

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045275**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.10

(21) Номер заявки
202191457

(22) Дата подачи заявки
2019.02.15

(51) Int. Cl. **C07K 16/46** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **АНТИ-PD-L1/АНТИ-4-1BB БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/773,239**

(32) **2018.11.30**

(33) **US**

(43) **2021.09.06**

(86) **PCT/CN2019/075180**

(87) **WO 2020/107715 2020.06.04**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭБиЭл БИО ИНК. (KR); Ай-МАБ
БИОФАРМА КО., ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:
**Пак Ынюн, Ли Янгсоон, Чон Хёчин,
Сон Ынсил, Ю Чисон, Пак Минчи,
Сон Ёнг-Куи, Цой Хёчу, Ким Ынчон,
Чон Чаехо, Ю Вон-Кё, Ли Сан Хоон
(KR), Фан Лэй, Цзян Вэньцин (CN)**

(74) Представитель:
**Ловцов С.В., Вилесов А.С., Гавриков
К.В., Коптева Т.В., Левчук Д.В.,
Стукалова В.В., Ясинский С.Я. (RU)**

(56) **WO-A1-2017215590**

WO-A1-2018045110

WO-A1-2017220988

CN-A-107326014

WO-A1-2016061142

**PEREZ-RUIZ, E. et al.: "Anti-CD137 and
PD-1/PD-L1 Antibodies En Route toward Clinical
Synergy", CLIN. CANCER RES., vol. 23, № 18, 08
August 2017 (2017-08-08), abstract, figure 1**

**ZHOU, S.J. et al.: "Strategies for Bispecific
Single Chain Antibody in Cancer Immunotherapy",
JOURNAL OF CANCER, vol. 8, 17 October 2017
(2017-10-17), pages 3689-3696**

(57) Изобретение относится к анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическому антителу, способному эффективно блокировать взаимодействия между PD-L1 и его рецептором PD-1 и между 4-1BB и его лигандом. Биспецифическое антитело может иметь высокую аффинность связывания как с белком PD-L1, так и с белком 4-1BB.

B1**045275****045275****B1**

Уровень техники настоящего изобретения

Лиганд 1 белка программируемой смерти (PD-L1), также известный как кластер дифференциации 274 (CD274) или B7 гомолог 1 (B7-H1), представляет собой трансмембранный белок типа 1 массой 40 кДа, который, как полагают, играет основную роль в подавлении иммунной системы в ходе конкретных событий, таких как беременность, тканевые аллотрансплантаты, аутоиммунные заболевания и другие болезненные состояния, такие как гепатит. Связывание PD-L1 с PD-1 или B7.1 передает сигнал ингибирования, который снижает пролиферацию Т-клеток CD8⁺ в лимфатических узлах, и в дополнение к этому PD-1 также способен контролировать накопление чужеродных антиген-специфических Т-клеток в лимфатических узлах посредством апоптоза, который дополнительно опосредуется более низкой регуляцией гена Bcl-2.

Было показано, что повышающая регуляция PD-L1 может позволить раку ускользнуть от иммунной системы хозяина. Анализ образцов опухолей, взятых у пациентов с почечно-клеточной карциномой, показал, что высокая экспрессия PD-L1 в опухоли связана с повышенной агрессивностью опухоли и повышенным риском смерти. Многие ингибиторы PD-L1 находятся на стадии разработки в качестве иммуноонкологической терапии и показывают хорошие результаты в клинических испытаниях.

4-1BB является членом суперсемейства TNF-рецепторов (TNFRSF) и является костимулирующей молекулой, которая экспрессируется после активации иммунных клеток, как врожденной, так и адаптивной иммунной системы. 4-1BB играет важную роль в модуляции активности различных иммунных клеток. Агонисты 4-1BB усиливают пролиферацию иммунных клеток, выживаемость, секрецию цитокинов и цитолитическую активность Т-клеток CD8. Многие другие исследования показали, что активация 4-1BB усиливает иммунный ответ для устранения опухолей у мышей. Следовательно, предполагают, что 4-1BB является многообещающей молекулой-мишенью в иммунологии рака. Несмотря на свою противоопухолевую эффективность антитело против 4-1BB вызывает тяжелую токсичность для печени при клиническом применении.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическому антителу, способному эффективно блокировать взаимодействия между PD-L1 и его рецептором PD-1 и между 4-1BB и его лигандом. Биспецифическое антитело может иметь высокую аффинность связывания как с белком PD-L1 (например, человеческий белок PD-L1), так и с белком 4-1BB (например, человеческий белок 4-1BB).

Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело может содержать анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве PD-L1-нацеленной составляющей, которая способна специфически распознавать и/или связываться с белком PD-L1, и анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве 4-1BB-нацеленной составляющей, которая способна специфически распознавать и/или связываться с белком 4-1BB.

Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело может содержать анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве PD-L1-нацеленной составляющей.

Согласно варианту осуществления анти-PD-L1 антитело или его фрагмент, содержащиеся в биспецифическом антителе, могут специфически связываться с доменом иммуноглобулина С (IgC) белка PD-L1 (например, человеческий PD-L1). Согласно некоторым вариантам осуществления домен IgC состоит из аминокислотных остатков 133-225 человеческого белка PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-L1 антитело или его фрагмент могут связываться с по меньшей мере одним из аминокислотных остатков Y134, K162 и N183 человеческого белка PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-L1 антитело или его фрагмент не способны связываться с доменом иммуноглобулина V (IgV) белка PD-L1, и, например, домен IgV состоит из аминокислотных остатков 19-127 человеческого белка PD-L1. Например, человеческий белок PD-L1 может быть выбран без ограничения из группы, состоящей из белков, представленных в GenBank под номером доступа NP_001254635.1, NP_001300958.1, NP_054862.1 и т.д. Эти анти-PD-L1 антитела могут быть полезны для терапевтических целей, таких как лечение различных типов рака и т.д., а также могут применяться для диагностических и прогностических целей. Согласно варианту осуществления анти-PD-L1 антитело или его фрагмент способны к специфичности в отношении человеческого белка PD-L1.

Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело содержит анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны специфически связываться с доменом иммуноглобулина С (IgC) человеческого белка лиганд 1 белка программируемой смерти (PD-L1), где домен IgC состоит из аминокислотных остатков 133-225, анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 3, CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 5, 262, 263, 264, 265, 266 и 267, CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 268 и 269, CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 270, 271 и 272, и анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 11, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 13, CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 15, 16 и 17, CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

Согласно варианту осуществления анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 3, CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 5, CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

Согласно варианту осуществления анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с по меньшей мере одним из аминокислотных остатков Y134, K162 или N183 белка PD-L1.

Согласно варианту осуществления анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с аминокислотными остатками Y134, K162 и N83 белка PD-L1.

Согласно варианту осуществления анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не способны связываться с доменом иммуноглобулина V (IgV) белка PD-L1, где домен IgV состоит из аминокислотных остатков 19-127.

Согласно варианту осуществления анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело активирует передачу сигналов 4-1BB или иммунный ответ, в зависимости от PD-L1, экспрессируемого на клеточных поверхностях.

Согласно варианту осуществления каждое из анти-PD-L1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и анти-4-1BB антитела или его антигенсвязывающего фрагмента независимо представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело.

Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело содержит анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где

анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

(1) CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,
(2) CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 3,

(3) CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 5, 262, 263, 264, 265, 266 и 267,

(4) CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 268 и 269,

(5) CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и

(6) CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 270, 271 и 272; и

анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

(i) CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 11,

(ii) CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 13,

(iii) CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 15, 16 и 17,

(iv) CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

(v) CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и

(vi) CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

Анти-PD-L1 антитело или его фрагмент могут содержать

(1) CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

(2) CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 3;

(3) CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 5, 262, 263, 264, 265, 266 и 267;

(4) CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 268 и 269;

(5) CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и

(6) CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 270, 271 и 272.

Например, анти-PD-L1 антитело или его фрагмент могут содержать CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 3, CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 5, 262, 263, 264, 265, 266 или 267, CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 268 или 269, CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3 VL,

имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 270, 271 или 272.

Согласно варианту осуществления анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и 3, CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4 и 5, CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело может содержать анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве 4-1BB-нацеленной составляющей. Согласно варианту осуществления анти-4-1BB антитело или его фрагмент могут специфически связываться с белком 4-1BB (например, человеческий 4-1BB).

Анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны усиливать иммунный ответ и/или лечить опухоль (рак) у млекопитающего. Анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуются локализацией и/или активацией только в микроокружении опухоли (ТМЕ) и/или значительно сниженной токсичностью для печени по сравнению с ранее существовавшими анти-4-1BB антителами, при сохранении эффективности усиления иммунного ответа и/или лечения опухоли.

Например, человеческий белок 4-1BB может быть выбран без ограничения из группы, состоящей из белков, представленных в NCBI под номером доступа NP_001552 и т.д. Эти анти-4-1BB антитела могут быть полезны для терапевтических целей, таких как лечение различных типов рака и т.д., а также могут использоваться для диагностических и прогностических целей.

Согласно варианту осуществления анти-4-1BB антитело или его фрагмент способны к специфичности в отношении человеческого белка 4-1BB. Антитело анти-4-1BB или его фрагмент могут содержать

(i) CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 11;

(ii) CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 13;

(iii) CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 15, 16 и 17;

(iv) CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;

(v) CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; и

(vi) CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

Например, анти-4-1BB антитело или его фрагмент могут содержать CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или 11, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или 13, CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, 15, 16 или 17, CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

Согласно варианту осуществления каждое из анти-PD-L1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и анти-4-1BB антитела или его антигенсвязывающего фрагмента независимо представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело.

Согласно варианту осуществления анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой гуманизированные антитела.

Согласно варианту осуществления анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 103 и 104, или полипептид, имеющий идентичность последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 103 и 104.

Согласно варианту осуществления анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 105 и 106, или пептид, имеющий идентичность последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 105 и 106.

Согласно варианту осуществления анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22, 23 и 24, или полипептид, имеющий идентичность последовательности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22, 23 и 24.

Согласно варианту осуществления анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25 и 26, или пептид, имеющий идентичность последова-

тельности по меньшей мере 90% с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25 и 26.

Согласно варианту осуществления анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело активирует передачу сигналов 4-1BB в зависимости от PD-L1, экспрессируемого на клеточных поверхностях.

Согласно варианту осуществления анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело находится в форме IgG-scFv.

Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело может содержать тяжелый компонент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 и 43, и легкий компонент, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 и 44.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей биспецифическое антитело, как описано выше. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция может применяться для лечения и/или профилактики рака.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения и/или профилактики рака у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающему введение субъекту фармацевтически эффективного количества биспецифического антитела или фармацевтической композиции. Способ может дополнительно предусматривать стадию идентификации субъекта, нуждающегося в лечении и/или профилактике рака, перед стадией введения.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению биспецифического антитела или фармацевтической композиции для лечения и/или профилактики рака. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению биспецифического антитела для получения фармацевтической композиции для лечения и/или профилактики рака.

В отношении фармацевтических композиций, способов и/или применений, раскрытых в настоящем документе, раком может быть солидный рак или рак крови, предпочтительно солидный рак.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к композиции для обнаружения PD-L1, 4-1BB или и того и другого одновременно в биологическом образце, причем композиция содержит биспецифическое антитело. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу обнаружения PD-L1, 4-1BB или и того и другого одновременно в биологическом образце, причем способ предусматривает приведение биологического образца в контакт с биспецифическим антителом и обнаружение (измерение) реакции антиген-антитело (связывания) между биспецифическим антителом и PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим.

Способ обнаружения может после стадии обнаружения дополнительно предусматривать определение присутствует ли PD-L1, 4-1BB или и то, и другое в биологическом образце, когда реакция антиген-антитело обнаружена, и/или отсутствует ли (не присутствует) PD-L1, 4-1BB или и то, и другое в биологическом образце, когда реакция антиген-антитело не обнаружена.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для диагностики заболевания, связанного с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим, причем композиция содержит биспецифическое антитело. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению биспецифического антитела для диагностики заболевания, связанного с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу диагностики заболевания, связанного с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим, причем способ предусматривает приведение в контакт биологического образца, взятого у пациента, с биспецифическим антителом и обнаружение реакции антиген-антитело или измерение уровня реакции антиген-антитело в биологическом образце. Согласно некоторым вариантам осуществления способ может дополнительно предусматривать приведение в контакт нормального образца с биспецифическим антителом и измерение уровня реакции антиген-антитело в нормальном образце. Кроме того, способ может дополнительно предусматривать сравнение уровня реакции антиген-антитело в биологическом образце и в нормальном образце после стадии измерения. Кроме того, после стадии обнаружения или стадии сравнения способ может дополнительно предусматривать определение пациента как пациента с заболеванием, связанным с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим, когда реакция антиген-антитело обнаружена в биологическом образце или уровень реакции антиген-антитело в биологическом образце выше, чем в нормальном образце.

Заболевание, связанное с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим, может быть связано с активацией (например, аномальной активацией или чрезмерной активацией) и/или избыточной продукцией (сверхэкспрессией) PD-L1, 4-1BB или и того и другого. Например, заболевание может представлять собой рак, как описано выше.

Согласно варианту осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему биспецифическое антитело. В частности, согласно варианту осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему тяжелую цепь биспецифического антитела в форме IgG-scFv, которая содержит IgG полной длины и scFv, связанный с C-концом и/или N-концом IgG полной длины. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, коди-

рующему легкую цепь биспецифического антитела в форме IgG-scFv. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантному вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь биспецифического антитела, полинуклеотид, кодирующий легкую цепь биспецифического антитела, или и то, и другое. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантной клетке, трансфицированной рекомбинантным вектором.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу получения биспецифического антитела, предусматривающему экспрессию полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь биспецифического антитела, полинуклеотида, кодирующего легкую цепь биспецифического антитела, в клетке. Стадию экспрессии полинуклеотида можно проводить путем культивирования клетки, содержащей полинуклеотид (например, в рекомбинантном векторе), в условиях, позволяющих экспрессию полинуклеотида. Способ может дополнительно предусматривать выделение и/или очистку биспецифического антитела из клеточной культуры после стадии экспрессии или культивирования.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A и 1B схематически проиллюстрировано анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело согласно варианту осуществления.

На фиг. 2 схематически проиллюстрирован механизм действия анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифического антитела согласно варианту осуществления.

На фиг. 3 приведены графики, демонстрирующие критерии отбора вариантов PD-L1 для того, чтобы идентифицировать необходимые остатки для связывания Hu1210-41.

На фиг. 4 проиллюстрированы расположения Y134, K162 и N183, остатков (сферы), участвующих в связывании с анти-PD-L1 антителом согласно варианту осуществления.

На фиг. 5 показано, что анти-4-1BB антитела согласно вариантам осуществления могут связываться с человеческим 4-1BB с высокой аффинностью.

На фиг. 6 показано, что анти-4-1BB антитела согласно вариантам осуществления могут эффективно связываться с 4-1BB, экспрессируемым на клетках млекопитающих.

На фиг. 7A и 7B приведены графики, иллюстрирующие связывание анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифического антитела согласно варианту осуществления с человеческим PD-L1 и человеческим 4-1BB, как измерено посредством DACE (ELISA с захватом двойного антигена).

На фиг. 8 показано, что анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифические антитела согласно варианту осуществления являются стабильными в сыворотке человека.

На фиг. 9A-9F показано, что биспецифические антитела PD-L1×4-1BB согласно варианту осуществления активируют передачу сигнала 4-1BB в зависимости от экспрессии PD-L1 на клетках-мишенях.

На фиг. 10A и 10B показаны результаты анализа PBMC для анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифических антител согласно вариантам осуществления. Также приведены графики, иллюстрирующие активности промотирования Т-клеток анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифических антител согласно вариантам осуществления.

На фиг. 11 приведен график, иллюстрирующий эффект ингибирования роста опухоли анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифического антитела согласно варианту осуществления.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Определения.

Необходимо отметить, что форма единственного числа объекта относится к одному или нескольким из этих объектов, например, "антитело" следует понимать, как одно или несколько антител. Таким образом, форма единственного числа, термины "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут использоваться взаимозаменяемо в настоящем документе.

В контексте настоящего изобретения термин "полипептид" предназначен для охвата единственного "полипептида", а также множества "полипептидов" и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот и не относится к конкретной длине продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, включены в определение "полипептид", и термин "полипептид" может использоваться вместо или взаимозаменяемо с любым из этих терминов. Термин "полипептид" также предназначен для обозначения продуктов постэкспрессионных модификаций полипептида, включая без ограничения гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификацию не встречающимися в природе аминокислотами. Полипептид может быть получен из природного биологического источника или получен с помощью рекомбинантной технологии, но не обязательно транскрибируется с указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть создан любым способом, в том числе путем химического синтеза.

Термин "выделенные", используемый в настоящем документе в отношении клеток, нуклеиновых кислот, таких как ДНК или РНК, относится к молекулам, отделенным от других ДНК или РНК соответственно, которые присутствуют в природном источнике макромолекулы. В контексте настоящего изобретения

брения термин "выделенная" также относится к нуклеиновой кислоте или пептиду, которые по существу не содержат клеточный материал, вирусный материал или культуральную среду при получении методами рекомбинантной ДНК, или химические предшественники или другие химические вещества при химическом синтезе. Более того, "выделенная нуклеиновая кислота" предназначена для включения фрагментов нуклеиновой кислоты, которые не встречаются в природе в виде фрагментов и не могут быть обнаружены в природном состоянии. В контексте настоящего изобретения термин "выделенные" также относится к клеткам или полипептидам, которые отделены от других клеточных белков или тканей. Подразумевается, что выделенные полипептиды охватывают как очищенные, так и рекомбинантные полипептиды.

В контексте настоящего изобретения термин "рекомбинантный" в отношении полипептидов или полинуклеотидов означает форму полипептида или полинуклеотида, которая не существует в природе, неограничивающий пример которой может быть создан путем объединения полинуклеотидов или полипептидов, которые обычно не встречаются в природе вместе.

"Гомология", или "идентичность", или "сходство" относится к сходству последовательностей между двумя пептидами или между двумя молекулами нуклеиновой кислоты. Гомология может быть определена путем сравнения положения в каждой из последовательностей, которые могут быть выровнены в целях сравнения. Когда положение в сравниваемой последовательности занято тем же основанием или аминокислотой, тогда молекулы гомологичны в этом положении. Степень гомологии между последовательностями является функцией числа совпадающих или гомологичных положений, общих для последовательностей. "Неродственная" или "негомологичная" последовательность имеет менее 40% идентичности, хотя предпочтительно менее 25% идентичности, с одной из последовательностей согласно настоящему изобретению.

Полинуклеотид или полинуклеотидная область (или полипептид или полипептидная область) имеет определенный процент (например, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%) "идентичности последовательности" с другой последовательностью, что означает, что при выравнивании этот процент оснований (или аминокислот) является таким же, как при сравнении двух последовательностей. Это выравнивание и процент гомологии или идентичности последовательностей можно определить с применением программных обеспечений, известных в данной области техники, например, программных обеспечений, описанных в Ausubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology. Предпочтительно для выравнивания используются параметры по умолчанию. Одним программным обеспечением для выравнивания является BLAST с использованием параметров по умолчанию. В частности, программными обеспечениями являются BLASTN и BLASTP, использующие следующие параметры по умолчанию: генетический код=стандартный, фильтр=нет, нить=обе, отсечка=60, ожидание=10, матрица=BLOSUM62, описания=50 последовательностей, сортировать по=ВЫСОКАЯ ОЦЕНКА, базы данных=неизбыточные, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS трансляции+SwissProtein+SPupdate+PIR. Биологически эквивалентные полинуклеотиды представляют собой те, которые имеют указанный выше процент гомологии и кодируют полипептид, обладающий такой же или подобной биологической активностью.

Термин "эквивалентная нуклеиновая кислота или полинуклеотид" относится к нуклеиновой кислоте, имеющей нуклеотидную последовательность, имеющую определенную степень гомологии или идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью нуклеиновой кислоты или ее комплементом. Подразумевается, что гомолог двухцепочечной нуклеиновой кислоты включает нуклеиновые кислоты, имеющие нуклеотидную последовательность, которая имеет определенную степень гомологии с нуклеотидной последовательностью нуклеиновой кислоты или ее комплементом. Согласно одному аспекту гомологи нуклеиновых кислот способны гибридизоваться с нуклеиновой кислотой или ее комплементом. Подобным образом, "эквивалентный полипептид" относится к полипептиду, имеющему определенную степень гомологии или идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью эталонного полипептида. Согласно некоторым аспектам идентичность последовательности составляет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%. Согласно некоторым аспектам эквивалентный полипептид или полинуклеотид имеет одно, два, три, четыре или пять добавлений, делеций, замен и их комбинаций по сравнению с эталонным полипептидом или полинуклеотидом. Согласно некоторым аспектам эквивалентная последовательность сохраняет активность (например, связывание эпитопа) или структуру (например, солевой мостик) эталонной последовательности.

Реакции гибридизации можно проводить в условиях разной "жесткости". В общем реакцию гибридизации низкой жесткости проводят при температуре приблизительно 40°C в приблизительно 10×SSC или растворе с эквивалентной ионной силой/температурой. Гибридизацию средней жесткости, как правило, проводят при приблизительно 50°C в приблизительно 6×SSC, а реакцию гибридизации высокой жесткости, как правило, проводят при приблизительно 60°C в приблизительно 1×SSC. Реакции гибридизации также можно проводить в "физиологических условиях", которые хорошо известны специалисту в данной области техники. Неограничивающим примером физиологического условия является температура, ионная сила, значение pH и концентрация Mg^{2+} , обычно обнаруживаемые в клетке.

Полинуклеотид состоит из определенной последовательности из четырех нуклеотидных оснований: аденина (А), цитозина (С), гуанина (G), тимина (Т) и урацила (U) вместо тимина, когда полинуклеотид представляет собой РНК. Таким образом, термин "полинуклеотидная последовательность" представляет собой алфавитное представление молекулы полинуклеотида. Это алфавитное представление может быть введено в базы данных на компьютере, имеющем центральный процессор, и использоваться для приложений биоинформатики, таких как функциональная геномика и поиск гомологии. Термин "полиморфизм" относится к сосуществованию более чем одной формы гена или его части. Часть гена, у которой существуют по меньшей мере две разные формы, т.е. две разные нуклеотидные последовательности, называется "полиморфной областью гена". Полиморфная область может быть одним нуклеотидом, идентичность которого различается в разных аллелях.

