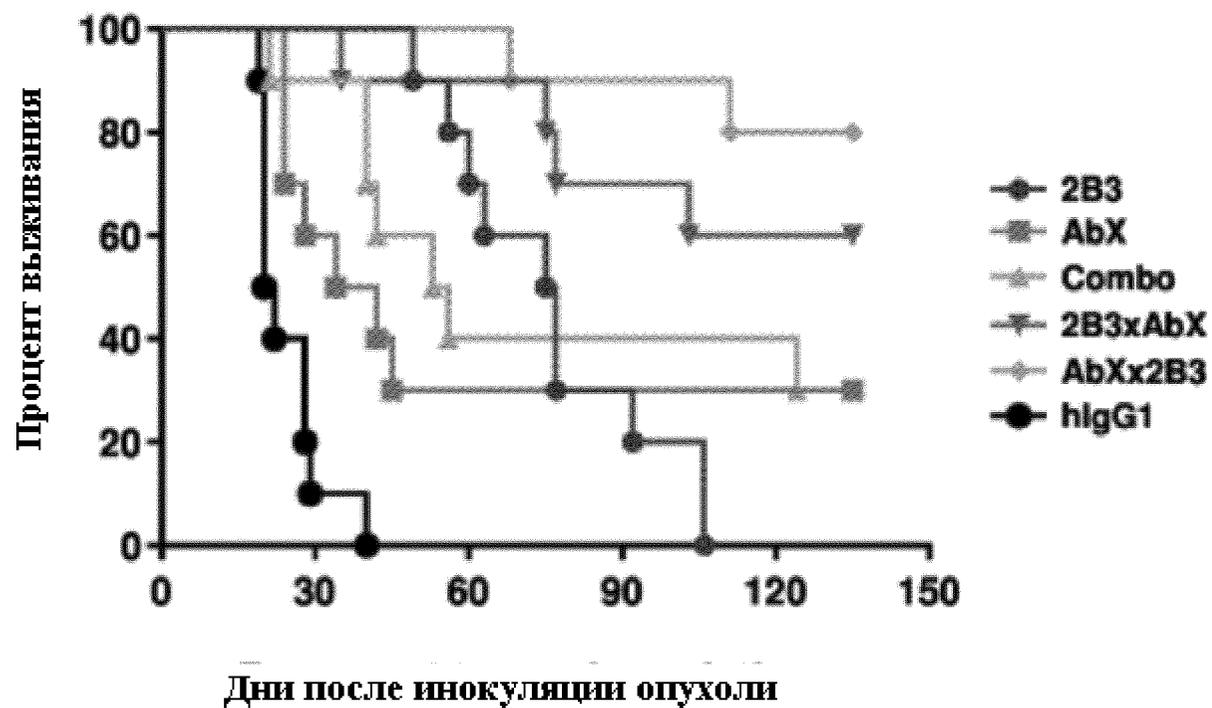
N= 4 донора



Все образцы при 5 нМ

Фиг.30

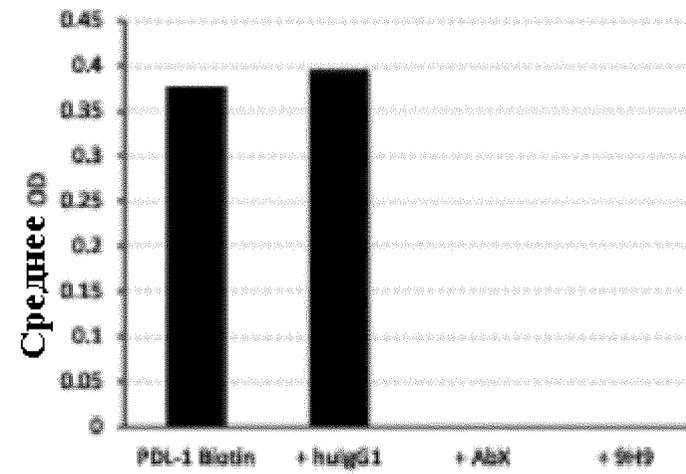




CDX-1127 2018-09: BCL1 клетки 1×10^6 i.v. на день 0; N=10.
 Каждое Ab вводили при 0.2 мг i.p. на день 5.