Термины "полинуклеотид" и "олигонуклеотид" используются взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидов, либо рибонуклеотидов, либо их аналогов. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: ген или фрагмент гена (например, зонд, праймер, метка EST или SAGE), экзоны, интроны, информационная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомная РНК, рибозимы, кДНК, дцРНК, миРНК, микроРНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, зонды нуклеиновых кислот и праймеры. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. Если присутствуют, модификации нуклеотидной структуры могут быть внесены до или после сборки полинуклеотида. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид можно дополнительно модифицировать после полимеризации, как например, путем конъюгации с вносящим метку компонентом. Термин также относится как к двухцепочечным, так и к одноцепочечным молекулам. Если не указано или не требуется иное, любой вариант осуществления настоящего изобретения, который представляет собой полинуклеотид, охватывает как двухцепочечную форму, так и каждую из двух комплементарных одноцепочечных форм, которые, как известно или предсказано, образуют двухцепочечную форму.

Термин "кодировать" при применении в отношении полинуклеотидов относится к полинуклеотиду, который, как указано, "кодирует" полипептид, если в его нативном состоянии или при манипулировании способами, хорошо известными специалистам в данной области техники, он может быть транскрибирован и/или транслирован с получением мРНК полипептида и/или его фрагмента. Антисмысловая цепь представляет собой комплемент такой нуклеиновой кислоты, и кодирующая последовательность может быть выведена из нее.

В контексте настоящего изобретения "антитело" или "антигенсвязывающий полипептид" относится к полипептиду или полипептидному комплексу, который специфически распознает антиген и связывается с ним. Антителом может быть целое антитело и любой его антигенсвязывающий фрагмент или его одна цепь. Таким образом, термин "антитело" включает любую молекулу, содержащую белок или пептид, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, обладающую биологической активностью связывания с антигеном. Их примеры включают без ограничения определяющую комплементарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи или ее лиганд-связывающую часть, варибельную область тяжелой цепи или легкой цепи, константную область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасную область (FR) или любую ее часть, или по меньшей мере одну часть связывающего белка.

В контексте настоящего изобретения термины "фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" представляет собой часть антитела, такую как F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv и т.п. Независимо от структуры фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознается интактным антителом. Термин "фрагмент антитела" включает аптамеры, шпигельмеры и диатела. Термин "фрагмент антитела" также включает любой синтетический или полученный методом геной инженерии белок, который действует как антитело посредством связывания со специфическим антигеном с образованием комплекса.

"Одноцепочечный варибельный фрагмент" или "scFv" относится к слитому белку варибельных областей тяжелой (V_H) и легкой цепей (V_L) иммуноглобулинов. Согласно некоторым аспектам области соединены коротким линкерным пептидом, состоящим из 10-25 аминокислот. Линкер может быть богат глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости, и может либо соединять N-конец V_H с C-концом V_L, либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера. Молекулы ScFv известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 5892019.

Термин антитело охватывает различные широкие классы полипептидов, которые можно различить биохимическим образом. Специалистам в данной области техники очевидно, что тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ , μ , α , δ , ϵ) с некоторыми подклассами среди них (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Именно природа цепи определяет "класс" антитела как IgG, IgM, IgA, IgG или IgE, соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5 и т.д.,

хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию. Модифицированные варианты каждого из этих классов и изоформ легко различимы для квалифицированного специалиста с учетом настоящего раскрытия и, соответственно, находятся в пределах объема настоящего раскрытия. Все классы иммуноглобулинов явно входят в объем настоящего раскрытия, следующее обсуждение в целом будет направлено на класс молекул иммуноглобулина IgG. Что касается IgG, стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 Да и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи обычно соединены дисульфидными связями в конфигурации "Y", где легкие цепи захватывают в вилку тяжелые цепи, начиная с устья "Y" и далее через переменную область.

Антитела, их антигенсвязывающие полипептиды, варианты или производные согласно настоящему изобретению включают без ограничения поликлональные, моноклональные, мультиспецифические, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fvs, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, дисульфид-связанные Fv (sdFv), фрагменты, содержащие либо домен VL, либо VH, фрагменты, продуцируемые библиотекой экспрессии Fab, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-N-антитела к антителам LIGHT, описанным в настоящем документе). Молекулы иммуноглобулина или антитела согласно настоящему раскрытию могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекул иммуноглобулина.

Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда (K, λ). Каждый класс тяжелой цепи может быть связан с легкой цепью либо каппа, либо лямбда. В общем легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, а "хвостовые" части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда иммуноглобулины генерируются либо гибридомами, либо В-клетками, либо генно-инженерными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности проходят от N-конца на разветвленных концах Y-конфигурации до C-конца внизу каждой цепи.

Как легкие, так и тяжелые цепи разделены на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константная" и "переменная" используются функционально. В этом отношении следует понимать, что переменные домены участков как легкой (VL), так и тяжелой (VH) цепи определяют распознавание антигена и специфичность к нему. Напротив, константные домены легкой цепи (СК) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная подвижность, связывание с рецептором Fc, связывание комплемента и т.п. Условно нумерация доменов константной области увеличивается по мере того, как они становятся более удаленными от антигенсвязывающего сайта или аминоконца антитела. N-концевая часть представляет собой переменную область, а C-концевая часть является константной областью, домены CH3 и СК фактически содержат карбокси-конец тяжелой и легкой цепи, соответственно.

Как указано выше, переменная область позволяет антителу селективно распознавать и специфически связывать эпитопы на антигенах. Т.е. домен VL и домен VH или подмножество определяющих комплементарность областей (CDR) антитела объединяются с образованием переменной области, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно, антигенсвязывающий сайт определяется тремя CDR на каждой из цепей VH и VL (т.е. CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). В некоторых случаях, например, определенных молекул иммуноглобулинов, происходящих из видов верблюдовых или созданных на основе иммуноглобулинов верблюдовых, полная молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей без легких цепей. См., например, Hamers-Casterman et al., *Nature*, 363:446-448 (1993).

В встречающихся в природе антителах шесть "определяющих комплементарность областей" или "CDR", присутствующие в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот, которые специфически расположены с образованием антигенсвязывающего домена, поскольку антитело принимает его трехмерную конфигурацию в водной среде. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые "каркасными" областями, демонстрируют меньшую межмолекулярную переменность. Каркасные области в значительной степени принимают конформацию β -листа, а CDR образуют петли, которые соединяют и в некоторых случаях образуют часть структуры β -листа. Таким образом, каркасные области действуют, образуя каркас, который обеспечивает правильную ориентацию CDR посредством межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный расположенными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с его родственным эпитопом. Аминокислоты, содержащие CDR и каркасные области, соответственно, для любой данной переменной области тяжелой или легкой цепи, могут быть легко идентифицированы специалистом в данной области техники, поскольку они были точно определены (см. www.bioinf.org.uk: Dr. Andrew C.R. Martin's Group; "Sequences of Proteins of Immu-

nological Interest", Kabat, E. et al., U.S., Department of Health and Human Services (1983); и Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)).

В случае когда существует два или более определений термина, который используется и/или принят в данной области техники, определение термина, используемое в настоящем документе, предназначено для включения всех таких значений, если явно не указано иное. Конкретным примером является использование термина "определяющая комплементарность область" ("CDR") для описания несмежных антигенсвязывающих сайтов антитела, обнаруживаемых в варибельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Эта конкретная область была описана Kabat et al., U.S., Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983); и Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987), которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Определения CDR по Кабату и Чотиа включают перекрывания или подгруппы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее предполагается, что применение любого определения для обозначения CDR антитела или его вариантов находится в пределах объема термина, определенного и используемого в настоящем документе. Соответствующие аминокислотные остатки, которые включают CDR, как определено в каждом из приведенных выше ссылочных источников, представлены в таблице ниже для сравнения. Точные номера остатков, которые охватывают конкретную CDR, будут варьироваться в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области могут обычным образом определить какие остатки содержат конкретную CDR, учитывая аминокислотную последовательность варибельной области антитела.

Таблица 1

	Кабат	Чотиа
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

Kabat et al. также определили систему нумерации последовательностей варибельных доменов, которая применима к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначно применять эту систему "нумерации по Кабату" для любой последовательности варибельного домена, не полагаясь на какие-либо экспериментальные данные, помимо самой последовательности. В настоящем документе "нумерация по Кабату" относится к системе нумерации, установленной в Kabat et al., U.S., Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983).

В дополнение к приведенной выше таблице система нумерации по Кабату описывает области CDR следующим образом: CDR-H1 начинается приблизительно в положении аминокислоты 31 (т.е. приблизительно 9 остатков после первого остатка цистеина), включает приблизительно 5-7 аминокислот и заканчивается следующим остатком триптофана. CDR-H2 начинается в положении пятнадцатого остатка после конца CDR-H1, включает приблизительно 16-19 аминокислот и заканчивается следующим остатком аргинина или лизина. CDR-H3 начинается приблизительно в положении тридцать третьего аминокислотного остатка после конца CDR-H2, включает 3-25 аминокислот и заканчивается последовательностью W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту. CDR-L1 начинается приблизительно в положении остатка 24 (т.е. после остатка цистеина), включает приблизительно 10-17 остатков и заканчивается следующим остатком триптофана. CDR-L2 начинается приблизительно в положении шестнадцатого остатка после конца CDR-L1 и включает приблизительно 7 остатков. CDR-L3 начинается приблизительно в положении тридцать третьего остатка после конца CDR-L2 (т.е. после остатка цистеина), включает приблизительно 7-11 остатков и заканчивается последовательностью F или W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту.

Раскрытые в настоящем документе антитела могут быть любого животного происхождения, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. Согласно другому варианту осуществления варибельная область может происходить из хрящевых рыб (например, из акул).

В контексте настоящего изобретения термин "константная область тяжелой цепи" включает аминокислотные последовательности, происходящие из тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи, содержит по меньшей мере одно из домена CH1, шарнирного домена (например, верхней, средней и/или нижней шарнирной области), домена CH2, домена CH3 или его варианта или фрагмента. Например, антигенсвязывающий полипептид для применения согласно настоящему изобретению может содержать полипептидную цепь, содержащую домен CH1, полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен CH2, полипептидную цепь, содержащую домен CH1 и домен CH3, полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по

меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН3, или полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена, домен СН2 и домен СН3. Согласно другому варианту осуществления полипептид согласно настоящему изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую домен СН3. Кроме того, антитело для применения согласно настоящему изобретению может не содержать по меньшей мере часть домена СН2 (например, весь домен СН2 или его часть). Как изложено выше, специалисту в данной области техники понятно, что константная область тяжелой цепи может быть модифицирована таким образом, что отличается по аминокислотной последовательности от встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина.

Константная область тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе, может происходить из различных молекул иммуноглобулина. Например, константная область тяжелой цепи полипептида может включать домен СН1, происходящий из молекулы IgG1, и шарнирную область, происходящую из молекулы IgG3. В другом примере константная область тяжелой цепи может включать шарнирную область, частично происходящую из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG3. В другом примере часть тяжелой цепи может включать химерный шарнир, частично происходящий из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG4.

В контексте настоящего изобретения термин "константная область легкой цепи" включает аминокислотные последовательности, происходящие из легкой цепи антитела. Предпочтительно константная область легкой цепи содержит по меньшей мере один из константного каппа-домена или константного лямбда-домена.

"Пара легкая цепь-тяжелая цепь" относится к совокупности легкой цепи и тяжелой цепи, которые могут образовывать димер посредством дисульфидной связи между доменом CL легкой цепи и доменом СН1 тяжелой цепи.

Как указано ранее, структуры субъединиц и трехмерная конфигурация константных областей различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. В контексте настоящего изобретения термин "домен VH" включает аминоконцевой вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, а термин "домен СН1" включает первый (наиболее аминоконцевой) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Домен СН1 является соседним с доменом VH и является аминоконцевым по отношению к шарнирной области молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина.

В контексте настоящего изобретения термин "домен СН2" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, приблизительно от остатка 244 до остатка 360 антитела с использованием обычных схем нумерации (остатки 244-360, система нумерации по Кабату, и остатки 231- 340, ЕС система нумерации; см. Kabat et al., U.S., Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983). Домен СН2 уникален тем, что он не спарен с другим доменом. Скорее, две N-связанные разветвленные углеводные цепи расположены между двумя доменами СН2 интактной нативной молекулы IgG. Также хорошо задокументировано, что домен СН3 простирается от домена СН2 до C-конца молекулы IgG и включает приблизительно 108 остатков.

В контексте настоящего изобретения термин "шарнирная область" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен СН1 с доменом СН2. Эта шарнирная область состоит приблизительно из 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям двигаться независимо. Шарнирные области можно подразделить на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux et al., J. Immunol., 161:4083 (1998)).

В контексте настоящего изобретения термин "дисульфидная связь" включает ковалентную связь, образованную между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик со второй тиольной группой. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG области СН1 и СК связаны дисульфидной связью, а две тяжелые цепи связаны двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242, с использованием системы нумерации по Кабату (положение 226 или 229, ЕС система нумерации).

В контексте настоящего изобретения термин "химерное антитело" означает любое антитело, в котором иммунореактивная область или сайт получены или происходят из первого вида, а константная область (которая может быть интактной, частичной или модифицированной в соответствии с настоящим изобретением) происходит из второго вида. Согласно некоторым вариантам осуществления целевая область или сайт связывания будет происходить из источника, не относящегося к человеку (например, мыши или примата), а константная область является человеческой.

В контексте настоящего изобретения термин "процент гуманизации" рассчитывается путем определения числа аминокислотных различий каркасной области (т.е. не-CDR различия) между гуманизованным доменом и доменом зародышевой линии, вычитания этого числа из общего числа аминокислот, а затем деления полученного числа на общее число аминокислот и умножения на 100.

"Специфически связывается" или "имеет специфичность в отношении" в общем означают, что антитело связывается с эпитопом через свой антигенсвязывающий домен, и что связывание придает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно этому определению указывают, что антитело "специфически связывается" с эпитопом, когда оно связывается с этим эпитопом через свой антигенсвязывающий домен более легко, чем оно могло бы связываться со случай-

ным, неродственным эпитопом. В контексте настоящего изобретения термин "специфичность" используется для определения относительной аффинности, с помощью которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно считать, что антитело "А" имеет более высокую специфичность для данного эпитопа, чем антитело "В", или можно сказать, что антитело "А" связывается с эпитопом "С" с более высокой специфичностью, чем для родственного эпитопа "D". Предпочтительно антитело связывается с антигеном (или эпитопом) с "высокой аффинностью", а именно с K_D , равной 1×10^{-7} М или менее, более предпочтительно 5×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 3×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 25×10^{-9} М или менее или даже более предпочтительно 1×10^{-9} М или менее.

В контексте настоящего изобретения термины "лечить" или "лечение" могут относиться как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, где цель состоит в предотвращении или замедлении (уменьшении) нежелательного физиологического изменения или нарушения, такого как прогрессирование рака. Благоприятные или желаемые клинические результаты включают без ограничения облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или паллиативное течение заболевания и ремиссию (частичную или полную), обнаруживаемые или не обнаруживаемые. "Лечение" также может означать увеличение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни при отсутствии лечения. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, кто уже имеет состояние или нарушение, а также тех, кто склонен к приобретению состояния или нарушения, или тех, у кого состояние или нарушение необходимо предотвратить.

Термином "субъект", или "индивидуум", или "животное", или "пациент", или "млекопитающее" может быть обозначен любой субъект, в частности, млекопитающее, для которого желательна постановка диагноза, составление прогноза или терапия. Субъекты-млекопитающие включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных, животных, содержащихся в зоопарке, спортивных или домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и т.д.

В контексте настоящего изобретения фразы, такие как "пациент, нуждающийся в лечении" или "субъект, нуждающийся в лечении" включают субъектов, таких как субъекты-млекопитающие, которым будет полезно введение антитела или композиции согласно настоящему изобретению, применяемых, например, для обнаружения, для диагностической методики и/или для лечения.

Настоящее изобретение относится к анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическому антителу, способному эффективно блокировать взаимодействия между PD-L1 и его рецептором PD-1 и между 4-1BB и его лигандом. Биспецифическое антитело может иметь высокую аффинность связывания как с белком PD-L1 (например, человеческий белок PD-L1), так и с белком 4-1BB (например, человеческий белок 4-1BB).

Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело может содержать анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве PD-L1-нацеленной составляющей, которая способна специфически распознавать и/или связываться с белком PD-L1, и анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве 4-1BB-нацеленной составляющей, которая способна специфически распознавать и/или связываться с белком 4-1BB.

Анти-PD-L1 антитело.

Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело может содержать анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве PD-L1-нацеленной составляющей. Анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может проявлять эффективные активности связывания и ингибирования в отношении PD-L1 и может быть полезным для терапевтических и диагностических применений.

Белок PD-L1 представляет собой трансмембранный белок типа 1, массой 40 кДа. Белком PD-L1 может быть человеческий белок PD-L1, и человеческий белок PD-L1 может быть выбран без ограничения из группы, состоящей из белков, представленных в GenBank с номером доступа NP_001254635.1, NP_001300958.1, NP_054862.1 и т.д. Человеческий белок PD-L1 включает внеклеточную часть, включающую N-концевой домен иммуноглобулина V (IgV) (аминокислоты 19-127) и C-концевой домен иммуноглобулина C (IgC) (аминокислоты 133-225). В отличие от ранее существовавших анти-PD-L1 антител, которые связываются с доменом IgV в PD-L1, тем самым нарушая связывание между PD-1 и PD-L1, анти-PD-L1 антитело или его фрагмент, содержащиеся в биспецифическом антителе, не могут связываться с доменом иммуноглобулина V (IgV) белка PD-L1, но связываются с доменом IgC в PD-L1 с эффективным ингибированием PD-L1, тем самым улучшая терапевтические эффекты.

В частности, анти-PD-L1 антитело или его фрагмент, содержащиеся в биспецифическом антителе, могут специфически связываться с доменом иммуноглобулина C (IgC) белка PD-L1. В случае человеческого белка PD-L1, домен IgC содержит или состоит по существу из аминокислотных остатков 133-225 полной длины человеческого белка PD-L1. Более конкретно, анти-PD-L1 антитело или его фрагмент могут связываться с по меньшей мере одним остатком, выбранным из аминокислотных остатков Y134, K162 и N183 человеческого белка PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-L1 антитело или его фрагмент могут связываться с по меньшей мере двумя остатками, выбранными из ами-

нокислотных остатков Y134, K162 и N183 человеческого белка PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-L1 антитело или его фрагмент не способны связываться с доменом иммуноглобулина V (IgV) белка PD-L1, где домен IgV состоит из аминокислотных остатков 19-127 человеческого белка PD-L1.

Согласно варианту осуществления анти-PD-L1 антитело или его фрагмент способны проявлять специфичность в отношении человеческого белка PD-L1.

Анти-PD-L1 антитело или его фрагмент могут содержать

- (1) CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;
- (2) CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3;
- (3) CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 5, 262, 263, 264, 265, 266 и 267;
- (4) CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, 268 и 269;
- (5) CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и
- (6) CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 270, 271 и 272.

Таблица 2

CDR анти-PD-L1 антител

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR1 VH	<u>S</u> YDMS	1
CDR2 VH	TISD <u>A</u> GGYIYYSDSVKG	2
	TISD <u>A</u> GGYIYYRDSVKG	3
CDR3 VH	<u>E</u> FGKRYALDY	4
	<u>E</u> LPWRYALDY	5
	EFGKRYALDS	262
	<u>E</u> IFNRYALDY	263
	<u>E</u> LHFRYALDY	264
	<u>E</u> LYFRYALDY	265
	<u>E</u> LLHRYALDY	266
	<u>E</u> LRGRYALDY	267
CDR1 VL	KAS <u>Q</u> DVTPAVA	6
	KAK <u>Q</u> DVTPAVA	268
	KASQDV <u>W</u> PAVA	269
CDR2 VL	<u>S</u> TSSRYT	7
CDR3 VL	<u>Q</u> QHYYTPLT	8
	<u>M</u> QHYYTPLT	270
	QQH <u>S</u> TTPLT	271
	QQH <u>S</u> DAPLT	272

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его фрагмент включают не более одного, не более двух или не более трех из вышеуказанных замещений. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело или его фрагмент включают CDR1 VH последовательности SEQ ID NO: 1, CDR2 VH последовательности SEQ ID NO: 2 или 3, CDR3 VH последовательности SEQ ID NO: 4, 5, 262, 263, 264, 265, 266 или 267, CDR1 VL последовательности SEQ ID NO: 6, 268 или 269, CDR2 VL последовательности SEQ ID NO: 7 и CDR3 VL последовательности SEQ ID NO: 8, 270, 271 или 272.

Например, анти-PD-L1 антитело или его фрагмент могут содержать CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или 3, CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или 5, CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, 270, 271 или 272.

кислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

Обратные мутации могут быть полезными для сохранения определенных характеристик анти-PD-L1 антител. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-L1 антитела согласно настоящему изобретению, в частности человеческие или гуманизированные антитела, могут включать одну или более из обратных мутаций. Согласно некоторым вариантам осуществления обратная мутация (т.е. включенная аминокислота в специфическом положении) в вариательной области тяжелой цепи (VH) представляет собой одну или несколько, выбранные из (a) Ser в положении 44, (b) Ala в положении 49, (c) Ala в положении 53, (d) Ile в положении 91, (e) Glu в положении 1, (f) Val в положении 37, (g) Thr в положении 40, (h) Val в положении 53, (i) Glu в положении 54, (j) Asp в положении 77, (k) Arg в положении 94 и (l) Thr в положении 108 вариательной области тяжелой цепи, согласно нумерации по Кабату, и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам осуществления обратные мутации в VH выбраны из (a) Ser в положении 44, (b) Ala в положении 49, (c) Ala в положении 53 и/или (d) Ile в положении 91 вариательной области тяжелой цепи согласно нумерации по Кабату и их комбинаций.

Согласно некоторым вариантам осуществления обратная мутация в вариательной области легкой цепи (VL) представляет собой одну или несколько, выбранные из (a) Ser в положении 22, (b) Gln в положении 42, (c) Ser в положении 43, (d) Asp в положении 60 и (e) Thr в положении 63 вариательной области легкой цепи согласно нумерации по Кабату и их комбинаций.

Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-L1 антитело или его фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, константную область легкой цепи, область Fc или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления константная область легкой цепи может представлять собой константную область цепи каппа или лямбда. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело имеет изотип IgG, IgM, IgA, IgE или IgD, например человеческий IgG, человеческий IgM, человеческий IgA, человеческий IgE или человеческий IgD. Согласно некоторым вариантам осуществления изотипом может быть IgG, например, человеческий IgG, такой как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагментом (антигенсвязывающим фрагментом анти-PD-L1 антитела) может быть любой фрагмент, содержащий CDR тяжелой цепи и/или CDR легкой цепи антитела, и, например, он может быть выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd (содержащего вариательную область тяжелой цепи и домен CH1), Fv (вариательная область тяжелой цепи и/или вариательная область легкой цепи), одноцепочечного Fv (scFv, содержащего или по существу состоящего из вариательной области тяжелой цепи и вариательной области легкой цепи, в любом порядке, и пептидный линкер между вариательной областью тяжелой цепи и вариательной областью легкой цепи), одноцепочечных антител, дисульфид-связанных Fv (sdFv) и т.п.

Анти-PD-L1 антитело или его фрагмент представляет собой без ограничения химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело. Согласно одному аспекту антитело или его фрагмент имеют не природное происхождение или являются химически или рекомбинантно синтезированными.

Связывание антитела согласно настоящему изобретению с PD-L1 можно оценить с использованием одного или нескольких методов, хорошо известных в данной области техники. Например, согласно предпочтительному варианту осуществления антитело можно протестировать с помощью анализа проточной цитометрии, в котором антитело реагирует с клеточной линией, экспрессирующей человеческий PD-L1, такой как клетки CHO, которые были трансфицированы для экспрессии PD-L1, например, человеческого PD-L1 или обезьяньего PD-L1, например, макак-резус или яванских макак, или мышинного PD-L1, на их клеточной поверхности. Другие подходящие клетки для использования в анализах проточной цитометрии включают анти-CD3-стимулированные CD4⁺ активированные Т-клетки, которые экспрессируют нативный PD-L1. Другие подходящие анализы связывания включают анализы ELISA, например, с использованием рекомбинантного белка PD-L1. Дополнительно или альтернативно связывание антитела, включая кинетику связывания (например, значение KD), можно протестировать в анализе Biotac. Предпочтительные аффинности связывания антитела согласно настоящему изобретению включают аффинности с константой диссоциации или KD, равной $4,25 \times 10^{-9}$ М или менее.

Учитывая, что каждое из этих антител может связываться с PD-L1, таким как человеческий PD-L1, последовательности CDR или последовательности V_H и V_L могут быть "смешанными и совпадающими" с созданием других анти-PD-L1 связывающих молекул согласно настоящему изобретению. Предпочтительно последовательности CDR или цепи V_H и V_L являются смешанными или совпадающими, например, последовательность V_H из конкретной пары V_H/V_L замещается аналогичной по структуре последовательностью V_H. Аналогичным образом, предпочтительно последовательность V_L из конкретной пары V_H/V_L замещается аналогичной по структуре последовательностью V_L.

Анти-4-1BB антитело.

Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело может содержать анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве 4-1BB-нацеленной составляющей.

Согласно варианту осуществления анти-4-1BB антитело или его фрагмент может специфически связываться с белком 4-1BB (например, человеческий 4-1BB).

Например, человеческий белок 4-1BB может быть выбран без ограничения из группы, состоящей из белков, представленных в NCBI под номером доступа NP_001552 и т.д. Эти анти-4-1BB антитела или их антигенсвязывающие фрагменты способны усиливать иммунный ответ и/или лечить опухоль (рак) у млекопитающего. Анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуются локализацией и/или активацией только в микроокружении опухоли (ТМЕ) и/или значительно сниженной токсичностью для печени по сравнению с ранее существовавшими анти-4-1BB антителами, при сохранении эффективности усиления иммунного ответа и/или лечения опухоли.

Термин "4-1BB" относится к CD137 или TNFRSF9 (член 9 суперсемейства 25 TNF рецепторов), является членом суперсемейства TNF-рецепторов (TNFRSF) и является костимулирующей молекулой, которая экспрессируется после активации иммунных клеток, как клеток врожденной иммунной системы, так и клеток адаптивной иммунной системы. В контексте настоящего изобретения 4-1BB может происходить из млекопитающих, например, *Homo sapiens* (человека) (номер доступа NCBI NP_001552). Например, человеческий белок 4-1BB (NP_001552) может быть представлен аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 9), как показано ниже:

```
1  mgnsycyniva tllvlncfr trslqdpesn cpagtfcdnn nqicspcpp nsfssaggqr
61 tedicrqckg vfrtrkecss tsnaecdtp ghfclgagcs mceqdcckqgq eltkkgckdc
121 cftgfdnqkr gicrpwtncs ldgksvlvng tkerdvvcgp spadlspgas svtpapare
181 pghspqiisf flaltstall flflfldr svvkrgrkkl lyifkqpfmr pvqtqeedg
241 cscrfeeee ggcel
```

Как описано в настоящем документе, термин "4-1BB" включает варианты, изоформы, гомологи, ортологи и паралоги. Например, антитела, специфические для белка человеческого 4-1BB, могут в некоторых случаях перекрестно реагировать с белком 4-1BB других видов, отличных от человека. Согласно другим вариантам осуществления антитела, специфические для человеческого белка 4-1BB, могут быть полностью специфическими для человеческого белка 4-1BB и могут проявлять видовые или другие типы перекрестной реактивности или могут перекрестно реагировать с 4-1BB других определенных видов, но не всех других видов (например, перекрестная реакция с обезьяньим 4-1BB, но не с мышинным 4-1BB). Термин "человеческий 4-1BB" относится к человеческой последовательности 4-1BB, такой как полная аминокислотная последовательность человеческого 4-1BB, имеющая регистрационный номер NCBI NP_001552. Термин "мышинный 4-1BB" относится к мышинной последовательности 4-1BB, такой как полная аминокислотная последовательность мышинного 4-1BB, имеющая регистрационный номер NCBI NP_033430.1. 4-1BB также может быть известным в данной области техники, например, CD137. Последовательность человеческого 4-1BB согласно настоящему раскрытию может отличаться от последовательности человеческого 4-1BB с регистрационным номером NCBI NP_001552, например, наличием консервативных мутаций или мутаций в неконсервативных областях, и 4-1BB согласно настоящему раскрытию имеет по существу такую же биологическую функцию, что и человеческий 4-1BB с регистрационным номером NCBI NP_001552.

Как показано в экспериментальных примерах, анти-4-1BB антитела, раскрытые в настоящем документе, показывают способности связываться с 4-1BB, способности связываться с 4-1BB, который экспрессируется на клеточной поверхности, и высокие аффинности связывания с 4-1BB. Кроме того, как продемонстрировано в экспериментальном примере, анти-4-1BB антитело, раскрытое в настоящем документе, особенно в комбинации с анти-PD-L1 антителом, раскрытым в настоящем документе, способно активировать Т-клетки. Кроме того, как показано в экспериментальном примере, анти-4-1BB антитело, раскрытое в настоящем документе, имеет усиленный противоопухолевый эффект *in vivo*.

Эти анти-4-1BB антитела могут быть полезными для терапевтических целей, таких как лечение различных типов рака и т.д., а также могут быть полезны для диагностических и прогностических целей.

Согласно варианту осуществления анти-4-1BB антитело или его фрагмент способны к специфичности в отношении человеческого белка 4-1BB. Анти-4-1BB антитело или его фрагмент могут содержать

- (i) CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10 и 11;
- (ii) CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 13;
- (iii) CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 15, 16 и 17;
- (iv) CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;
- (v) CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; и
- (vi) CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

Например, анти-4-1BB антитело или его фрагмент могут содержать CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или 11, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или 13, CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, 15, 16 или 17, CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDR2 VL,

имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

Таблица 3

CDR анти-4-1BB антител		
Название	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR1 VH	SYDMS	10
	GYDMS	11
CDR2 VH	WISYSGGSIYYADSVKG	12
	VIYPDDGNTYYADSVKG	13
CDR3 VH	DGQRNSMREFDY	14
	HGGQKPTTKSSSAYGMDG	15
	DAQRNSMREFDY	16
	DAQRQSMREFDY	17
CDR1 VL	SGSSSNIGNNYVT	18
CDR2 VL	ADSHRPS	19
CDR3 VL	ATWDYSLSGYV	20

В неограничивающих примерах анти-4-1BB антитела или его фрагмента, (1) варибельная область тяжелой цепи может содержать или по существу состоять из полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22, 23 и 24, или полипептида, имеющего идентичность последовательности по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% с вышеописанными аминокислотными последовательностями, и/или (2) варибельная область легкой цепи может содержать или по существу состоять из полипептида, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25 и 26, или полипептида, имеющего идентичность последовательности по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% с вышеописанными аминокислотными последовательностями.

Неограничивающие примеры анти-4-1BB антитела или его фрагмента могут содержать варибельную область тяжелой цепи, содержащую или по существу состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 21, 22, 23 или 24.

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYS
GGSIYYADSVKGRTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYW
GQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 21)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVIYPD
DGNTYYADSVKGRTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAY
GMDGWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 22)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYS
GGSIYYADSVKGRTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAGRNSMREFDYW
GQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 23)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYS
GGSIYYADSVKGRTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAGRQSMREFDYW
GQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 24)

Неограничивающие примеры анти-4-1BB антитела или его фрагмента могут содержать варибельную область легкой цепи, содержащую или по существу состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 25 или 26.

QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID
NO: 25)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRP
SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID
NO: 26)

Антитела согласно настоящему изобретению характеризуются конкретными функциональными признаками или свойствами антител. Например, антитела специфически связываются с человеческим 4-1BB и могут связываться с 4-1BB некоторых других видов, например, обезьяньим 4-1BB, например, яванских макак, макак-резус, но могут по существу не связываться с 4-1BB некоторых других видов, например, мышинным 4-1BB. Предпочтительно антитело согласно настоящему изобретению связывается с человеческим 4-1BB с высокой аффинностью.

Кроме того, антитело согласно настоящему изобретению, в частности, как биспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 антитело, согласно настоящему изобретению, обладает способностью усиливать пролиферацию иммунных клеток, выживаемость, секрецию цитокинов и цитолитическую активность Т-клеток CD8. Согласно определенным вариантам осуществления антитело согласно настоящему изобретению, в частности, как биспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 антитело, согласно настоящему изобретению, связывается с человеческим 4-1BB и проявляет способность активировать Т-клетки.

Другие средства оценки способности антитела стимулировать иммунный ответ включают способность антитела ингибировать рост опухоли, например, на модели с трансплантатом опухоли *in vivo*.

Связывание антитела согласно настоящему изобретению с 4-1BB можно оценить с использованием одного или нескольких методов, хорошо известных в данной области техники. Например, согласно предпочтительному варианту осуществления антитело можно протестировать с помощью анализа проточной цитометрии, в котором антитело реагирует с клеточной линией, экспрессирующей человеческий 4-1BB, такой как клетки СНО, которые были трансфицированы для экспрессии 4-1BB, например, человеческого 4-1BB или обезьяньего 4-1BB, например макак-резус или яванских макак, или мышинного 4-1BB, на их клеточной поверхности. Другие подходящие клетки для использования в анализах проточной цитометрии включают анти-CD3-стимулированные CD4⁺ активированные Т-клетки, которые экспрессируют нативный 4-1BB. Другие подходящие анализы связывания включают анализы ELISA, например, с использованием рекомбинантного белка 4-1BB.

Дополнительно или альтернативно связывание антитела, включая кинетику связывания (например, значение KD), можно протестировать в анализе Octet. Предпочтительные аффинности связывания антитела согласно настоящему изобретению включают аффинности с константой диссоциации или KD, равной $1,80 \times 10^{-9}$ М или менее.

Согласно некоторым вариантам осуществления anti-4-1BB антитело или его фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, константную область легкой цепи, область Fc или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления константная область легкой цепи может представлять собой константную область цепи каппа или лямбда. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело имеет изотип IgG, IgM, IgA, IgE или IgD, например человеческий IgG, человеческий IgM, человеческий IgA, человеческий IgE или человеческий IgD. Согласно некоторым вариантам осуществления изотипом может быть IgG, например человеческий IgG, такой как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Согласно некоторым вариантам осуществления фрагментом (антигенсвязывающим фрагментом анти-PD-L1 антитела) может быть любой фрагмент, содержащий CDR тяжелой цепи и/или CDR легкой цепи антитела, и, например, он может быть выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd (содержащего переменную область тяжелой цепи и домен CH1), Fv (переменная область тяжелой цепи и/или переменная область легкой цепи), одноцепочечного Fv (scFv, содержащего или по существу состоящего из переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи, в любом порядке, и пептидный линкер между переменной областью тяжелой цепи и переменной областью легкой цепи), одноцепочечных антител, дисульфид-связанных Fv (sdFv) и т.п.

Анти-4-1BB антитело или его фрагмент без ограничения представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело. Согласно одному аспекту антитело или его фрагмент имеют не природное происхождение или являются химически или рекомбинантно синтезированными.

Учитывая, что каждое из этих антител может связываться с 4-1BB, таким как человеческий 4-1BB, последовательности CDR или последовательности V_H и V_L могут быть "смешанными и совпадающими" с созданием других анти-4-1BB связывающих молекул согласно настоящему изобретению. Предпочтительно последовательности CDR или цепи V_H и V_L являются смешанными или совпадающими, например, последовательность V_H из конкретной пары V_H/V_L замещается аналогичной по структуре последовательностью V_H. Аналогичным образом, предпочтительно последовательность V_L из конкретной пары

V_H/V_L замещается аналогичной по структуре последовательностью V_L .

Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело.

В биспецифическом антителе, содержащем PD-L1-нацеленную составляющую и 4-1BB-нацеленную составляющую, одна из PD-L1-нацеленной составляющей и 4-1BB-нацеленной составляющей может быть антителом полной длины, а другая может быть антигенсвязывающим фрагментом (например, scFv), содержащим CDR тяжелой цепи, CDR легкой цепи или их комбинацию. Антитело полной длины, нацеленное на один из белков PD-L1 и 4-1BB, и антигенсвязывающий фрагмент, нацеленный на другой белок, могут быть химически связаны (например, ковалентно связаны) напрямую или через пептидный линкер. Антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) может быть связан напрямую или через пептидный линкер с N-концом антитела полной длины (например, N-концом легкой цепи или тяжелой цепи антитела полной длины), C-концом антитела полной длины (например, C-концом тяжелой цепи (или Fc или домен CH3) антитела полной длины) или и тем, и другим (см. фиг. 1A и 1B).

Согласно варианту осуществления биспецифическое антитело может содержать анти-PD-L1 антитело полной длины, антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) анти-4-1BB антитела и пептидный линкер между ними. Согласно другому варианту осуществления биспецифическое антитело может содержать анти-4-1BB антитело полной длины, антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) анти-PD-L1 антитела и пептидный линкер между ними.

Согласно варианту осуществления scFv, содержащийся в биспецифическом антителе, может содержать вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи в любом порядке. Например, scFv, содержащийся в биспецифическом антителе, может содержать вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи в направлении от N-конца к C-концу и необязательно пептидный линкер между ними или альтернативно scFv, содержащийся в биспецифическом антителе, может содержать вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи в направлении от N-конца к C-концу и необязательно пептидный линкер между ними.

Согласно варианту осуществления анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело активирует передачу сигналов 4-1BB и, в результате, иммунный ответ, в зависимости от PD-L1, экспрессируемого на клеточных поверхностях.

Применение пептидного линкера для биспецифического антитела может привести к высокой чистоте антитела.

В контексте настоящего изобретения термин "пептидный линкер" может включать любые аминокислоты от 1 до 100, в частности от 2 до 50, и любые виды аминокислот могут быть включены без каких-либо ограничений. Пептидный линкер может включать, например, остатки Gly, Asn и/или Ser, а также включать нейтральные аминокислоты, такие как Thr и/или Ala. Аминокислотные последовательности, подходящие для пептидного линкера, могут быть известными в соответствующей области. Между тем, длина пептидного линкера может быть определена различно внутри такого предела, при котором функции слитого белка не будут затронуты. Например, пептидный линкер может быть образован включением в общем от приблизительно 1 до приблизительно 100, от приблизительно 2 до приблизительно 50 или от приблизительно 5 до приблизительно 25 из одной или нескольких аминокислот, выбранных из группы, состоящей из Gly, Asn, Ser, Thr и Ala. Согласно одному варианту осуществления пептидный линкер может быть представлен как $(GmS1)_n$ (m, 1 и n независимо представляют собой целое число от приблизительно 1 до приблизительно 10, в частности целое число от приблизительно 2 до приблизительно 5). Например, примеры пептидных линкеров обобщены следующим образом:

Функция линкера	Примеры			
	Слитый белок	Линкер		ссылк.
		Тип	Последовательность [#]	
Увеличение стабильности/складчатости	scFv	гибкий	(GGGGS) ₃	[46]
	G-CSF-Tf	гибкий	(GGGGS) ₃	[20]
	HBsAg preS1	гибкий	(GGGGS) ₃	[85]
	Myc-Est2p	гибкий	(Gly) ₈	[30]
	альбумин-ANF	гибкий	(Gly) ₆	[31]
	белок оболочки вируса	жесткий	(EAAAK) ₃	[50]
Повышение экспрессии	бета глюканаза ксиланаза	жесткий	(EAAAK) _n (n=1-3)	[52]
	hGH-Tf и Tf-hGH	жесткий	A(EAAAK) ₄ ALEA(EAAAK) ₄ A	[18]
Улучшение биологической активности	G-CSF-Tf и Tf-G-CSF	жесткий	A(EAAAK) ₄ ALEA(EAAAK) ₄ A	[18]
	G-CSF-Tf	гибкий	(GGGGS) ₃	[20]
	G-CSF-Tf	жесткий	A(EAAAK) ₄ ALEA(EAAAK) ₄ A	[20]
	hGH-Tf	жесткий	A(EAAAK) ₄ ALEA(EAAAK) ₄ A	[40]
	HSA-IFN-α2b	гибкий	GGGGS	[17]
	HSA-IFN-α2b	жесткий	PAPAP	[17]
	HSA-IFN-α2b	жесткий	AEAAAKEAAAKA	[17]
	PGA-rTHS	гибкий	(GGGGS) _n (n=1, 2, 4)	[55]
	интерферон-γp120	жесткий	(Ala-Pro) _n (10 – 34 aa)	[54]
	GSF-S-S-Tf	расщепляемый	дисульфидная	[39]
Придание нацеливания	IFN-α2b-HSA	расщепляемый	дисульфидная	[42]
	FLX-альбумин	расщепляемый	VSQTSKLTR AETVFPDV ^b	[59]
	LAP-IFN-	расщепляемый	PLG LWA ^c	[64]
	MazE-MazF	расщепляемый	RVL AEA; EDVVCC SMSY; GGIEGR GS ^c	[68]
	Иммунотоксины	расщепляемый	TRHRQPR GWE; AGNRVRR SVG; RRRRRRR R R ^d	[72]
Изменение PK	Иммунотоксин	расщепляемый	GFLG ^e	[77]
	G-CSF-Tf и hGH-Tf	жесткий	A(EAAAK) ₄ ALEA(EAAAK) ₄ A	[79]
		расщепляемый	дисульфидная	

Согласно другому варианту осуществления как PD-L1-нацеленная составляющая, так и 4-1BB-нацеленная составляющая могут представлять собой антитело полной длины или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR тяжелой цепи, CDR легкой цепи или их комбинацию.

Согласно другому варианту осуществления биспецифическое антитело может быть в гетеродимерной форме, которая содержит первое плечо, включающее пару из первой тяжелой цепи и первой легкой цепи, нацеленных на один из PD-L1 и 4-1BB, и второе плечо, включающее пару второй тяжелой цепи и второй легкой цепи, нацеленных на другую.

Согласно варианту осуществления антитело полной длины может быть в форме иммуноглобулина полной длины (например, IgG, IgM, IgA, IgE или IgD, как например, человеческий IgG, человеческий IgM, человеческий IgA, человеческий IgE или человеческий IgD), и антигенсвязывающий фрагмент может быть выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv, одноцепочечных антител, sdFv и т.п., как описано выше. Например, антитело полной длины может быть в форме человеческого IgG полной длины (человеческий IgG1, человеческий IgG2, человеческий IgG3 или человеческий IgG4), а антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой scFv.

Например, антитело, описанное в настоящем документе, может содержать гибкую линкерную последовательность или может быть модифицировано с добавлением функциональной составляющей (например, ПЭГ, лекарственное средство, токсин или метка).

Антитела или варианты, описанные в настоящем документе, могут содержать производные, которые модифицированы, например, ковалентным присоединением любого типа молекулы к антителу, так что ковалентное присоединение не препятствует связыванию антитела с антигеном (например, эпитопом). Например, без ограничения антитела можно модифицировать, например, по меньшей мере одним, выбранным из группы, состоящей из гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилиро-

вания, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, связи с клеточным лигандом или другим белком и т.п. Любая из многочисленных химических модификаций может быть проведена известными способами, включая без ограничения специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д. Кроме того, антитела могут содержать одну или несколько неклассических аминокислот.

Антитела или их фрагменты могут быть помечены детектируемой меткой посредством введения метки (связывания) с обычным вносящими метку веществами, выбранным из хемилюминесцентных соединений, флуоресцентных соединений (например, металлов, излучающих флуоресценцию), радиоизотопов, красителей и т.д. Присутствие меченных антител или их фрагментов может быть обнаружено путем измерения сигнала, возникающего в ходе химической реакции между антителом (или его фрагментом) и вносящим метку веществом. Примерами особенно подходящего вносящего метку вещества могут быть по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из люминола, изолюминола, тероматического сложного эфира акридиния, имидазола, соли акридиния, сложного эфира оксалата, металлов, излучающих флуоресценцию, и т.п. Например, излучающие флуоресценцию металлы могут представлять собой ^{152}Eu или другие из ряда лантаноидов. Эти металлы могут быть присоединены к антителу с использованием таких хелатирующих групп металлов, как диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТРА) или этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA).