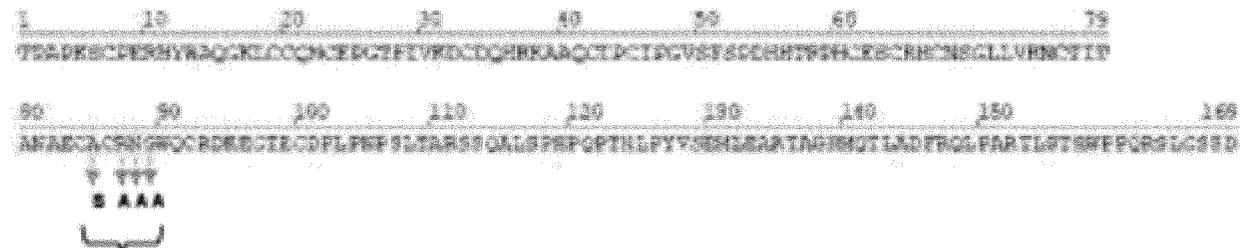
Фиг.32

Блокирование связывания PD-L1 с CD80



Фиг.33

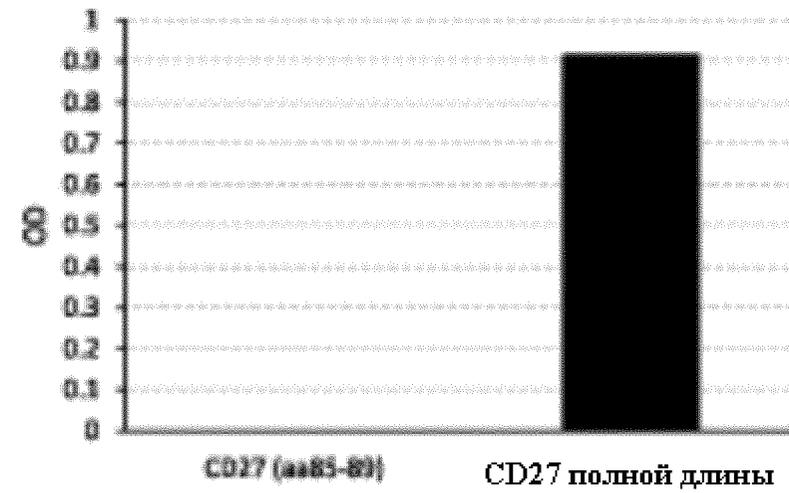
Внеклеточный домен huCD27



мутации в положениях 85, 87, 88, 89

Фиг.34

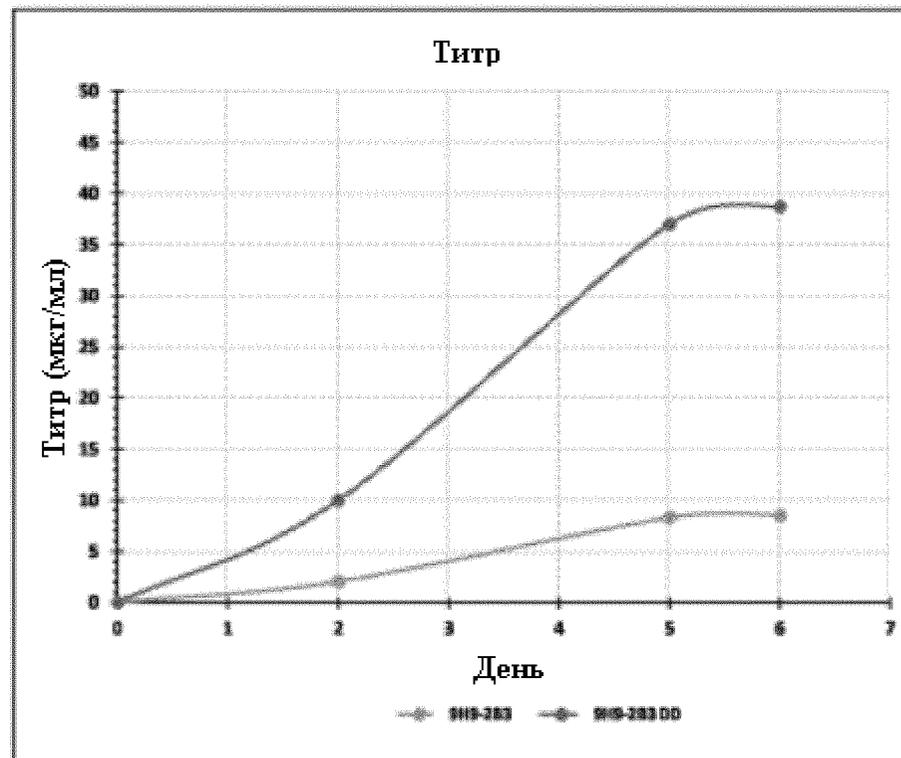
Связывание 2B3 с huCD27



Фиг.35

9H9-2B3 Биспецифичные антитела:

Транзientная трансфекция показывает улучшенную продукцию D-D модификации



Фиг.36