Согласно определенным вариантам осуществления полученные биспецифические антитела не будут вызывать вредный иммунный ответ у животного, которое подлежит лечению, например, у человека. Согласно одному варианту осуществления биспецифическое антитело можно модифицировать для снижения его иммуногенности с использованием любых обычных методик. Например, биспецифическое антитело может быть гуманизированным, приматизированным, деиммунизированным или химерным антителом. Эти типы антител происходят из нечеловеческого антитела, как правило, из мышинового антитела или антитела приматов, которое сохраняет или в значительной степени сохраняет антигенсвязывающие свойства родительского антитела, но которое менее иммуногенно для человека. Это может быть достигнуто различными способами, включая

(a) трансплантацию целых нечеловеческих переменных доменов на человеческие константные области с образованием химерных антител;

(b) прививание по меньшей мере части одной или нескольких нечеловеческих определяющих комплементарность областей (CDR) в человеческий каркас и константные области с сохранением или без сохранения критических остатков каркаса; или

(c) трансплантацию целых нечеловеческих переменных доменов, но "маскировку" их участком, подобным человеческому, путем замены поверхностных остатков.

Деиммунизацию также можно использовать для снижения иммуногенности антитела. В контексте настоящего изобретения термин "деиммунизация" может включать изменение антитела с модификацией Т-клеточных эпитопов (см., например, публикации международных заявок № WO/9852976 A1 и WO/0034317 A2). Например, анализируют переменные последовательности тяжелой цепи и переменные последовательности легкой цепи исходного антитела и создают "карту" Т-клеточных эпитопов человека из каждой V (переменной) области, показывающую расположение эпитопов по отношению к определяющим комплементарность областям (CDR) и другим ключевым остаткам в последовательности. Индивидуальные Т-клеточные эпитопы из карты Т-клеточных эпитопов анализируют для того, чтобы идентифицировать альтернативные аминокислотные замены с низким риском изменения активности конечного антитела. Разрабатывают ряд альтернативных переменных последовательностей тяжелой цепи и переменных последовательностей легкой цепи, включающих комбинации аминокислотных замен, и эти последовательности затем включают в ряд связывающих полипептидов. Как правило, создают от 12 до 24 вариантов антител и тестируют на связывание и/или функцию. Полные гены тяжелой и легкой цепей, содержащие модифицированные переменные и человеческие константные области, затем клонируют в экспрессионные векторы, а последующие плазмиды вводят в клеточные линии с получением полного антитела. Затем антитела сравнивают в соответствующих биохимических и биологических анализах, и определяют оптимальный вариант.

Специфичность и/или аффинность связывания биспецифического антитела к каждому белку-мишени можно определить с помощью любого обычного анализа, например, без ограничения анализов *in vitro*, таких как иммунопреципитация, радиоиммуноанализ (RIA) или ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA).

В качестве альтернативы способы, описанные для получения одноцепочечных единиц (патент США № 4694778 и т.д.), могут быть адаптированы для получения одноцепочечных единиц согласно настоящему изобретению. Одноцепочечные единицы образуются путем связывания фрагментов тяжелой и легкой цепей области Fv через аминокислотный мостик (пептидный линкер), в результате чего получают одноцепочечный слитый пептид (scFv). Также можно использовать способы сборки функциональных фрагментов Fv в *E. coli*.

Примеры методик, которые можно использовать для получения одноцепочечных Fv (scFv) и анти-

тел, включают методики, описанные в патентах США № 4946778, 5258498 и т.д.). Для некоторых применений, включая использование антител *in vivo* у людей и анализы обнаружения *in vitro*, может быть предпочтительным использование химерных, гуманизированных или человеческих антител. Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части антитела происходят из разных видов животных, такие как антитела, имеющие вариабельную область, полученную из мышинового моноклонального антитела, и константную область иммуноглобулина человека. Способы получения химерных антител известны в данной области техники. См., например, патент США № 5807715, 4816567 и 4816397, которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител, происходящие из антител видов, не относящихся к человеку, которые связывают желаемый антиген, имеющие одну или несколько определяющих комплементарность областей (CDR) из видов, не относящихся к человеку, и каркасные области из молекулы иммуноглобулина человека. Часто каркасные остатки в каркасных областях человека заменяют соответствующим остатком из CDR-донорного антитела для изменения, предпочтительно улучшения, связывания антигена. Эти замены каркаса идентифицируются способами, хорошо известными в данной области техники, например, путем моделирования взаимодействий CDR и остатков каркаса для идентификации остатков каркаса, важных для связывания антигена, и сравнения последовательностей для идентификации необычных остатков каркаса в определенных положениях (см., например, Queen et al., патент США № 5585089, которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте). Антитела можно гуманизировать, используя различные способы, известные в данной области техники, включая, например, прививание CDR (патенты США № 5225539, 5530101, 5585089 и т.д., каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте), маскировку поверхностных остатков или перекладку (EP 592106; EP 519596, каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте) и перестановку цепей (патент США № 5565332, который включен посредством ссылки во всей своей полноте).

Полностью человеческие антитела особенно предпочтительны для терапевтического лечения пациентов-людей. Человеческие антитела можно получить множеством способов, известных в данной области техники, включая способы фагового дисплея с использованием библиотек антител, происходящих из последовательностей иммуноглобулинов человека. См. также патенты США № 4444887, 4716111 и т.д., каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Человеческие антитела также могут быть получены с использованием трансгенных мышей, которые неспособны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать гены иммуноглобулина человека. Например, комплексы генов иммуноглобулина тяжелой и легкой цепей человека можно вводить случайным образом или путем гомологичной рекомбинации в мышинные эмбриональные стволовые клетки. Альтернативно человеческая вариабельная область, константная область и область разнообразия могут быть введены в мышинные эмбриональные стволовые клетки в дополнение к генам тяжелой и легкой цепей человека.

Мышинные гены иммуноглобулина тяжелой и легкой цепи могут быть сделаны нефункциональными отдельно или одновременно с введением локусов иммуноглобулина человека путем гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция области JH предотвращает продукцию эндогенных антител. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножают и вводят посредством микроинъекции в бластоцисты с получением химерных мышей. Затем химерных мышей разводят с получением гомозиготного потомства, экспрессирующего человеческие антитела. Трансгенных мышей иммунизируют обычным образом выбранным антигеном, например, всем или частью желаемого полипептида-мишени. Моноклональные антитела, направленные против антигена, можно получить от иммунизированных трансгенных мышей с использованием общепринятой гибридомной технологии. Трансгены человеческого иммуноглобулина, которые несут трансгенные мыши, перестраиваются в ходе дифференцировки В-клеток, а затем подвергаются переключению классов и соматической мутации. Таким образом, используя такой способ, можно получить терапевтически полезные антитела IgG, IgA, IgM и IgE.

Полностью человеческие антитела, которые распознают выбранный эпитоп, также могут быть получены с использованием способа, называемого "управляемый отбор". В этом подходе выбранное моноклональное антитело нечеловеческого происхождения, например, мышинное антитело, используются для направления выбора полностью человеческого антитела, распознающего тот же эпитоп.

Согласно другому варианту осуществления ДНК, кодирующая желаемые моноклональные антитела, может быть легко выделена и секвенирована с использованием обычных методик (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи мышинных антител). Выделенные и субклонированные клетки гибридомы служат предпочтительным источником такой ДНК. После выделения ДНК может быть помещена в экспрессионные векторы, которые затем трансфицируют в прокариотические или эукариотические клетки-хозяева, такие как клетки *E.coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые в противном случае не продуцируют иммуноглобулины. Более конкретно, выделенная ДНК (которая может быть синтетической, как описано в настоящем документе) может быть использована для клонирования последовательностей константной и вариабельной области с получением

антител, как описано в Newman et al., патент США № 5658570, который включен в настоящий документ посредством ссылки. По существу, это приводит к экстракции РНК из выбранных клеток, превращению в кДНК и амплификации посредством ПЦР с использованием праймеров, специфичных для Ig. Подходящие для этой цели праймеры также описаны в патенте США № 5658570. Как будет более подробно описано ниже, трансформированные клетки, экспрессирующие желаемое антитело, можно выращивать в относительно больших количествах для обеспечения клинических и коммерческих поставок иммуноглобулина.

Кроме того, посредством применения обычных методик рекомбинантной ДНК, одна или несколько CDR биспецифического антитела могут быть вставлены в каркасные области, например, в каркасные области человека для того, чтобы гуманизировать нечеловеческое антитело. Каркасные области могут быть природного происхождения или консенсусными каркасными областями и предпочтительно человеческими каркасными областями (см., например, Chothia et al., J. Mol. Biol., 278:457-479 (1998) в отношении перечня человеческих каркасных областей). Например, полинуклеотид, создаваемый комбинацией каркасных областей и CDR, кодирует антитело, которое специфически связывается по меньшей мере с одним эпитопом желаемого полипептида, например, LIGHT. Предпочтительно одна или несколько аминокислотных замен могут быть сделаны в каркасных областях, и предпочтительно аминокислотные замены улучшают связывание антитела с его антигеном (или эпитопом). Кроме того, такие способы можно использовать для аминокислотных замен или делеций одного или нескольких остатков цистеина вариационной области, участвующих во внутрицепочечной дисульфидной связи, для создания молекул антител, лишенных одной или нескольких внутрицепочечных дисульфидных связей. Другие изменения полинуклеотида охватываются настоящим раскрытием и находятся в рамках компетенции специалиста в данной области техники.

Кроме того, можно использовать методики, разработанные для получения "химерных антител" путем сплайсинга генов из молекулы мышиного антитела с соответствующей антигенной специфичностью, вместе с генами из молекулы человеческого антитела с соответствующей биологической активностью. В контексте настоящего изобретения химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части происходят из разных видов животных, например, имеющую вариационную область, полученную из мышиного моноклонального антитела, и константную область человеческого иммуноглобулина.

Альтернативно клеточные линии, продуцирующие антитела, могут быть отобраны и культивированы с использованием методик, хорошо известных специалисту в данной области техники. Такие методики описаны в различных лабораторных руководствах и первичных публикациях.

Кроме того, стандартные методики, известные специалистам в данной области техники, могут быть использованы для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело согласно настоящему изобретению, включая без ограничения сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, которые приводят к аминокислотным заменам. Предпочтительно варианты (включая производные) кодируют менее 50 аминокислотных замен, менее 40 аминокислотных замен, менее 30 аминокислотных замен, менее 25 аминокислотных замен, менее 20 аминокислотных замен, менее 15 аминокислотных замен, менее 10 аминокислотных замен, менее 5 аминокислотных замен, менее 4 аминокислотных замен, менее 3 аминокислотных замен или менее 2 аминокислотных замен относительно эталонной вариационной области тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, вариационной области легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3. Альтернативно мутации могут быть введены случайным образом вдоль всей или части кодирующей последовательности, например, с помощью насыщающего мутагенеза, и полученные мутанты могут быть подвергнуты скринингу на биологическую активность для выявления мутантов, которые сохраняют активность.

Неограничивающие примеры анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифического антитела приведены в табл. 4 ниже.

В контексте настоящего изобретения "тяжелый компонент" означает компонент анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифического антитела согласно настоящему изобретению, который содержит (1) тяжелую цепь анти-PD-L1 антитела и (2) тяжелую цепь и легкую цепь анти-4-1BB антитела.

В контексте настоящего изобретения "легкий компонент" означает компонент анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифического антитела согласно настоящему изобретению, который содержит легкую цепь анти-PD-L1 антитела.

Таблица 4

Примеры анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифического антитела

ABLPNB.01	Тяжелый компонент	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDM SWVRQAPGKSLLEWVA TISDAGGYIYSDSVKGR FTISRDNANKSLYLQMNSLRDEDTAVYICARE FG KRYALDY WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTEPVTCTVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVS	SEQ ID NO: 27
		VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSSQSVLTQPPSASG TPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPK LLIY ADSHRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSE DEADYY CATWDYSLSGYV FGCGTKLTVLGGGGS GGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYDM SWVRQAPGKCLEWVSWI SYSGGSIYYADSVKGR FTISRDNANKSLYLQMNS LRAEDTAVYYCARD GQRNSMREFDY WGQGTLV TVSS	
	Легкий компонент	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KASQDVT PAVA WYQQKPGKAPKLLIY STSSRYT GVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIAITYYC QQHYTTPLT FGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFI YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	SEQ ID NO: 28
ABLPNB.02	Тяжелый компонент	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDM SWVRQAPGKSLLEWVA TISDAGGYIYSDSVKGR FTISRDNANKSLYLQMNSLRDEDTAVYICARE FG KRYALDY WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTEPVTCTVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSSQSVLTQPPSASG TPGQRTVITCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPK	SEQ ID NO: 29

		LLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGS GGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWI SYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCARD AQRNSMREFDYWGQGT LVTVSS	
	Легкий компонент	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVT PAVAWYQQKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSR FSGSGGSDFTFTISSLQPEDATYYCQQH YTTPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEHKVVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	SEQ ID NO: 30
ABLPNB.03	Тяжелый компонент	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDM SWVRQAPGKSLLEWVATISDAGGYIYSDSVKGR FTISRDN AKNSLYLQMNLRDEDTAVYICAREFG KRYALDYWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKS LSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASG TPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPK LLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSE DEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGS GGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVSVI YPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN	SEQ ID NO: 31

		SLRAEDAAVYYCAK HGGQKPTTKSS SAYGMDG WGQGLVTVSS	
	Легкий компонент	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKAS QDVTPAVA WYQQKPGKAPKLLIY STSSRYT GVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIATYYC QQHYTTPL TFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	SEQ ID NO: 32
ABLPNB.04	Тяжелый компонент	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YDM SWVRQAPGKSLLEWVATIS DAGGYIYYRDSVKGR FTISRDNANKSLYLQMNSLRDEDTAVYICARE LP WRYALDY WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPYDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSQSVLTQPPSAS GTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAP KLLIY ADSHRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAT WDYSLSGYV FGCGTKLTVLGGG GSGGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGLLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVS WISYSGSIYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARD GQRNSMREFDY WGQGT LTVSS	SEQ ID NO: 33

	Легкий компонент	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCKASQDVTPAVA WYQQKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSTRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIATYYCQQHYYTTPLTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	SEQ ID NO: 34
ABLPNB.05	Тяжелый компонент	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDM SWVRQAPGKSLLEWVATISDAGGYIYRDSVKGR FTISRDNANKSLYLQMNSLRDEDTAVYICARELP WRYALDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSSQSVLTQPPSAS GTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAP KLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGLLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVS WISYSGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDARNSMREFDYWGQGT LVTVSS	SEQ ID NO: 35
	Легкий компонент	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCKASQDVTPAVA WYQQKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSTRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIATYYCQQHYYTTPLTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST	SEQ ID NO: 36

		YLSSTLTLSKADYEHKVVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	
ABLPNB.06	Тяжелый компонент	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDM SWVRQAPGKSLWVATISDAGGYIYYRDSVKGR FTISRDNANKSLYLQMNSLRDEDTAVYICARELP WRYALDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSSQSVLTQPPSAS GTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAP KLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESAGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVS WISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDARQSMREFDYWGQGT LTVVSS	SEQ ID NO: 37
	Легкий компонент	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVT WYQQKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSTRFSGSGG TDFTFTISSLQPEDIAITYYCQQHYTPTLTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEHKVVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	SEQ ID NO: 38

ABLPNB.07	Тяжелый компонент	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDM SWVRQAPGKSLEWVA TISDAGGYIYRDSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICARELP WRYALDY WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGKGGGSGGGSGGGGSQSVLTQPPSAS GTPGQRTVISC SGSSNIGNNYVT WYQQLPGTAP KLLIY ADSHRPS GVPDFRSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAT WDYSLSGYV FGCGTKLTVLGGG GSGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYDM SWVRQAPGKCLEWVS WISYSGSIYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARD AQRNSMREFDY WGQGT LVTVSS	SEQ ID NO: 39
	Легкий компонент	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQDVT PAVA WYQQKPGKAPKLLIY STSSRYT GVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIAITYYC QQHYTTP LTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	SEQ ID NO: 40

ABLPNB.08	Тяжелый компонент	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDM SWVRQAPGKSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICARELP WRYALDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGKGGGSGGGSGGGGQSVLTQPPSAS GTPGQRTVISCSSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAP KLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGG GSGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGLLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVS WISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDARQSMREFDYWGQGT LTVSS	SEQ ID NO: 41
	Легкий компонент	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVT WYQQKPGKAPKLLIYSTSRYTGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIAITYYCQHHYTTPLTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	SEQ ID NO: 42

ABLPNB.09	Тяжелый компонент	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDM SWVRQAPGKSLLEWVA ATISDAGGYIYYRDSVKGR FTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICARELP WRYALDY WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSLTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGKGGGSGGGSGGGGQSVLTQPPSAS GTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAP KLLIY ADSHRPS GVDRFSGSKSGTSASLAISGLRS EDEADYYCAT WDYSLSGYV FGCGTKLTVLGGG GGGGGGGGGGGGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGKCLEWVS VIYPDDGNTYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDAAVYYCAKHGGG QKPTTKSSSAYGM DGWGQGT LVTVSS	SEQ ID NO: 43
	Легкий компонент	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KASQD VT PAVA WYQQKPGKAPKLLIY STSSRYT GVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIAITYYC QQHYT PLT FTGQ GTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSLSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	SEQ ID NO: 44

Терапевтическое применение биспецифического антитела.

Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению способно одновременно блокировать активности PD-L1 и 4-1BB, тем самым проявляя улучшенные эффекты при иммунотерапии и/или лечении рака, например, путем активации иммунного ответа (см. фиг. 2). Учитывая способность биспецифического антитела согласно настоящему изобретению ингибировать связывание PD-L1 с молекулами PD-1 и стимулировать антиген-специфические Т-клеточные ответы, настоящее изобретение также относится к композиции или *in vitro* и *in vivo* способам применения антител согласно настоящему изобретению, усиления или повышающего регулирования антиген-специфических Т-клеточных ответов.

Согласно варианту осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей биспецифическое антитело, как описано выше. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция может применяться для стимуляции иммунного ответа (например, антиген-специфического Т-клеточного ответа) и/или лечения и/или профилактики заболевания, связанного с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу стимуляции иммунного ответа (например, антиген-специфического Т-клеточного ответа) и/или лечения и/или профилактики заболевания, связанного с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим, у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающему введение субъекту фармацевтического эффективного количества биспецифического антитела или фармацевтической композиции. Способ может дополнительно предусматривать идентификацию субъекта, нуждающегося в лечении и/или профилактике заболевания, связанного с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим, перед стадией введения.

Заболевание, связанное с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим, может быть выбрано из рака (или опухолей), инфекционных заболеваний, аутоиммунных реакций, нарушений нервной системы и т.п.

Согласно варианту осуществления субъект может быть выбран из млекопитающих, включая людей, например, млекопитающего (например, человека), имеющего раковые клетки млекопитающих. Согласно другому варианту осуществления субъект может представлять собой клетку, отделенную (выделенную) от млекопитающего, например, млекопитающего, страдающего заболеванием, выбранным из

раковых, инфекционных заболеваний, аутоиммунных реакций, нарушений нервной системы и т.п. (например, раковая клетка или клетка, отделенная (выделенная) от инфекционной области у млекопитающего, или Т-клетка, такая как инфильтрирующий опухоль Т-лимфоцит, Т-клетка CD4+, Т-клетка CD8+ или их комбинация).

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению биспецифического антитела или фармацевтической композиции для лечения и/или профилактики рака. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению биспецифического антитела для получения фармацевтической композиции для лечения и/или профилактики рака.

В фармацевтических композициях, способах и/или применениях согласно настоящему изобретению заболевание, связанное с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим, может быть связано с активацией (например, аномальной активацией или чрезмерной активацией) и/или избыточной продукцией (сверхэкспрессией) PD-L1, 4-1BB или и того и другого. Например, заболеванием может быть рак.

Раком может быть солидный рак или рак крови, предпочтительно солидный рак.

Введение биспецифического антитела можно проводить одним или несколькими способами, хорошо известными в данной области техники.

"Терапевтически эффективная доза" антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно приводит к уменьшению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предотвращению ухудшения или потери дееспособности из-за заболевания. Например, для лечения субъектов, несущих опухоль, "терапевтически эффективная доза" предпочтительно ингибирует рост опухоли на по меньшей мере приблизительно 20%, более предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 40%, даже более предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 60% и еще более предпочтительно на по меньшей мере приблизительно 80% по сравнению с субъектами, не получавшими лечение. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может уменьшить размер опухоли или иным образом облегчить симптомы у субъекта, которым обычно является человек или другое млекопитающее.

Фармацевтические композиции могут содержать эффективное количество биспецифического антитела и приемлемый носитель. Согласно некоторым вариантам осуществления композиция дополнительно включает второй противоопухолевый агент (например, ингибитор иммунных контрольных точек).

Согласно конкретному варианту осуществления термин "фармацевтически приемлемый" может относиться к одобренному регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечисленному в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения животными и, более конкретно, человеком. Кроме того, "фармацевтически приемлемый носитель", как правило, представляет собой нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательное вещество для получения состава любого типа.

Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению, может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель представляет собой носитель, обычно используемый при получении состава.

Диагностическое применение биспецифического антитела.

Сверхэкспрессия и/или чрезмерная активация PD-L1 и/или 4-1BB наблюдается в биологическом образце (например, клетках, тканях, крови, сыворотке и т.д.), взятом у пациента, страдающего определенным раком (например, опухолевая клетка), и/или пациенты, у которых есть клетки, сверхэкспрессирующие PD-L1 и/или 4-1BB, вероятно, отвечают на лечение биспецифическим антителом. Соответственно биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению также можно применять для диагностических и прогностических целей.

Согласно варианту осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для диагностики заболевания, связанного с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим, причем композиция содержит биспецифическое антитело. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению биспецифического антитела для диагностики заболевания, связанного с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу диагностики заболевания, связанного с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим, причем способ предусматривает приведение в контакт биологического образца, взятого у пациента, с биспецифическим антителом, и обнаружение реакции антиген-антитело или измерение уровня реакции антиген-антитело в биологическом образце. Согласно этому способу, когда реакция антиген-антитело обнаружена в биологическом образце или уровень реакции антиген-антитело в биологическом образце выше, чем в нормальном образце, пациент, у которого взят биологический образец, может быть определен как пациент, страдающий заболеванием, связанным с PD-L1, 4-1BB, или и тем, и другим. Поэтому согласно некоторым вариантам осуществления способ может дополнительно предусматривать приведение в контакт нормального образца с биспецифическим антителом и измерение уровня реакции антиген-антитело в нормальном образце. Кроме того, способ может дополнительно предусматривать сравнение уровня реакции антиген-антитело в биологическом образце и в нормальном образце после стадии измерения. Кроме того, после обнаружения или стадии сравнения способ дополнительно предусматривать определение пациента как

пациента с заболеванием, связанным с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим, когда реакция антиген-антитело обнаружена в биологическом образце или уровень реакции антиген-антитело в биологическом образце выше, чем в нормальном образце.

Заболевание, связанное с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим, может быть связано с активацией (например, аномальной активацией или чрезмерной активацией) и/или избыточной продукцией (сверхэкспрессией) PD-L1, 4-1BB или и того и другого. Например, заболевание может представлять собой рак, как описано выше.

В диагностической композиции и способе биологический образец может быть по меньшей мере одним, выбранным из группы, состоящей из клетки, ткани, биологической жидкости (например, кровь, сыворотка, лимфа и т.д.) и т.п., полученным (взятом) у пациента для постановки диагноза. Нормальный образец может быть по меньшей мере одним, выбранным из группы, состоящей из клетки, ткани, биологической жидкости (например, кровь, сыворотка, лимфа, моча и т.д.) и т.п., полученным (взятом) у пациента, не имеющего заболевание, связанное с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим. Пациент может быть выбран из млекопитающего, такого как человек. После необязательной предварительной обработки образца образец можно инкубировать с биспецифическим антителом согласно настоящему изобретению в условиях, позволяющих антителу взаимодействовать с белком PD-L1 и/или 4-1BB, потенциально присутствующим в образце.

Присутствие и/или уровень (концентрация) белка PD-L1 и/или 4-1BB в образце можно использовать для идентификации пациента, который является подходящим для лечения биспецифическим антителом, или пациента, который отвечает на или восприимчив к лечению биспецифическим антителом.

Согласно варианту осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, идентифицирующей пациента, который подходит для лечения биспецифическим антителом, или пациента, который отвечает на или восприимчив к лечению биспецифическим антителом, причем композиция содержит биспецифическое антитело. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к применению биспецифического антитела для идентификации пациента, который подходит для лечения биспецифическим антителом, или пациента, который отвечает на или восприимчив к лечению биспецифическим антителом. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу идентификации пациента, который подходит для лечения биспецифическим антителом, или пациента, который отвечает на или восприимчив к лечению биспецифическим антителом, причем способ предусматривает приведение в контакт биологического образца, взятого у пациента, с биспецифическим антителом и обнаружение реакции антиген-антитело или измерение уровня реакции антиген-антитело в биологическом образце.

Согласно варианту осуществления настоящее изобретение относится к композиции для обнаружения PD-L1, 4-1BB или их обоих одновременно в биологическом образце, причем композиция содержит биспецифическое антитело. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу обнаружения PD-L1, 4-1BB или их обоих одновременно в биологическом образце, причем способ предусматривает приведение в контакт биологического образца и биспецифического антитела и обнаружение (измерение) реакции антиген-антитело (связывания) между биспецифическим антителом и PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим.

В композиции для обнаружения и способе обнаружения термин "обнаружение PD-L1, 4-1BB или и того и другого" может относиться без ограничения к обнаружению присутствия (и/или отсутствия) и/или уровня PD-L1, 4-1BB или и того и другого в биологическом образце.

В способе обнаружения, когда обнаруживается реакция антиген-антитело, может быть определено, что PD-L1, 4-1BB или и то, и другое присутствуют в биологическом образце, и когда реакция антиген-антитело не обнаруживается, можно определить, что PD-L1, 4-1BB или и то, и другое отсутствуют (не присутствуют) в биологическом образце. Следовательно, способ обнаружения может дополнительно предусматривать после стадии обнаружения определение присутствует ли PD-L1, 4-1BB или и то, и другое в биологическом образце, когда реакция антиген-антитело обнаружена, и/или отсутствует ли (не присутствует) PD-L1, 4-1BB или и то, и другое в биологическом образце, когда реакция антиген-антитело не обнаружена.

В способе обнаружения уровень PD-L1, 4-1BB или обоих может быть определен в соответствии со степенью реакции антиген-антитело (например, количество комплекса антиген-антитело, образованного реакцией антиген-антитело, интенсивность любого сигнала, полученного реакцией антиген-антитело, и т.п., которые могут быть измерены любыми общепринятыми средствами).

Биологический образец может содержать по меньшей мере один образец, выбранный из группы, состоящей из клетки (например, опухолевой клетки), ткани (например, опухолевой ткани), жидкости организма (например, крови, сыворотки и т.д.) и т.п., взятый у или выделенный из млекопитающего, такого как человек. Стадии способа обнаружения могут быть проведены *in vitro*.

В способе диагностики и/или способе обнаружения стадию обнаружения реакции антиген-антитело или измерения уровня реакции антиген-антитело можно проводить любым общепринятым способом, известным в соответствующей области техники, таким как общие ферментативные реакции, флуоресцентные реакции, люминесцентные реакции и/или обнаружение излучения. Например, стадию можно

проводить способом, выбранным без ограничения из группы, состоящей из иммунохроматографии, иммуногистохимии (ИНС), твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), радиоиммуноанализа (RIA), иммуноферментного анализа (EIA), флуоресцентного иммуноанализа (FIA), люминесцентного иммуноанализа (LIA), вестерн-блоттинга, микроматриц, проточной цитометрии, поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и т.п.

Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения антител.

Согласно варианту осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему биспецифическое антитело. В частности, согласно варианту осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему тяжелую цепь биспецифического антитела в форме IgG-scFv. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему легкую цепь биспецифического антитела в форме IgG-scFv. Форма IgG-scFv может относиться к любому виду биспецифического антитела, содержащего антитело IgG полной длины, нацеленное на (связывающееся с) один из белков PD-L1 и 4-1BB, и фрагмент scFv, нацеленный на (связывающийся с) другой, где scFv связан с С-концом и/или N-концом антитела IgG полной длины напрямую (без пептидного линкера) или через пептидный линкер.

Согласно варианту осуществления, когда биспецифическое антитело в форме IgG-scFv содержит антитело IgG полной длины против PD-L1, и фрагмент scFv против 4-1BB, полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь биспецифического антитела, может кодировать тяжелую цепь антитела IgG полной длины против PD-L1, и фрагмент scFv против 4-1BB, который связан с С-концом и/или N-концом антитела IgG полной длины, напрямую или через пептидный линкер, и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь биспецифического антитела, может кодировать легкую цепь антитела IgG полной длины против PD-L1.

Согласно другому варианту осуществления, когда биспецифическое антитело в форме IgG-scFv содержит антитело IgG полной длины против 4-1BB и фрагмент scFv против PD-L1, полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь биспецифического антитела, может кодировать тяжелую цепь антитела IgG полной длины против 4-1BB, и фрагмент scFv против PD-L1, который связан с С-концом и/или N-концом антитела IgG полной длины напрямую или через пептидный линкер, и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь биспецифического антитела, может кодировать легкую цепь антитела IgG полной длины против 4-1BB.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантному вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь биспецифического антитела, полинуклеотид, кодирующий легкую цепь биспецифического антитела, или и то, и другое. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к рекомбинантной клетке, трансфицированной рекомбинантным вектором.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу получения биспецифического антитела, предусматривающему экспрессию полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь биспецифического антитела, полинуклеотида, кодирующего легкую цепь биспецифического антитела, в клетке. Стадию экспрессии полинуклеотида можно проводить путем культивирования клетки, содержащей полинуклеотид (например, в рекомбинантном векторе), в условиях, позволяющих экспрессию полинуклеотида. Способ может дополнительно предусматривать выделение и/или очистку биспецифического антитела из клеточной культуры после стадии экспрессии или культивирования.

Примеры

Далее настоящее изобретение описано более подробно посредством примеров. Следующие примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения, но не предназначены для его ограничения.

Пример 1. Получение анти-PD-L1 моноклональных антител.

1.1. Получение мышиных моноклональных антител против человеческого PD-L1 и их анализ.

Мышиные моноклональные антитела против человеческого PD-L1 конструировали с применением гибридомной методики, как раскрыто в публикации международной заявки WO 2017-215590.

Аминокислотные и полинуклеотидные последовательности переменных областей супернатантов гибридомы, названной Гибридома HL1210-3, приведены в табл. 5 ниже.

Таблица 5

Вариабельные последовательности HL1210-3

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
HL1210-3 VH	GAAGTGAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAG TGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAACTCTCCTGTGC AGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGACATGT CTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAGAAGAGTCTGGA GTGGGTTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTGGTTAC ATCTACTATTTCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTTA CCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTA CCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACG GCCTTGATATTTGTGCAAGAGAATTTGGTAAGC GCTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTC AGTCACCGTCTCCTCA	45
HL1210-3 VH	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYDMS WVRQTPEKSLEWVATISDGGGYIYYSDSVKGRFTIS RDNAKNNLYLQMSSLRSEDALYICAREFGKRYAL DYWGQGTSVT	46
HL1210-3 VL	GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGT CCACATCGGTAGGAGACAGGGTCAGCATCTCCTG CAAGGCCAGTCAGGATGTGACTCCTGCTGTCGCC TGGTATCAACAGAAGCCAGGACAATCTCCTAAAC TACTGATTTACTCCACATCCTCCCGGTACTGGA GTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGA CGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCT GAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAACATT ATACTACTCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAA GCTGGAGCTGAAA	47
HL1210-3 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSISCKASQDVTPAVAW YQQKPGQSPKLLIYSTSSRYTGVPDRFTGSGSGTDF TFTISSVQAEDLAVYYCQQHYTTPFTFGAGTKLELK	48

1.2. Гуманизация мышиных mAb HL1210-3.

Гены варибельной области моноклонального антитела (mAb) HL1210-3 применяли для создания гуманизированного моноклонального антитела посредством способов, широко используемых в области техники и раскрытых в публикации международной заявки WO 2017-215590.

Аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности некоторых полученных гуманизированных антител приведены в табл. 6 ниже.

Таблица 6

Последовательности гуманизированных антител (жирным шрифтом показана CDR)

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
HL1210-VH	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYDMSW VRQTPEKSLEWVATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISR NAKNNLYLQMSSLRSEDALYICAREFGKRYALDYW GGTSVTVSS	49
Hu1210 VH.1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKGLEWVSTISDGGGYIYYSDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFGKRYALDY WGQGTTVTVSS	50
Hu1210 VH.1a	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKGLEWVATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFGKRYALD YWGQGTTVTVSS	51
Hu1210 VH.1b	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKSLEWVATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFGKRYALDY WGQGTTVTVSS	52
Hu1210 VH.2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWI RQAPGKGLEWVSTISDGGGYIYYSDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFGKRYALDYW GQGTTVTVSS	53
Hu1210 VH.2a	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWI RQAPGKGLEWVATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFGKRYALDY WGQGTTVTVSS	54
Hu1210 VH.2b	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKSLEWVATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFGKRYALDY	55

	WGQGTTVTVSS	
Hu1210 VH.3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWV RQAPGKGLEWVSTISDGGGYIYYSDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFGKRYALDYW GQGTTVTVSS	56
Hu1210 VH.3a	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWV RQAPGKSLEWVATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYICAREFGKRYALDYW GQGTTVTVSS	57
Hu1210 VH.4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKGLEWVSTISDGGGYIYYSDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAREFGKRYALDY WGQGTTVTVSS	58
Hu1210 VH.4a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKGLEWVATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAREFGKRYALD YWGQGTTVTVSS	59
Hu1210 VH.4b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKSLEWVATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREFGKRYALDY WGQGTTVTVSS	60
Hu1210 VH.4c	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKSLEWVATISEGGGYIYYSDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREFGKRYALDY WGQGTTVTVSS	61
Hu1210 VH.4d (H12 VH)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKSLEWVATISDAGGYIYYSDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREFGKRYALDY WGQGTTVTVSS	62
Hu1210 VH.4e	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKSLEWVATISDVGGYIYYSDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREFGKRYALDY WGQGTTVTVSS	63

Hu1210 VH.5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKGLEWVATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFGKRYALD YWGQGTLLTVSS	64
HU1210 VH.5a	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKGLEWVATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYICAREFGKRYALD YWGQGTLLTVSS	65
HU1210 VH.5b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKGLEWVATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYICAREFGKRYALD YWGQGTLLTVSS	66
HU1210 VH.5C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKGLEWVATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISR DNAKNNLYLQMNSLRAEDTAVYICAREFGKRYALD YWGQGTLLTVSS	67
HU1210 VH.5d	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQTPEKSLEWVATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISR NAKNNLYLQMNSLRAEDTAVYICAREFGKRYALDY WGQGTLLTVSS	68
HL1210-VK	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSISCKASQDVTPAVAWY QQKPGQSPKLLIYSTSSRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTI SSVQAEDLAVYYCQQHYTTPLTFGAGTKLELK	69
Hu1210 VK.1 (H12 VL)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVTPAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTIS SLQPEDATYYCQQHYTTPLTFGQGTKLEIK	70
Hu1210 VL.1a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVTPAVAWYQ QKPGKSPKLLIYSTSSRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTIS SLQPEDATYYCQQHYTTPLTFGQGTKLEIK	71
Hu1210 VK.2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVTPAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQHYTTPLTFGQGTKLEIKR	72
Hu1210 VK.2a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVTPAVAWYQ	73

	QKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYC QQHYTTPL TFGQGTKLEIKR	
Hu1210 VK.2b	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKAS QDVTPA VAWYQ QKPGQSPKLLIYSTSSRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS 74 SLQPEDFATYYC QQHYTTPL TFGQGTKLEIKR	
Hu1210 VK.2c	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITISCKAS QDVTPA VAWYQ QKPGQSPKLLIYSTSSRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS 75 SLQPEDFATYYC QQHYTTPL TFGQGTKLEIKR	
Название	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID NO:
HL1210 VH	GAGGTGAAGCTGGTGGAGAGCGGCGGAGATCTGGT GAAGCCTGGCGGCAGCCTGAAGCTGAGCTGTGCCG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCT GGGTGAGGCAGACCCCGAGAAGAGCCTGGAGTGG GTGGCCACCATCAGCGATGGCGGCGGCTACATCTA CTACAGCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCA 76 GCAGGGACAACGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAG ATGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCCTGTA CATCTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAGAGGTACGCC TGGACTACTGGGGACAGGGCACCGCGTGACCGTG AGCAGC	
Hu1210 VH.1	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGT GAAGCCCGGAGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCT GGGTGAGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGG GTGAGCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTAT TACTCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAG 77 CAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCCCT GGACTACTGGGGCCAGGGCACAAACCGTGACCGTGA GCAGC	
Hu1210 VH.1a	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGT GAAGCCCGGAGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG 78	

	CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCT GGGTGAGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGG GTGGCCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTAT TACTCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAG CAGGGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCCCT GGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGA GCAGC	
Hu1210 VH.1b	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGT GAAGCCCGGAGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCT GGGTGAGACAGGCCCCTGGCAAAGCCTGGAGTGG GTGGCCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTAT TACTCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAG CAGGGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC ATCTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCCCT GGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGA GCAGC	79
Hu1210 VH.2	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGT GAAGCCCGGAGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCT GGATCAGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGG GTGAGCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTAT TACTCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAG CAGGGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCCCT GGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGA GCAGC	80
Hu1210 VH.2a	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGT GAAGCCCGGAGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCT	81

	GGATCAGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGG GTGGCCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTAT TACTCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAG CAGGGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCCCT GGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGA GCAGC	
Hu1210 VH.2b	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGT GAAGCCCGGAGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCT GGGTGAGACAGGCCCTGGCAAAGCCTGGAGTGG GTGGCCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTAT TACTCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAG CAGGGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC ATCTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCCCT GGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGA GCAGC	82
Hu1210 VH.3	GAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGT GCAACCCGGAGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCT GGGTGAGACAGGCCCTGGCAAAGCCTGGAGTGG GTGAGCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTAT TACTCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAG CAGGGACAACAGCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCCCT GGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGA GCAGC	83
Hu1210 VH.3a	GAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGT GCAACCCGGAGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCT GGGTGAGACAGGCCCTGGCAAAGCCTGGAGTGG	84

	GTGGCCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTAT TACTCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAG CAGGGACAACAGCAAGAACCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC ATCTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCCCT GGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGA GCAGC	
Hu1210 VH.4	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGT GCAACCCGGAGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCT GGGTGAGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGG GTGAGCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTAT TACTCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAG CAGGGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGGGATGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCCCT GGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGA GCAGC	85
Hu1210 VH.4a	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGT GCAACCCGGAGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCT GGGTGAGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTGGAGTGG GTGGCCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTAT TACTCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAG CAGGGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGGGATGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCCCT GGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGA GCAGC	86
Hu1210 VH.4b	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGT GCAACCCGGAGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCT GGGTGAGACAGGCCCCTGGCAAAGCCTGGAGTGG GTGGCCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTAT	87

	TACTCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAG CAGGGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGGGATGAGGACACCGCCGTGTAC ATCTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCCCT GGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGA GCAGC	
Hu1210 VH.4c	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGT GCAACCCGGAGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCT GGGTGAGACAGGCCCCTGGCAAAAGCCTGGAGTGG GTGGCCACCATCTCCGAAGGCGGCGGCTACATCTAT TACTCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAG CAGGGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGGGATGAGGACACCGCCGTGTAC ATCTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCCCT GGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGA GCAGC	88
Hu1210 VH.4d	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGT GCAACCCGGAGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCT GGGTGAGACAGGCCCCTGGCAAAAGCCTGGAGTGG GTGGCCACCATCTCCGATGCGGGCGGCTACATCTAT TACTCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAG CAGGGACAACGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGGGATGAGGACACCGCCGTGTAC ATCTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCCCT GGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGA GCAGC	89
Hu1210 VH.4e	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGT GCAACCCGGAGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTG CCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGACATGAGCT GGGTGAGACAGGCCCCTGGCAAAAGCCTGGAGTGG GTGGCCACCATCTCCGATGTTGGCGGCTACATCTAT TACTCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAG	90

	CAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGATGAGGACACCGCCGTGTACATCTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGA GCAGC	
Hu1210 VH.5	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGT GCAACCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGTCCTGTGCCGC TTCCGGCTTCACCTTCAGCTCCTACGATATGAGCTG GGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGG TGGCCACCATCTCCGACGGAGGCGGCTACATCTACT ACTCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCC 91 GGGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTACCTGCAGATG AACTCTCTCAGGGCTGAGGACACCGCCGTGTATTAC TGCGCCAGGGAGTTTGGCAAGAGGTACGCCCTGGA TTA CTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGAGCT CC	
Hu1210 VH.5a	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGT GCAACCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGTCCTGTGCCGC TTCCGGCTTCACCTTCAGCTCCTACGATATGAGCTG GGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGG TGGCCACCATCTCCGACGGAGGCGGCTACATCTACT ACTCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCC 92 GGGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTACCTGCAGATG AACTCTCTCAGGGCTGAGGACACCGCCGTGTATATC TGCGCCAGGGAGTTTGGCAAGAGGTACGCCCTGGA TTA CTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGAGCT CC	
Hu1210 VH.5b	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGT GCAACCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGTCCTGTGCCGC TTCCGGCTTCACCTTCAGCTCCTACGATATGAGCTG GGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGG 93 TGGCCACCATCTCCGACGGAGGCGGCTACATCTACT ACTCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCC GGGACAACGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAGATG	

	AACTCTCTCAGGGCTGAGGACACCGCCGTGTATATC TGCGCCAGGGAGTTTGGCAAGAGGTACGCCCTGGA TTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGAGCT CC	
Hu1210 VH.5c	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGT GCAACCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGTCCTGTGCCGC TTCCGGCTTCACCTTCAGCTCCTACGATATGAGCTG GGTGAGGCAGACCCCTGAGAAGAGCCTGGAGTGGG TGGCCACCATCTCCGACGGAGGCGGCTACATCTACT ACTCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCC 94 GGGACAACGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAGATG AACTCTCTCAGGGCTGAGGACACCGCCGTGTATATC TGCGCCAGGGAGTTTGGCAAGAGGTACGCCCTGGA TTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGAGCT CC	
Hu1210 VH.5d	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGT GCAACCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGTCCTGTGCCGC TTCCGGCTTCACCTTCAGCTCCTACGATATGAGCTG GGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGG TGGCCACCATCTCCGACGGAGGCGGCTACATCTACT ACTCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCC 95 GGGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTACCTGCAGATG AACTCTCTCAGGGCTGAGGACACCGCCGTGTATATC TGCGCCAGGGAGTTTGGCAAGAGGTACGCCCTGGA TTACTGGGGCCAGGGCACAAACCGTGACAGTGAGCT CC	
HL1210 VK	GACATCGTGATGACCCAGAGCCACAAGTTCATGAG CACCAGCGTGGGCGATAGGGTGAGCATCAGCTGCA AGGCCAGCCAGGATGTGACCCCTGCCGTGGCCTGG TACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCAAGCTGCT GATCTACAGCACCAGCAGCAGGTACACCGGCGTGC 96 CCGACAGGTTACAGGAAGCGGCAGCGGCACCGAC TTCACCTTCACCATCAGCAGCGTGCAGGCCGAGGA CCTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGCACTACACCAC	

	CCCTCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGCTGAAG	
Hu1210 VK.1	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGATGTGACCCCTGCCGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACAGCACCAGCAGCAGGTACACCGGCGTGCCAGCAGGTTTAGCGGAAGCGGCAGCGGCACCGAC TTCACCTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCACTACACCACCCTCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG	97
Hu1210 VK.1a	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGATGTGACCCCTGCCGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGTCCCCCAAGCTGCTGATCTACAGCACCAGCAGCAGGTACACCGGCGTGCCAGCAGGTTTAGCGGAAGCGGCAGCGGCACCGAC TTCACCTTACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCACTACACCACCCTCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG	98
Hu1210 VK.2	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCTAGCAGCCTGTCCGCTTCCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACGTGACACCTGCTGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTGGCAAGGCTCCTAAGCTCCTGATCTACAGCACATCCTCCCGGTACACCGGAGTGCCCTCCAGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTTCACCCTGACCATTTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGCACTACACCACACCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGG	99
Hu1210 VK.2a	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCTAGCAGCCTGTCCGCTTCCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA	100

	GGCCAGCCAGGACGTGACACCTGCTGTGGCCTGGT ATCAACAGAAGCCTGGCAAGGCTCCTAAGCTCCTG ATCTACAGCACATCCTCCCGGTACACCGGAGTGCCC GACAGGTTTACCGGCAGCGGCTCCGGCACCATTTC ACCCTGACCATTTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTC GCCACCTACTACTGCCAGCAGCACTACACCACACCC CTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAA GCGG	
Hu1210 VK.2b	GACATTTCAGATGACCCAGTCCCCTAGCAGCCTGTCC GCTTCCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAA GGCCAGCCAGGACGTGACACCTGCTGTGGCCTGGT ATCAACAGAAGCCTGGCCAGAGCCCTAAGCTCCTG ATCTACAGCACATCCTCCCGGTACACCGGAGTGCCC GACAGGTTTACCGGCAGCGGCTCCGGCACCATTTC ACCCTGACCATTTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTC GCCACCTACTACTGCCAGCAGCACTACACCACACCC CTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAA GCGG	101
Hu1210 VK.2c	GACATTTCAGATGACCCAGTCCCCTAGCAGCCTGTCC GCTTCCGTGGGCGACAGGGTGACCATCAGCTGCAA GGCCAGCCAGGACGTGACACCTGCTGTGGCCTGGT ATCAACAGAAGCCTGGCCAGAGCCCTAAGCTCCTG ATCTACAGCACATCCTCCCGGTACACCGGAGTGCCC GACAGGTTTACCGGCAGCGGCTCCGGCACCATTTC ACCCTGACCATTTCCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTC GCCACCTACTACTGCCAGCAGCACTACACCACACCC CTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAA GCGG	102

Гуманизированные гены VH и VK были получены синтетически и затем соответственно клонированы в векторы, содержащие константные домены гамма-1 человека и каппа человека. Спаривание VH человека и VK человека приводило к созданию 40 гуманизированных антител (см. табл. 7).

Таблица 7

Гуманизированные антитела с их VH и VL областями

VH VK	Hu1210 VH.1	Hu1210 VH.1a	Hu1210 VH.1b	Hu1210 VH.2	Hu1210 VH.2a	Hu1210 VH 2.b	Hu1210 VH
Hu1210 VK.1	Hu1210-1	Hu1210-2	Hu1210-3	Hu1210-4	Hu1210-5		
Hu1210 VK.1a	Hu1210-7	Hu1210-8	Hu1210-9	Hu1210-10	Hu1210-11		
Hu1210 VK							H1210 Химера

VH VK	Hu1210 VH.3	Hu1210 VH.3a	Hu1210 VH.4	Hu1210 VH.4a	Hu1210 VH.4b
Hu1210 VK.1	Hu1210-13	Hu1210-14	Hu1210-15	Hu1210-16	Hu1210-17
Hu1210 VK.1a	Hu1210-18	Hu1210-19	Hu1210-20	Hu1210-21	Hu1210-22

VH VK	Hu1210 VH.5	HU1210 VH.5a	HU1210 VH.5b	HU1210 VH.5c	HU1210 VH.5d
Hu1210 VK.2	Hu1210-23	Hu1210-27	Hu1210-31	Hu1210-32	Hu1210-36
Hu1210 VK.2a	Hu1210-24	Hu1210-28		Hu1210-33	Hu1210-37
Hu1210 VK.2b	Hu1210-25	Hu1210-29		Hu1210-34	Hu1210-38
Hu1210 VK.2c	Hu1210-26	Hu1210-30		Hu1210-35	Hu1210-39

VH VK	Hu1210 VH.4c	Hu1210 VH.4d	Hu1210 VH.4e
Hu1210 VK.1	Hu1210-40	Hu1210-41	Hu1210-42

1.3. Идентификация эпитопа PD-L1.

Это исследование проводили для идентификации аминокислотных остатков, участвующих в связывании PD-L1 с антителом согласно настоящему изобретению.

Конструировали библиотеку аланинового сканирования для PD-L1. Кратко, 217 мутантных клонов PD-L1 создавали на интегральной молекулярной платформе инженерии белка. Связывание Fab Hu1210-41 с каждым вариантом в библиотеке мутаций PD-L1 определяли в двух экземплярах с помощью высокопроизводительной проточной цитометрии. Из каждой точки исходных данных вычитали фоновую флуоресценцию и нормализовали по реактивности с PD-L1 дикого типа (WT). Для каждого варианта PD-L1 среднее значение связывания наносили на график как функцию от экспрессии. Для определения предварительных критических клонов (кружки с крестиками) применяли пороговые значения (пунктирные линии) >70% от связывания дикого типа с контрольным моноклональным антителом (MAb) (Mab M1H1, полученное в лаборатории) и реактивности <30% от дикого типа в отношении Fab Hu1210-41 (фиг. 3). Y134, K162 и N183 остатки PD-L1 идентифицировали как необходимые остатки для связывания Hu1210-41. Низкая реактивность клона N183A с Fab Hu1210-41 предполагает, что он является основным энергетическим участником связывания Hu1210-41 с меньшим вкладом Y134 и K162.

Критические остатки (сферы) были идентифицированы на 3D-структуре PD-L1, как показано на фиг. 4. Эти остатки, Y134, K162 и N183, таким образом, составляют эпитопы PD-L1, ответственные за связывание с антителами согласно различным вариантам осуществления настоящего раскрытия.

Интересно отметить, что Y134, K162 и N183 все расположены в пределах домена IgC белка PD-L1. Внеклеточные части как PD-1, так и PD-L1 имеют домен IgV и домен IgC. Общеизвестно, что PD-L1 связывается с PD-1 посредством связывания между их доменами IgV. Однако в отличие от таких обычных антител Hu1210-41 связывается с доменом IgC, который, как можно было ожидать, неэффективен при ингибировании связывания PD-1/PD-L1. Этот другой эпитоп Hu1210-41, что удивительно, вероятно способствует отличным активностям Hu1210-41.

1.4. Инженерия антител для анти-PD-L1 антитела.

В примерах 1.4 предприняли попытку идентифицировать дополнительно улучшенные антитела на основе Hu1210-41 с использованием мутагенеза.

Четыре подбиблиотеки конструировали для инженерии антител моноклонального анти-PD-L1 антитела с использованием любой из следующих стратегий. В стратегии 1 мутагенез варибельного домена тяжелой цепи CDR3 VH или VL-CDR3 осуществляли путем весьма случайной мутации. В стратегии 2 две комбинированные библиотеки CDR, состоящие из (VH-CDR3, VL-CDR3 и VL-CDR1) или (VH-CDR1, VH-CDR2 и VL-CDR2), создавали с помощью прохода по CDR с контролируруемыми частотами мутаций.

Био-пэннинг. Способы фагового пэннинга адаптировали путем сокращения времени инкубации/связывания перед жесткими условиями промывки. Кратко, 100 мкл магнитных стрептавидиновых шариков (Invitrogen, США) блокировали 1 мл MPBS в течение 1 ч при комнатной температуре. В другой пробирке фаговую библиотеку предварительно инкубировали ($5 \times 10^{11} \sim 12$ на каждый цикл) со 100 мкл магнитных стрептавидиновых шариков в 1 мл MPBS для удаления нежелательных связывающих веществ. Концентратор магнитных частиц использовался для разделения фага и шариков. Биотинилированный белок PD-L1 добавляли к фагу и инкубировали 2 ч при комнатной температуре и осторожно перемешивали, используя верхний шейкер. Шарик, несущий фаг из раствора, отделяли в концентрате магнитных частиц, а супернатант отбрасывали. Шарик промывали свежим промывочным буфером, десять раз PBST и десять раз PBS (pH 7,4). Добавляли 0,8 мл 0,25% трипсина в PBS (Sigma, США) и инкубировали в течение 20 мин при 37°C для элюирования фага. Полученный фаг титровали и исключали из следующего цикла пэннинга, уменьшая концентрацию антигена от цикла к циклу.

Скрининг посредством ELISA и ранжирование включен/выключен

Клоны отбирали и индуцировали на основании желаемого результата пэннинга, анализ ELISA фагов проводили для первичного скрининга, положительные клоны анализировали путем секвенирования, находили уникальные горячие точки.

В табл. 8 показаны идентифицированные мутации. Как показано ниже, остатки мутаций горячих точек и/или их заместители подчеркнуты.

Таблица 8

Мутации в CDR			
	CDR-H1 (SEQ ID No.)	CDR-H2 (SEQ ID No.)	CDR-H3 (SEQ ID No.)
WT (H12)	SYDMS (107)	TISDAGGYIYYSDSVKG (117)	EFGKRYALDY (127)
B3	SYDMS (108)	TISDAGGYIYYRDSVKG (118)	EFGKRYALDY (128)
C4	SYDMS (109)	TISDAGGYIYYRDSVKG (119)	EFGKRYALD <u>S</u> (129)
B1	SYDMS (110)	TISDAGGYIYYRDSVKG (120)	<u>E</u> <u>I</u> <u>F</u> NRYALDY (130)
B6	SYDMS (111)	TISDAGGYIYYRDSVKG (121)	<u>E</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>W</u> RYALDY (131)
C3	SYDMS (112)	TISDAGGYIYYRDSVKG (122)	<u>E</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>F</u> RYALDY (132)
C6	SYDMS (113)	TISDAGGYIYYRDSVKG (123)	<u>E</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>F</u> RYALDY (133)
A1	SYDMS (114)	TISDAGGYIYYRDSVKG (124)	<u>E</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>H</u> RYALDY (134)
A2	SYDMS (115)	TISDAGGYIYYRDSVKG (125)	<u>E</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>G</u> RYALDY (135)
A3	SYDMS (116)	TISDAGGYIYYRDSVKG (126)	EFGKRYALDY (136)
	CDR-L1 (SEQ ID No.)	CDR-L2 (SEQ ID No.)	CDR-L3 (SEQ ID No.)
WT	KASQDVTPAVA (137)	STSSRYT (147)	QQHYTTPLT (157)
B3	K <u>A</u> KQDVTPAVA (138)	STSSRYT (148)	<u>M</u> QHYTTPLT (158)
C4	KASQDV <u>W</u> PAVA (139)	STSSRYT (149)	QQH <u>S</u> TTPLT (159)
B1	KASQDVTPAVA (140)	STSSRYT (150)	QQHYTTPLT (160)
B6	KASQDVTPAVA (141)	STSSRYT (151)	QQHYTTPLT (161)
C3	KASQDVTPAVA (142)	STSSRYT (152)	QQHYTTPLT (162)
C6	KASQDVTPAVA (143)	STSSRYT (153)	QQHYTTPLT (163)
A1	KASQDVTPAVA (144)	STSSRYT (154)	QQHYTTPLT (164)
A2	KASQDVTPAVA (145)	STSSRYT (155)	QQHYTTPLT (165)
A3	KASQDVTPAVA (146)	STSSRYT (156)	QQH <u>S</u> <u>D</u> APLT (166)

Аминокислотные последовательности переменных областей этих антител показаны в табл. 9 ниже.

Таблица 9

Последовательности антител

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
WT-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWV RQAPGKSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRDN KNSI.YI.QMNSI.RDEDTAVYICAREFGKRYAI.DYWGQ GTTTVTVSS	167
WT-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSL	168
	QPEDIATYYCQHHYTTPLTFGQGTKLEIK	
B3-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWV RQAPGKSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREFGKRYALDYWGQ GTTTVTVSS	169
B3-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAKQDVTPAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISS LQPEDIATYYCMQHHYTTPLTFGQGTKLEIK	170
C4-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWV RQAPGKSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREFGKRYALDSWGQG TTTVTVSS	171
C4-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVWPAVAVYQ QKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISS LQPEDIATYYCQHHSTPLTFGQGTKLEIK	172
B1-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREIFNRYALDYW GQGTTTVTVSS	173
B1-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIATYYCQHHYTTPLTFGQGTKLEIK	174
B6-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICARELPWRYALDY WGQGTTTVTVSS	175
B6-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIATYYCQHHYTTPLTFGQGTKLEIK	176
C3-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICARELHFRYALDYW GQGTTTVTVSS	177
C3-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQ	178

	QKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIATYYCQQHYYTTLTFTGQGTKEIK	
C6-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICARELYFRYALDYW GQGTTTVTVSS	179
C6-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIATYYCQQHYYTTLTFTGQGTKEIK	180
A1-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICARELLHRYALDYW GQGTTTVTVSS	181
A1-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIATYYCQQHYYTTLTFTGQGTKEIK	182
A2-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICARELRGRYALDY WGQGTTTVTVSS	183
A2-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIATYYCQQHYYTTLTFTGQGTKEIK	184
A3-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREFGKRYALDY WGQGTTTVTVSS	185
A3-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIATYYCQHSDAPLTFTGQGTKEIK	186

Таблица 10

Вариабельные области тяжелой цепи для клонов H12 и B6

Антитело №	VH	SEQ ID NO:
H12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKSLEWVATISDAGGYIYYSDSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICAREFGKRYALDY WGQGTTTVTVSS	103
B6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSW VRQAPGKSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICARELPWRYALDY WGQGTTTVTVSS	104

Таблица 11

Варибельные области легкой цепи для клонов H12 и B6

Антитело №	VL	SEQ ID NO:
H12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISS LQPEDIATYYCQQHYYTTPFTFGQGTKLEIK	105
B6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISS LQPEDIATYYCQQHYYTTPFTFGQGTKLEIK	106

1.5. Кинетика белка для PD-L1.

Для того чтобы исследовать кинетику связывания гуманизированного антитела, в этом примере проводили ранжирование аффинности с использованием Biotec. Как показано в табл. 12 ниже, H12 и B6.

Таблица 12

Антитело	KD (M)	kon(1/Mc)	kdis(1/c)	Chi
H12	6,122E-09	7,124E+04	4,361E-04	0,0415
B6	4,248E-09	9,827E+04	4,175E-04	0,0766

Как показано в табл. 12, протестированные анти-PD-L1 антитела показывают высокие аффинности связывания с PD-L1.

Пример 2. Получение анти-4-1BB моноклональных антител.

2.1. Скрининг полных человеческих моноклональных антител против 4-1BB Пэннинг фаговой библиотеки в иммунопробирке в отношении 4-1BB.

Для пэннинга библиотеки в отношении молекул-мишеней проводили в общем четыре раунда пэннинга с использованием иммунопробирок, покрытых 4-1BB.

Бактериальные колонии в результате 3 циклов пэннинга выращивали в SB-карбеницилине на 96-луночном планшете до помутнения, после чего в каждую лунку добавляли 1011 БОЕ вспомогательно-го фага VCSM13. Через 1 ч инфицирования при 37°C и осторожном встряхивании (80 об/мин) добавляли 70 мкг/мл канамицина, и клетки культивировали в течение ночи при 30°C со встряхиванием при 200 об/мин.

На следующий день планшеты центрифугировали и супернатанты, содержащие фаги, добавляли на планшеты для ELISA, покрытые антигеном 4-1BB, блокированные 3% BSA в PBST. После 1 ч инкубации при комнатной температуре планшеты трижды промывали PBST и добавляли антитело анти-M13 антитело. Планшеты инкубировали в течение 1 ч, трижды промывали PBST и измеряли активность связывания с использованием тетраметилбензидина (TMB).

Специфические связывающие 4-1BB амплифицировали для секвенирования плазмидной ДНК. V-гены (VL) легкой цепи Ig и последовательности VH анализировали для идентификации уникальных последовательностей и определения разнообразия последовательностей.

Таблица 13

Варибельные области тяжелой цепи

Антитело №	VH	SEQ ID NO:
41B01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGK GLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDGQRNSMREFDYWGQGT LVTVSS	187
41B01.01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGK GLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDAQRNSMREFDYWGQGT LVTVSS	188

41B01.02	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGK GLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARD AQRQSMREFDYWGQGTLVTVSS	189
41B01.03	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGK GLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARD AQRNSMREFDYWGQGTLVTVSS	190
41B01.04	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGK GLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARD AQRQSMREFDYWGQGTLVTVSS	191
41B02	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYDMSWVRQAPGK GLEWVSVIYPDDGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDAAVYYCAKHGGQKPTTKSSSAYGMDGWGQGTLVTVSS	192

Таблица 14

CDR тяжелой цепи

Антитело №.	CDR H1	SE Q ID NO:	CDR H2	SE Q ID NO:	CDR H3	SE Q ID NO:
41B01	SYDM S	10	WISYSGGSIYYADS VKG	12	DGQRNSMREFDY	14
41B01.01	SYDM S	10	WISYSGGSIYYADS VKG	12	DAQRNSMREFDY	16
41B01.02	SYDM S	10	WISYSGGSIYYADS VKG	12	DAQRQSMREFDY	17
41B01.03	SYDM S	10	WISYSGGSIYYADS VKG	12	DAQRNSMREFDY	16
41B01.04	SYDM S	10	WISYSGGSIYYADS VKG	12	DAQRQSMREFDY	17
41B02	GYDM S	11	VIYPDDGNTYYAD SVKG	13	HGGQKPTTKSSS AYGMDG	15

Таблица 15

Вариабельны области легкой цепи

Антите ло №	VL	SEQ ID NO:
41B01	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGT APKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY YCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL	193
41B01.0 1	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGT APKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY YCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL	194
41B01.0 2	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGT APKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY YCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL	195
41B01.0 3	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGT APKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY YCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL	196

41B01.0	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGT	197
4	APKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY YCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL	
41B02	QSVLTQPPSASGTPGRRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGT	198
	APKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY YCATWDYSLSGYVFGGGTKLTVL	

Таблица 16

CDR легкой цепи

Антитело №	CDR L1	SE Q ID NO :	CDR L2	SE Q ID NO:	CDR L3	SE Q ID NO:
41B01	SGSSSNIGNNYVT	18	ADSHRP S	19	ATWDYSL S GYV	20
41B01.01	SGSSSNIGNNYVT	18	ADSHRP S	19	ATWDYSL S GYV	20
41B01.02	SGSSSNIGNNYVT	18	ADSHRP S	19	ATWDYSL S GYV	20
41B01.03	SGSSSNIGNNYVT	18	ADSHRP S	19	ATWDYSL S GYV	20
41B01.04	SGSSSNIGNNYVT	18	ADSHRP S	19	ATWDYSL S GYV	20
41B02	SGSSSNIGNNYVT	18	ADSHRP S	19	ATWDYSL S GYV	20

2.2. Антигенсвязывающие способности анти-4-1BB антител с человеческим 4-1BB.

(1) Связывание антигена, измеренное посредством ELISA.

Для оценки антигенсвязывающей активности антитела-кандидаты подвергали анализу ELISA. Кратко, микротитровальные планшеты покрывали человеческим белком 4-1BB-Fc при концентрации 0,1 мкг/мл в PBS, 100 мкл/лунка при 4°C в течение ночи, затем блокировали 100 мкл/лунка 5% BSA. Пятикратные разведения гуманизированных антител {41B01 и 41B02}, начиная с 10 мкг/мл, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1-2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали PBS/Tween, а затем инкубировали с козьим антителом против человеческого IgG, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки планшеты проявляли субстратом TMB и анализировали на спектрофотометре при OD 450-630 нм. Как показано на фиг. 5, протестированные анти-4-1BB антитела демонстрировали способность связываться с 4-1 BB.

(2) Клеточное связывание, измеренное посредством FACS.

Для того, чтобы оценить свойство связывания антигена, антитела-кандидаты анализировали на их связывание с экспрессированным белком 4-1BB млекопитающего с помощью FACS. Кратко, клетки 4-1BB-Jurkat инкубировали с антителами (41B01 и 41B02). После промывки буфером FACS (1% BSA в PBS) в каждую лунку добавляли FITC-антитело против человеческого IgG и инкубировали при 4°C в течение 1 ч. MFI для FITC оценивали посредством FACS Caliber. Как показано на фиг. 6, протестированные анти-4-1BB антитела проявляют способность связываться с 4-1BB, который экспрессируется на клеточной поверхности и может эффективно связываться с 4-1BB, экспрессируемым на клетках млекопитающих.

(3) Белковая кинетика для 4-1BB.

Чтобы исследовать кинетику связывания гуманизированного антитела, в этом примере выполняли ранжирование аффинности с использованием Octet Red 96. Как показано в табл. 17 ниже, 41B01 и 41B02.

Таблица 17

Антитело	KD (M)	kon(1/Mc)	kdis(1/c)	Chi	R ²
41B01	1,80E-10	6,58E+05	1,19E-04	0,0392	0,9987
41B02	1,01E-09	5,95E+05	6,03E-04	0,0525	0,9973

Как показано в табл. 17, протестированные анти- 4-1BB антитела демонстрируют высокую аффин-

ность связывания с 4-1BB.

Пример 3. Получение анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифических антител.

В качестве примера были отобраны клоны Hu1210-41 (Hu1210 VH.4dxHu1210 VK.1, см. табл. 6, далее "H12") и B6 (см. табл. 12) среди анти-PD-L1 клонов, полученных в примере 1, клоны 41B01, 41B01.01, 41B01.02, 41B01.03, 41B01.04 и 41B02 среди анти-4-1BB клонов, полученных в примере 2, для получения анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифического антитела в форме scFv IgG X полной длины. Когда PD-L1 помещали в часть полного IgG, применяли IgG1 с ADCC усеченной мутантной основной цепью (N297A мутация, патент США № 7332581, 8219149 и т.д.), и когда 4-1BB помещали в часть полного IgG, применяли IgG4.

Сегмент ДНК 1, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь антитела IgG анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифического антитела, вставляли в pcDNA 3.4 (Invitrogen, A14697; плазмида 1), и сегмент ДНК 2, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь антитела IgG анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифического антитела, вставляли в pcDNA 3.4 (Invitrogen, A14697; плазмида 2). После этого сегмент ДНК 3, кодирующий scFv, сливали в части сегмента ДНК 1, соответствующей С-концу области Fc антитела IgG, вставленного в плазмиду 1, с использованием сегмента ДНК 4, кодирующего линкерный пептид, имеющий в длину 10 аминокислот, состоящий из (GGGGS)₂, для конструирования векторов для экспрессии биспецифических антител. Кроме того, чтобы стабилизировать scFv применяли дополнительную модификацию для создания дисульфидного мостика, сливающего VL103-VH44 с С-концом легкой цепи и С-концом тяжелой цепи соответственно.

Последовательности тяжелой цепи, легкой цепи, scFv и ДНК сегментов приведены в табл. 18.

Таблица 18

Биспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1
клон в форме IgG и анти-4-1BB клон в форме scFv (PD-L1×4-1BB)

ABLPNB.01		(биспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 H12 клон в форме IgG и анти-4-1BB 41B01 клон в форме scFv)	
		Аминокислотная последовательность (N'→C') (Seq ID No.)	Нуклеотидная последовательность (5'→3') (Seq ID No.)
Тяжелый компонент	Тяжелая цепь H12	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQ APGKSLEWVATIS DAGGYIYSDSVK GRFTISRDNKNS LYLQMNSLRDEDT AVYICAREFGKRY ALDYWGQGT TVT VSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC	GAGGTGCAGCTGGTGGAGA GCGGAGGAGGACTGGTGCA ACCCGGAGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCTGCCAGCGG CTTCACCTTCAGCAGCTACG ACATGAGCTGGGTGAGACA GGCCCCCTGGCAAAGCCCTGG AGTGGGTGGCCACCATCTCC GATGCGGGCGGCTACATCTA TACTCCGACAGCGTGAAGG GCAGGTTCACCATCAGCAGG GACAACGCCAAGAACAGCC TGTACCTGCAGATGAACAGC CTGAGGGATGAGGACACCG CCGTGTACATCTGCGCCAGG GAGTTCGGCAAAGGTACG CCCTGGACTACTGGGGCCAG

		DKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNA KTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVS NKALPAIEKTISK AKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVS	GGCACAACCGTGACCGTGA GCAGC _{gct} AgcAccAAgGGCCC CTCTGTGTTCCCTCTGGCCCC TTCCTCTAAATCCACCTCTG GCGGAACCGCTGCTCTGGGC TGTCTGGTCAAGGACTACTT CCCTGAGCCCGTGACCGTGT CTTGGAATTCTGGCGCTCTG ACCAGCGAGTGCACACCTT TCCAGCTGTGCTGCAGTCCT CCGGCCTGTACTCTCTGTCC
		LTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGGS FFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSL SLSPGK (199)	TCTGTCTGTGACAGTGCCTTC CAGCTCTCTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAAC CACAAGCCCTCCAAACCAA GGTGGACAAGAAGGTGGAA CCCAAGTCCTGCGACAAGAC CCACACCTGTCTCCATGTC CTGCTCCAGAACTGCTGGGC
	Линкер	GGGGSGGGSGG GGG (200)	GGACCCTCCGTGTTCTCTGTT CCCTCCAAAGCCTAAGGACA CCCTGATGATCTCCCGGACC
scFv 41B01	VL	QSVLTQPPSASGTP GRRVTISCSGSSN IGNNYVTWYQQL PGTAPKLLIY ADS HRPSGVPDRFSGS KSGTSASLAISGLR SEDEADYYC ATW DYSLSGYVFGCGT KLTVL (201)	CCTGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGG ATCCCGAAGTGAAGTTCAAT TGGTACGTGGACGGCGTGGA AGTGCACAACGCCAAGACC AAGCCTAGAGAGGAACAGT AC _{gcc} TCCACCTACCGGGTGG TGTCCGTGCTGACCGTTCTG CACCAGGATTGGCTGAACGG
	Линкер	GGGGSGGGSGG GGSGGGGS (202)	CAAAGAGTACAAGTGCAAG GTGTCCAACAAGGCCCTGCC
	VH	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSS YDMSWVRQ APGKCLEWV SWIS YSGGSIYYADSVK GRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTA VYYCARD GQRNS MREFDYWGQGTL VTVSS (203)	TGCCCCTATCGAAAAGACCA TCTCTAAGGCCAAGGGCCAG CCCCGGGAACCTCAAGTGTA CACCTTGCCTCCCAGCCGGG AAGAGATGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGACCTGCCTGG TTAAGGGCTTCTACCCCTCC GATATCGCCGTGGAATGGGA GTCTAACGGCCAGCCCGAGA ACAACCTACAAGACCACCCCT CCTGTGCTGGACTCCGACGG CTCATTCTTCTGTACTCCAA GCTGACCGTGGACAAGTCTC

				GGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTCTCCTGCTCTGTGATGC ACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGTCCCTGTC CCTGTCTCCCGGCAAAGGTG GGGGGGGATCTGGTGGTGGT GGATCAGGGGGTGGGGGGT CTCAAAGCGTACTACCCAA CCTCCATCTGCATCCGGTAC ACCTGGTCGGCGAGTAACCA TCTCCTGCTCTGGGAGCTCT TCTAATATTGGTAACAATA TGTCACCTGGTATCAGCAGT TGCCTGGGACAGCACCCAAA CTTCTTATATATGCCGATAG CCATCGGCCCTCCGGCGTAC CCGATCGCTTCTCCGGGTCA AAATCTGGAACATCTGCCTC ACTCGCAATTAGTGGATTGC GATCTGAGGATGAAGCAGA TTATTATTGCGCTACCTGGG ATTATTCACTTTCTGGCTAC GTCTTTGGTtgtggaACAAAAC TTACCGTGTTGGGCGGCGGA GGAAGCGGAGGCGGCGGTT CTGGTGGTGGCGGTAGCGGA GGTGGTGGATCTGAAGTACA GCTTCTTGAGTCTGGCGGAG GATTGGTCCAGCCAGGCGGT TCCCTCCGCCTGTCATGTGC CGCATCCGGCTTTACTTTCTC TAGTTATGATATGAGCTGGG TTCGCCAAGCTCCTGGCAA tgcCTGGAGTGGGTCTCCTGG ATTTCATACTCAGGTGGCAG
--	--	--	--	---

			CATCTATTATGCTGACAGTG TGAAAGGTCGCTTTACAATC TCCCGAGATAACAGCAAAA ACACCTTGACCTGCAAATG AACAGCCTTCGCGCAGAGG ACACAGCCGTATATTATTGC GCTCGCGATGGACAACGTAA TTCTATGCGTGAGTTTGA ACTGGGGACAGGGGACATT GGTCACGTGTATCTTCC _{iga} (204)
Легкий компонент	Легкая цепь H12	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITIT KASQ DVTPAVAWYQQK PGKAPKLLI YSTSS RYTGVPSRFS SGSG SGTDFTFITISLQPE DIATYYC QQHYTT PLTFGQGT KLEIK RTVAAPSVFI FPPS DEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDST YSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNR GEC (28)	GACATCCAGATGACCCAGA GCCCTAGCAGCCTGAGCGCT AGCGTGGGCGACAGGGTGA CCATCACCTGCAAGGCCAGC CAGGATGTGACCCCTGCCGT GGCCTGGTACCAGCAGAAAG CCCGGCAAGGCCCAAGCT GCTGATCTACAGCACCAGCA GCAGGTACACCGGCGTGCCC AGCAGGTTTAGCGGAAGCG GCAGCGGCACCGACTTCACC TTCACCATCAGCAGCCTGCA GCGGAGGACATCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTAC ACCACCCCTCTGACCTTCGG CCAGGGCACCAAGCTGGAG ATCAAGAGAACCGTGGCCG CTCCCTCCGTGTTTCATCTCC CACCATCTGACGAGCAGCTG AAGTCCGGCACCGCTTCTGT CGTGTGCCTGCTGAACA ACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAG GTGCAGTGGAAGGTGGACA ATGCCCTGCAGTCCGGCAAC

			TCCCAAGAGTCTGTGACCGA GCAGGACTCCAAGGACAGC ACCTACTCCCTGTCCTCTAC CCTGACCCTGTCCAAGGCCG ACTACGAGAAGCACAAGGT GTACGCCTGCGAAGTGACCC ACCAGGGACTGTCTAGCCCC GTGACCAAGTCCTTCAACAG AGGCGAGTGCTGA (205)
ABLPNB.02 (биспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 H12 клон в форме IgG и анти-4-1BB 41B01.03 клон в форме scFv)			
		Аминокислотная последовательность (N'→C') (Seq ID No.)	Нуклеотидная последовательность (5'→3') (Seq ID No.)
Тяжелый компонент	Тяжелая цепь H12	EVQLVESGGGLVQ PGGSRLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQ APGKSLEWVATIS DAGGYIYSDSVK GRFTISRDNKNS LYLQMNSLRDEDT AVYICARE FGKRY ALDYWGQGT TVT VSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC DKHTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPK	GAGGTGCAGCTGGTGGAGA GCGGAGGAGGACTGGTGCA ACCCGGAGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCTGCCAGCGG CTTCACCTTCAGCAGCTACG ACATGAGCTGGGTGAGACA GGCCCCCTGGCAAAAGCCTGG AGTGGGTGGCCACCATCTCC GATGCGGGCGGCTACATCTA TTA CTCCGACAGCGTGAAGG GCAGGTTCACCATCAGCAGG GACAACGCCAAGAACAGCC TGTACCTGCAGATGAACAGC CTGAGGGATGAGGACACCG CCGTGTACATCTGCGCCAGG GAGTTCGGCAAAAGGTACG CCCTGGACTACTGGGGCCAG GGCACAACCGTGACCGTGA GCAGC _{gct} AgcAccAAgGGCCC

			DTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKF NWKYVDGVEVHNA KTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVS NKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSL SLSPGK (206)	CTCTGTGTTCCCTCTGGCCCC TTCCTCTAAATCCACCTCTG GCGGAACCGCTGCTCTGGGC TGTCTGGTCAAGGACTACTT CCCTGAGCCCGTGACCGTGT CTTGGAATTCTGGCGCTCTG ACCAGCGGAGTGCACACCTT TCCAGCTGTGCTGCAGTCCT CCGGCCTGTACTCTCTGTCC TCTGTCTGTGACAGTGCCTTC CAGCTCTCTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAAC CACAAGCCCTCCAACACCAA GGTGGACAAGAAGGTGGAA CCCAAGTCCTGCGACAAGAC CCACACCTGTCCTCCATGTC
	Линкер		GGGGSGGGGSGG GGG (207)	CTGCTCCAGAACTGCTGGGC GGACCCTCCGTGTTCTCTGTT
	scFv 41B01 .03	VL	QSVLTQPPSASGTP GQRTVISC SGSSN IGNNYVTWYQQL PGTAPKLLIY ADS HRPSGVPDRFSGS KSGTASLAISGLR SEDEADYYC ATW DYSLSGYVFGCGT KLTVL (208)	CCCTCCAAAGCCTAAGGACA CCCTGATGATCTCCCGGACC CCTGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCACGAGG ATCCAGAAGTGAAGTTCAAT TGGTACGTGGACGGCGTGGA AGTGCACAATGCCAAGACC AAGCCTAGAGAGGAACAGT ACGCCTCCACCTACAGAGTG
	Линкер		GGGGSGGGGSGG GGSGGGGS (209)	GTGTCCGTGCTGACTGTGCT GCACCAGGATTGGCTGAACG
		VH	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQ APGKCLEWVSW IS YSGGSIYYADSVK	GCAAAGAGTACAAGTGCAA GGTGTCCAACAAGGCCCTGC CTGCTCCTATCGAAAAGACC ATCAGCAAGGCCAAGGGCC AGCCTAGGGAACCCAGGTT TACACCCTGCCTCCAAGCCG

		GRFTISRDN SKNTL YLMNSLRAEDTA VYYCARDAQRNS MREFDYWGQGTL VTVSS (210)	GGAAGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGACCTGCCT CGTGAAGGGCTTCTACCCCTT CCGATATCGCCGTGGAATGG GAGAGCAATGGCCAGCCTG AGAACAAC TACAAGACAAC CCCTCCTGTGCTGGACTCCG ACGGCTCATTCTTCCTGTAC TCCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCAGATGGCAGCAGGGC AACGTGTTCTCCTGCTCCGT GATGCACGAGGCCCTGCACA ATCACTACACCCAGAAGTCC CTGTCTCTGAGCCCTGGA AGGCGGCGGAGGATCTGGC GGAGGTGGTAGCGGAGGCG GTGGATCTCAGTCTGTTCTG ACCCAGCCTCCTTCCGCTTC TGGCACCCCTGGAcAGAGAG TGACCATCTCTTGCTCCGGC TCCTCCTCCAACATCGGCAA CAACTACGTGACCTGGTATC AGCAGCTGCCCCGGCACAGCT CCCAAAC TGTGATCTACGC CGACTCTCACAGACCTTCCG GCGTGCCCGATAGATTCTCC GGCTCTAAGTCTGGCACCTC TGCCAGCCTGGCTATCAGCG GCCTGAGATCTGAGGACGA GGCCGACTACTACTGCGCCA CCTGGGATTATTCCTGTCC GGCTACGTGTTCCGGCTGCGG CACAAAAC TACAGTGCTCG GAGGCGGAGGAAGTGGTGG CGGAGGTT CAGGTGGTGGTG
--	--	---	---

			GTAGTGGCGGAGGCGGATC AGAAGTTCAGCTGTTGGAGT CAGGTGGCGGCTTGGTGCAA CCAGGTGGAAGTCTGAGACT CAGCTGTGCTGCCAGCGGCT TTACCTTCAGCTCCTACGAC ATGAGCTGGGTTGACAAGC TCCCGGAAAGTGCTTGGAGT GGGTTTCCTGGATCTCCTAC TCCGGCGGCAGCATCTATTA CGCCGACAGCGTGAAAGGC CGGTTTACCATCTCTCGGGA TAACAGCAAGAATACCCTCT ACCTCCAAATGAACTCTCTG AGAGCCGAGGACACTGCTGT GTACTATTGCGCCAGAGATG ccCAGCGGAACTCCATGAGA GAGTTCGACTACTGGGGACA AGGCACCCTGGTCACCGTGT CTAGTTGA (211)
Легкий компонент	Легкая цепь H12	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITITCKASQ DVT PA VAWYQQK PGKAPKLLIY ST SS RYTGVPSRFSGSG SGTDFTFITISLQPE DIATYYC QQHY TT PLTFGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTH	GACATCCAGATGACCCAGA GCCCTAGCAGCCTGAGCGCT AGCGTGGGCGACAGGGTGA CCATCACCTGCAAGGCCAGC CAGGATGTGACCCCTGCCGT GGCCTGGTACCAGCAGAAG CCCGGCAAGGCCCCCAAGCT GCTGATCTACAGCACCAGCA GCAGGTACACCGGCGTGCCC AGCAGGTTTAGCGGAAGCG GCAGCGGCACCGACTTCACC TTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCCAGGACATCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTAC ACCACCCCTCTGACCTTCGG

		QGLSSPVTKSFNR GEC (30)	CCAGGGCACCAAGCTGGAG ATCAAGAGAACCGTGGCCG CTCCCTCCGTGTTTCATCTTCC CACCATCTGACGAGCAGCTG AAGTCCGGCACCGCTTCTGT CGTGTGCCTGCTGAACAAC TCTACCCTCGGGAAGCCAAG GTGCAGTGGAAGGTGGACA ATGCCCTGCAGTCCGGCAAC TCCCAAGAGTCTGTGACCGA GCAGGACTCCAAGGACAGC ACCTACTCCCTGTCCTCTAC CCTGACCCTGTCCAAGGCCG ACTACGAGAAGCACAAGGT GTACGCCTGCGAAGTGACCC ACCAGGGACTGTCTAGCCCC GTGACCAAGTCCTTCAACAG AGGCGAGTGCTGA (212)
ABLPNB.03 (биспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 H12 клон в форме IgG и анит-4-1BB 41B02 клон в форме scFv)			
		Аминокислотная последовательность (N'→C') (Seq ID No.)	Нуклеотидная последовательность (5'→3') (Seq ID No.)
Тяжелый компонент	Тяжелая цепь H12	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQ APGKSLEWVATIS DAGGYIYYSDSVK GRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRDEDT AVYICAREFGKRY ALDYWGQGT TVT VSSASTKGPSVFPL	GAGGTGCAGCTGGTGGAGA GCGGAGGAGGACTGGTGCA ACCCGGAGGCAGCCTGAGA CTGAGCTGCGCTGCCAGCGG CTTCACCTTCAGCAGCTACG ACATGAGCTGGGTGAGACA GGCCCCTGCGAAAAGCCTGG AGTGGGTGGCCACCATCTCC GATGCGGGCGGCTACATCTA TTACTCCGACAGCGTGAAGG

			APSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPK DTLNISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNA KTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDS FFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSL SLSPGK (213)	GCAGGTTACCATCAGCAGG GACAACGCCAAGAACAGCC TGTACCTGCAGATGAACAGC CTGAGGGATGAGGACACCG CCGTGTACATCTGCGCCAGG GAGTTCGGCAAAAGGTACG CCCTGGACTACTGGGGCCAG GGCACAACCGTGACCGTGA GCAGC _{gct} AgcAccAAgGGCCC CTCTGTGTTCCCTCTGGCCCC TTCCTCTAAATCCACCTCTG GCGGAACCGCTGCTCTGGGC TGTCTGGTCAAGGACTACTT CCCTGAGCCCGTGACCGTGT CTTGGAATTCTGGCGCTCTG ACCAGCGGAGTGCACACCTT TCCAGCTGTGCTGCAGTCCT CCGGCCTGTACTCTCTGTCC TCTGTCGTGACAGTGCCTTC CAGCTCTCTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAAC CACAAGCCCTCCAACACCAA GGTGGACAAGAAGGTGGAA CCCAAGTCCTGCGACAAGAC CCACACCTGTCTCCATGTC
	Линкер		GGGGSGGGGSGG GGS (214)	CTGCTCCAGAACTGCTGGGC GGACCCTCCGTGTTCTCTGTT
	scFv 41B02	VL	QSVLTQPPSASGTP GRRVTISCSGSSSN IGNNYVTWYQQL PGTAPKLLIYADS HRPSGVPDRFSGS KSGTSASLAISGLR SEDEADYYCATW	CCCTCCAAAGCCTAAGGACA CCCTGATGATCTCCCGGACC CCTGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCCCACGAGG ATCCCGAAGTGAAGTTCAAT TGGTACGTGGACGGCGTGGA AGTGCACAACGCCAAGACC

			DYSLSGYVFGCGT KLTVL (215)	AAGCCTAGAGAGGAACAGT ACgccTCCACCTACCGGGTGG
		Линкер	GGGSGGGGSGG GGSGGGGS (216)	TGTCCGTGCTGACCGTTCTG CACCAGGATTGGCTGAACGG
		VH	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFS GYDMS WVR QAPGKCLEWVS VI YPDDGNTYYADS VKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAE DAAVYYCAK HGG QKPTTKSSSAYG MDGWGQGTLVTV SS (217)	CAAAGAGTACAAGTGCAAG GTGTCCAACAAGGCCCTGCC TGCCCTATCGAAAAGACCA TCTCTAAGGCCAAGGGCCAG CCCCGGGAACCTCAAGTGTA CACCTTGCCTCCCAGCCGGG AAGAGATGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGACCTGCCTGG TTAAGGGCTTCTACCCCTCC GATATCGCCGTGGAATGGGA GTCTAACGGCCAGCCGAGA ACAACCTACAAGACCACCCCT CCTGTGCTGGACTCCGACGG CTCATTCTTCCTGTACTCCAA GCTGACCGTGGACAAGTCTC GGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTCTCCTGCTCTGTGATGC ACGAGGCCCTGCACAACCAC TACACCCAGAAGTCCCTGTC CCTGTCTCCCGGCAAAGGTG GGGGGGGATCTGGTGGTGGT GGATCAGGGGGTGGGGGGT CTCAAAGCGTACTACCCAA CCTCCATCTGCATCCGGTAC ACCTGGTCGGCGAGTAACCA TCTCCTGCTCTGGGAGCTCT TCTAATATTGGTAACAACCTA TGTCACCTGGTATCAGCAGT TGCCTGGGACAGCACCCAAA CTTCTTATATATGCCGATAG CCATCGGCCTTCCGGCGTAC

			CCGATCGCTTCTCCGGGTCA AAATCTGGAACATCTGCCTC ACTCGCAATTAGTGGATTGC GATCTGAGGATGAAGCAGA TTATTATTGCGCTACCTGGG ATTATTCACTTTCTGGCTAC GTCTTTGGTtgtGGAACAAAA CTTACCGTGTTGGGCGGCGG AGGAAGCGGAGGCGGCGGT TCTGGTGGTGGCGGTAGCGG AGGTGGTGGATCTGAGGTTC AACTGTTGGAGTCAGGTGGC GGACTTGTCCAGCCTGGCGG GTCTCTGAGGCTGAGTTGCG CTGCTTCTGGGTTTACTTTT CAGGATATGACATGAGTTGG GTACGTCAGGCTCCAGGTAA GtgcCTCGAATGGGTCTCCGT TATCTATCCCGATGATGGAA ATACTTACTACGCTGACAGT GTGAAAGGCAGGTTCACAAT CAGTAGGGACAATTCTAAAA ATACACTCTACCTCCAGATG AACTCACTTCGAGCCGAGGA CGCCGCCGTATATTACTGTG CCAAACACGGCGGGCAAAA ACCCACTACTAAATCCAGTA GTGCTTACGGGATGGATGGC TGGGGACAGGGGACATTGG TCACTGTATCTTCCtga (218)
Легкий компонент	Легкая цепь H12	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITITCKASQ DVTPAVAWYQQK PGKAPKLLIYSTSS RYTGVPSTRFSGSG	GACATCCAGATGACCCAGA GCCCTAGCAGCCTGAGCGCT AGCGTGGGCGACAGGGTGA CCATCACCTGCAAGGCCAGC CAGGATGTGACCCCTGCCGT

		SGTDFTFITISLQPE DIATYYC QQHYTT PLTFGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNR GEC (32)	GGCCTGGTACCAGCAGAAG CCCGGCAAGGCCCAAGCT GCTGATCTACAGCACCAGCA GCAGGTACACCGGCGTGCCC AGCAGGTTTAGCGGAAGCG GCAGCGGCACCGACTTCACC TTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCCGAGGACATCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTAC ACCACCCCTCTGACCTTCGG CCAGGGCACCAAGCTGGAG ATCAAGAGAACCGTGGCCG CTCCCTCCGTGTTTCATCTTCC CACCATCTGACGAGCAGCTG AAGTCCGGCACCGCTTCTGT CGTGTGCCTGCTGAACAAC TCTACCCCTCGGAAGCCAAG GTGCAGTGGAAGGTGGACA ATGCCCTGCAGTCCGGCAAC TCCCAAGAGTCTGTGACCGA GCAGGACTCCAAGGACAGC ACCTACTCCCTGTCCTCTAC CCTGACCCTGTCCAAGGCCG ACTACGAGAAGCACAAAGGT GTACGCCTGCGAAGTGACCC ACCAGGGACTGTCTAGCCCC GTGACCAAGTCCTTCAACAG AGGCGAGTGCTGA (219)
ABLPNB.04 (биспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 B6 клон в форме IgG и анти-4-1BB 41B01 клон в форме scFv)			
		Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность (5'→3') (Seq ID No.)

			(N'→C') (Seq ID No.)	
Тяжелый компонент	Тяжелая цепь B6		EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQ APGKSLEWVATIS DAGGYIYYRDSV KGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRDED TAVYICARE LPWR YALDY WGQGTTV TVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVM	GAAGTGCAGCTGGTTGAATC TGGCGGCGGATTGGTTCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTG TCTTGTGCCGCCTCCGGCTT CACCTTCTCCAGCTACGATA TGTCTGGGTCCGACAGGCC CCTGGCAAGTCTTTGGAATG GGTCGCCACCATCTCTGACG CTGGCGGCTACATCTACTAC CGGGACTCTGTGAAGGGCA GATTCACCATCAGCCGGGAC AACGCCAAGAACTCCCTGTA CCTGCAGATGAACAGCCTGC GCGACGAGGATACCGCCGT GTACATCTGTGCTAGAGAGC TGCCTTGAGATACGCCCTG GATTATTGGGGCCAGGGCAC CACAGTGACCGTGTCTCTG CTTCTACCAAGGGACCCAGC GTGTCCCTCTGGCTCCTTCC AGCAAGTCTACCTCTGGCGG AACAGCTGCTCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTTCCT GAGCCTGTGACAGTGTCTG GAACTCTGGCGCTCTGACAT CTGGCGTGACACCTTTCCA GCAGTGCTGCAGTCTCCGG CCTGTACTCTCTGCTCTGT CGTGACCGTGCCTTCCAGCT CTCTGGGAACCCAGACCTAC ATCTGCAATGTGAACCACAA GCCTTCCAACACCAAGGTGG ACAAGAAGGTGGAACCCAA

			HEALHNHYTQKSL SLSPGK (220)	GTCCTGCGACAAGACCCACA CCTGTCTCCATGTCCTGCTC
	Линкер		GGGSGGGSGG GGG (221)	CAGAACTGCTCGGCGGACCT TCCGTGTTCTGTTTCCTCCA
	scFv 41B01	VL	QSVLTQPPSASGTP GRRVTISCSGSSN IGNNYVTWYQQL PGTAPKLLIY ADS HRPS GVPDFSGS KSGTSASLAISGLR SEDEADYY CATW DYSLSGYV FGCGT KLTVL (222)	AAGCCTAAGGACACCCTGAT GATCTCTCGGACCCCTGAAG TGACCTGCGTGTTGGTGAT GTGTCCACGAGGATCCAGA AGTGAAGTTCAATTGGTACG TGGACGGCGTGGAAGTGCA CAATGCCAAGACCAAGCCTA GAGAGGAACAGTACGCCTC CACCTACAGAGTGGTGTCG
	Линкер		GGGSGGGSGG GGSGGGG (223)	TGCTGACTGTGCTGCCACAG GATTGGCTGAACGGCAAAG
	VH		EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSS YDMS WVRQ APGKCLEWV SWIS YSGS IYY ADSVK GRFT ISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTA VYYCARD GQRNS MREFDY WGQGT VTVSS (224)	AGTACAAGTGCAAGGTGTCC AACAAGGCCCTGCCTGCTCC TATCGAAAAGACCATCAGCA AGGCCAAGGGCCAGCCTAG GGAACCCAGGTTTACACCC TGCCTCCAAGCCGGGAAGA GATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGACCTGCCTCGTGAA GGGCTTCTACCCTTCCGATA TCGCCGTGGAATGGGAGAG CAATGGCCAGCCTGAGAAC AACTACAAGACAACCCCTCC TGTGCTGGACTCCGACGGCT CATTCTTCCTGTACTCCAAG CTGACCGTGGACAAGTCCAG ATGGCAGCAGGGCAACGTG TTCTCTGCTCCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAATCACT ACACCCAGAAGTCCCTGTCT CTGAGCCCTGGAAGGCG

				GCGGAGGATCTGGCGGAGG TGGTAGCGGAGGCGGTGGA TCTCAGTCTGTTCTGACCCA GCCTCCTTCCGCTTCTGGCA CCCCTGGAAGAAGAGTGAC CATCTCTTGCTCCGGCTCCTC CTCCAACATCGGCAACAAC ACGTGACCTGGTATCAGCAG CTGCCCCGGCACAGCTCCCAA ACTGCTGATCTACGCCGACT CTCACAGACCTTCCGGCGTG CCCGATAGATTCTCCGGCTC TAAGTCTGGCACCTCTGCCA GCCTGGCTATCAGCGGCCTG AGATCTGAGGACGAGGCCG ACTACTACTGCGCCACCTGG GATTATTCCTGTCCGGCTA CGTGTTCCGGCTGCGGCACAA AACTGACAGTGCTCGGAGGC GGAGGAAGTGGTGGCGGAG GTTCAGGTGGTGGTGGTAGT GGCGGAGGCGGATCAGAAG TTCAGCTGTTGGAGTCAGGT GGCGGCTTGGTGCAACCAGG TGGAAGTCTGAGACTCAGCT GTGCTGCCAGCGGCTTTACC TTCAGCTCCTACGACATGAG CTGGGTTCGACAAGCTCCCG GAAAGTGCTTGGAGTGGGTT TCCTGGATCTCCTACTCCGG CGGCAGCATCTATTACGCCG ACAGCGTGAAAGGCCGGTTT ACCATCTCTCGGGATAACAG CAAGAATACCCTTACCTCC AAATGAACTCTCTGAGAGCC
--	--	--	--	--

			GAGGACACTGCTGTGTACTA TTGCGCCAGAGATGGCCAGC GGAAGTCCATGAGAGAGTTC GACTACTGGGGACAAGGCA CCCTGGTCACCGTGTCTAGT TGA (225)
Легкий компонент	Легкая цепь B6	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITITCKASQ DVTPAVAWYQQK PGKAPKLLIYSTSS RYTGVPSRFSGSG SGTDFTFTISSLQPE DIATYYCQQHYTT PLTFGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDST YSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNR GEC (34)	GACATCCAGATGACCCAGA GCCCTAGCAGCCTGAGCGCT AGCGTGGGCGACAGGGTGA CCATCACCTGCAAGGCCAGC CAGGATGTGACCCCTGCCGT GGCCTGGTACCAGCAGAAG CCCGGCAAGGCCCCCAAGCT GCTGATCTACAGCACCAGCA GCAGGTACACCGGCGTGCC AGCAGGTTTAGCGGAAGCG GCAGCGGCACCGACTTCACC TTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCCAGGACATCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTAC ACCACCCCTCTGACCTTCGG CCAGGGCACCAAGCTGGAG ATCAAGAGAACCGTGGCCG CTCCCTCCGTGTTTCATCTCC CACCATCTGACGAGCAGCTG AAGTCCGGCACCGCTTCTGT CGTGTGCCTGCTGAACAAC TCTACCCTCGGGAAGCCAAG GTGCAGTGGAAGGTGGACA ATGCCCTGCAGTCCGGCAAC TCCAAGAGTCTGTGACCGA GCAGGACTCCAAGGACAGC ACCTACTCCCTGTCCTTAC CCTGACCCTGTCCAAGGCCG ACTACGAGAAGCACAAGGT

			GTACGCCTGCGAAGTGACCC ACCAGGGACTGTCTAGCCCC GTGACCAAGTCCTTCAACAG AGGCGAGTGCTGA (226)
ABLPNB.05 (биспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 B6 клон в форме IgG и анти-4-1BB 41B01.01 клон в форме scFv)			
		Аминокислотная последовательность (N'→C') (Seq ID No.)	Нуклеотидная последовательность (5'→3') (Seq ID No.)
Тяжелый компонент	Тяжелая цепь B6	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQ APGKSLEWVATIS DAGGYIYYRDSV KGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRDED TAVYICARELPWR YALDYWGQGTTV TVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQ	GAAGTGCAGCTGGTTGAATC TGGCGGCGGATTGGTTCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTG TCTTGTGCCGCCTCCGGCTT CACCTTCTCCAGCTACGATA TGTCTGGGTCCGACAGGCC CCTGGCAAGTCTTTGGAATG GGTCGCCACCATCTCTGACG CTGGCGGCTACATCTACTAC CGGGACTCTGTGAAGGGCA GATTCACCATCAGCCGGGAC AACGCCAAGAACTCCCTGTA CCTGCAGATGAACAGCCTGC GCGACGAGGATAACCGCCGT GTACATCTGTGCTAGAGAGC TGCCTTGGAGATACGCCCTG GATTATTGGGGCCAGGGCAC CACAGTGACCGTGTCTCTG CTTCTACCAAGGGACCCAGC GTGTTCCCTCTGGCTCCTTCC AGCAAGTCTACCTCTGGCGG AACAGCTGCTCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTTCCT GAGCCTGTGACAGTGTCTCTG

			DWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDS DG SFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSL SLSPGK (227)	GAACTCTGGCGCTCTGACAT CTGGCGTGCACACCTTTCCA GCAGTGCTGCAGTCCTCCGG CCTGTACTCTCTGTCCTCTGT CGTGACCGTGCCTTCCAGCT CTCTGGGAACCCAGACCTAC ATCTGCAATGTGAACCACAA GCCTTCCAACACCAAGGTGG ACAAGAAGGTGGAACCCAA GTCCTGCGACAAGACCCACA CCTGTCCTCCATGTCCTGCTC
	Линкер		GGGSGGGGSGG GGG (228)	CAGAACTGCTCGGCGGACCT TCCGTGTTCTGTTTCTCCA
	scFv 41B01 .01	VL	QSVLTQPPSASGTP GRRVTISCSGSSSN IGNNYVTWYQQL PGTAPKLLIY ADS HRPS GVPDFRSGS KSGTSASLAISGLR SEDEADYYCAT W DYSLSGYV FGCGT KLTVL (229)	AAGCCTAAGGACACCCTGAT GATCTCTCGGACCCCTGAAG TGACCTGCGTGGTGGTGGAT GTGTCCACGAGGATCCAGA AGTGAAGTTCAATTGGTACG TGGACGGCGTGGAAGTGCA CAATGCCAAGACCAAGCCTA GAGAGGAACAGTACGCCTC CACCTACAGAGTGGTGTCGG
	Линкер		GGGSGGGGSGG GGSGGGGS (230)	TGCTGACTGTGCTGCACCAG GATTGGCTGAACGGCAAAG
		VH	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQ APGKCLEWV SWIS YSGGSIYYADSVK GRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTA VYYCARD AQRNS MREFDYWGQ GT LVTSS (231)	AGTACAAGTGCAAGGTGTCC AACAAGGCCCTGCCTGCTCC TATCGAAAAGACCATCAGCA AGGCCAAGGGCCAGCCTAG GGAACCCAGGTTTACACCC TGCCTCCAAGCCGGAAGA GATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGACCTGCCTCGTGAA GGGCTTCTACCCTTCCGATA TCGCCGTGGAATGGGAGAG CAATGGCCAGCCTGAGAAC

				AACTACAAGACAACCCCTCC TGTGCTGGACTCCGACGGCT CATTCTTCCTGTACTCCAAG CTGACCGTGGACAAGTCCAG ATGGCAGCAGGGCAACGTG TTCTCCTGCTCCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAATCACT ACACCCAGAAGTCCCTGTCT CTGAGCCCTGGAAAAGGCG GCGGAGGATCTGGCGGAGG TGGTAGCGGAGGCGGTGGA TCTCAGTCTGTTCTGACCCA GCCTCCTTCCGCTTCTGGCA CCCCTGGAAGAAGAGTGAC CATCTCTTGCTCCGGCTCCTC CTCCAACATCGGCAACAAC ACGTGACCTGGTATCAGCAG CTGCCCCGGCACAGCTCCCAA ACTGCTGATCTACGCCGACT CTCACAGACCTTCCGGCGTG CCCGATAGATTCTCCGGCTC TAAGTCTGGCACCTCTGCCA GCCTGGCTATCAGCGGCCTG AGATCTGAGGACGAGGCCG ACTACTACTGCGCCACCTGG GATTATTCCCTGTCCGGCTA CGTGTTCCGGCTGCGGCACAA AACTGACAGTGCTCGGAGGC GGAGGAAGTGGTGGCGGAG GTTCAAGTGGTGGTGGTAGT GGCGGAGGCGGATCAGAAG TTCAGCTGTTGGAGTCAGGT GGCGGCTTGGTGCAACCAGG TGGAAGTCTGAGACTCAGCT GTGCTGCCAGCGGCTTTACC
--	--	--	--	--

			TTCAGCTCCTACGACATGAG CTGGGTTCGACAAGCTCCCG GAAAGTGCTTGGAGTGGGTT TCCTGGATCTCCTACTCCGG CGGCAGCATCTATTACGCCG ACAGCGTGAAAGGCCGGTTT ACCATCTCTCGGGATAACAG CAAGAATACCCTCTACCTCC AAATGAACTCTCTGAGAGCC GAGGACACTGCTGTGTACTA TTGCGCCAGAGATG_{cc}CAGC GGA_{ACT}CCATGAGAGAGTTC GACTACTGGGGACAAGGCA CCCTGGTCACCGTGTCTAGT TGA (232)
Легкий компонент	Легкая цепь B6	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITITKASQ DVTPAVAWYQK PGKAPKLLIYSTSS RYTGVPSRFSGS SGTDFTFITISLQPE DIATYYCQQHYTT PLTFGQGTKLEIK RTV_{AA}PSVFIFPPS DEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNR GEC (36)	GACATCCAGATGACCCAGA GCCCTAGCAGCCTGAGCGCT AGCGTGGGCGACAGGGTGA CCATCACCTGCAAGGCCAGC CAGGATGTGACCCCTGCCGT GGCCTGGTACCAGCAGAAAG CCCGCAAGGCCCCCAAGCT GCTGATCTACAGCACCAGCA GCAGGTACACCGGCGTGCCC AGCAGGTTTAGCGGAAGCG GCAGCGGCACCGACTTCACC TTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCCCGAGGACATCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTAC ACCACCCCTCTGACCTTCGG CCAGGGCACCAAGCTGGAG ATCAAGAGAACCGTGGCCG CTCCCTCCGTGTTTCATCTCC CACCATCTGACGAGCAGCTG AAGTCCGGCACCGCTTCTGT

			CGTGTGCCTGCTGAACAAC TCTACCCTCGGGAAGCCAAG GTGCAGTGGAAGGTGGACA ATGCCCTGCAGTCCGGCAAC TCCCAAGAGTCTGTGACCGA GCAGGACTCCAAGGACAGC ACCTACTCCCTGTCCTCTAC CCTGACCCTGTCCAAGGCCG ACTACGAGAAGCACAAGGT GTACGCCTGCGAAGTGACCC ACCAGGGACTGTCTAGCCCC GTGACCAAGTCCTTCAACAG AGGCGAGTGCTGA (233)
ABLPNB.06 (биспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 B6 клон в форме IgG и анти-4-1BB 41B01.02 клон в форме scFv)			
		Аминокислотная последовательность (N'→C') (Seq ID No.)	Нуклеотидная последовательность (5'→3') (Seq ID No.)
Тяжелый компонент	Тяжелая цепь B6	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQ APGKSLEWVATIS DAGGYIYYRDSV KGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRDED TAVYICARELPWR YALDYWGQ TTV TVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSL	GTGCAGCTGGTTGAATCTGG CGGCGGATTGGTTCAGCCTG GCGGATCTCTGAGACTGTCT TGTGCCGCCTCCGGCTTCAC CTTCTCCAGCTACGATATGT CCTGGGTCCGACAGGCCCT GGCAAGTCTTTGGAATGGGT CGCCACCATCTCTGACGCTG GCGGCTACATCTACTACCGG GACTCTGTGAAGGGCAGATT CACCATCAGCCGGGACAAC GCCAAGAACTCCCTGTACCT GCAGATGAACAGCCTGCGC GACGAGGATACCGCCGTGTA CATCTGTGCTAGAGAGCTGC

			GTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKV SNKALPAIEKTIS KAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDS DG SFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSL SLSPGK (234)	CTTGGAGATACGCCCTGGAT TATTGGGGCCAGGGCACCAC AGTGACCGTGTCTCTGCTT CTACCAAGGGACCCAGCGTG TTCCCTCTGGCTCCTTCCAGC AAGTCTACCTCTGGCGGAAC AGCTGCTCTGGGCTGCCTGG TCAAGGACTACTTTCCTGAG CCTGTGACAGTGTCTGGAA CTCTGGCGCTCTGACATCTG GCGTGACACCTTTCAGCA GTGCTGCAGTCCTCCGGCCT GTACTCTCTGTCTCTGTCTG GACCGTGCCTTCCAGCTCTC TGGGAACCCAGACCTACATC TGCAATGTGAACCACAAGCC TTCCAACACCAAGGTGGACA AGAAGGTGGAACCCAAGTC CTGCGACAAGACCCACACCT GTCTCCATGTCTCTGTCTCA
	Линкер		GGGGSGGGSGG GGG (235)	GAAGTGTCTCGGCGGACCTTC CGTGTTCCTGTTTCCTCCAA
	scFv 41B01 .02	VL	QSVLTQPPSASGTP GRRVTISCSGSSN IGNNYVTWYQQL PGTAPKLLIY ADS HRPSGVPDRFSGS KSGTSASLAISGLR SEDEADYYC ATW DYSLSGYVFGCGT KLTVL (236)	AGCCTAAGGACACCCTGATG ATCTCTCGGACCCCTGAAGT GACCTGCGTGGTGGTGGATG TGTCACGAGGATCCAGAA GTGAAGTTCAATTGGTACGT GGACGGCGTGGAAGTGCAC AATGCCAAGACCAAGCCTA GAGAGGAACAGTACGCCTC CACCTACAGAGTGGTGTCCG
	Линкер		GGGGSGGGSGG GGSGGGGS (237)	TGCTGACTGTGCTGCACCAG GATTGGCTGAACGGCAAAG

		VH	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQ APGKCLEWVSWIS YSGGSIYYADSVK GRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTA VYYCARD AQRQS MREFDYWGQGT VTVSS (238)	AGTACAAGTGCAAGGTGTCC AACAAGGCCCTGCCTGCTCC TATCGAAAAGACCATCAGCA AGGCCAAGGGCCAGCCTAG GGAACCCCAGGTTTACACCC TGCCTCCAAGCCGGGAAGA GATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGACCTGCCTCGTGAA GGGCTTCTACCCTTCCGATA TCGCCGTGGAATGGGAGAG CAATGGCCAGCCTGAGAAC AACTACAAGACAACCCCTCC TGTGCTGGACTCCGACGGCT CATTCTTCCTGTACTCCAAG CTGACCGTGGACAAGTCCAG ATGGCAGCAGGGCAACGTG TTCTCCTGCTCCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAATCACT ACACCCAGAAGTCCCTGTCT CTGAGCCCTGAAAAGGCG GCGGAGGATCTGGCGGAGG TGGTAGCGGAGGCGGTGGA TCTCAGTCTGTTCTGACCCA GCCTCCTTCCGCTTCTGGCA CCCCTGGAAGAAGAGTGAC CATCTCTTGCTCCGGCTCCTC CTCCAACATCGGCAACAAC ACGTGACCTGGTATCAGCAG CTGCCCCGGCACAGCTCCCAA ACTGCTGATCTACGCCGACT CTCACAGACCTTCCGGCGTG CCCGATAGATTCTCCGGCTC TAAGTCTGGCACCTCTGCCA GCCTGGCTATCAGCGGCCTG AGATCTGAGGACGAGGCCG
--	--	----	--	---

			ACTACTACTGCGCCACCTGG GATTATTCCCTGTCCGGCTA CGTGTTCCGGCTGCGGCACAA AACTGACAGTGCTCGGAGGC GGAGGAAGTGGTGGCGGAG GTTCAGGTGGTGGTGGTAGT GGCGGAGGCGGATCAGAAG TTCAGCTGTTGGAGTCAGGT GGCGGCTTGGTGCAACCAGG TGGAAGTCTGAGACTCAGCT GTGCTGCCAGCGGCTTTACC TTCAGCTCCTACGACATGAG CTGGGTTCGACAAGCTCCCG GAAAGTGCTTGGAGTGGGTT TCCTGGATCTCCTACTCCGG CGGCAGCATCTATTACGCCG ACAGCGTGAAAGGCCGGTTT ACCATCTCTCGGGATAACAG CAAGAATACCCTCTACCTCC AAATGAACTCTCTGAGAGCC GAGGACACTGCTGTGTACTA TTGCGCCAGAGATG _{cc} CAGC GGCAATCCATGAGAGAGTTC GACTACTGGGGACAAGGCA CCCTGGTCACCGTGTCTAGT TGA (239)
Легкий компонент	Легкая цепь B6	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITIT KASQ DVTPA VAWYQQK PGKAPKLLI YSTSS RYT GVPSRFSGSG SGTDFTFITISLQPE DIATYYC QQHYTT PLT FGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPS	GACATCCAGATGACCCAGA GCCCTAGCAGCCTGAGCGCT AGCGTGGGCGACAGGGTGA CCATCACCTGCAAGGCCAGC CAGGATGTGACCCCTGCCGT GGCCTGGTACCAGCAGAAAG CCCGGCAAGGCCCAAGCT GCTGATCTACAGACCAGCA GCAGGTACACCGGCGTGCCC

		DEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDST YSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTH QGLSPVTKSFNR GEC (38)	AGCAGGTTTAGCGGAAGCG GCAGCGGCACCGACTTCACC TTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCCGAGGACATCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTAC ACCACCCCTCTGACCTTCGG CCAGGGCACCAAGCTGGAG ATCAAGAGAACCGTGGCCG CTCCCTCCGTGTTTCATCTCC CACCATCTGACGAGCAGCTG AAGTCCGGCACCGCTTCTGT CGTGTGCCTGCTGAACAAC TCTACCCTCGGGAAGCCAAG GTGCAGTGGAAGGTGGACA ATGCCCTGCAGTCCGGCAAC TCCCAAGAGTCTGTGACCGA GCAGGACTCCAAGGACAGC ACCTACTCCCTGTCCTCTAC CCTGACCCCTGTCCAAGGCCG ACTACGAGAAGCACAAGGT GTACGCCTGCGAAGTGACCC ACCAGGGACTGTCTAGCCCC GTGACCAAGTCCTTCAACAG AGGCGAGTGCTGA (240)
ABLPNB.07 (биспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 B6 клон в форме IgG и анти-4-1BB 41B01.03 клон в форме scFv)			
		Аминокислотная последовательность (N'→C') (Seq ID No.)	Нуклеотидная последовательность (5'→3') (Seq ID No.)
Тяжелый компонент	Тяжелая цепь B6	EVQLVESGGGLVQ PGGSRLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQ APGKSLEWVATIS	GAAGTGCAGCTGGTTGAATC TGGCGGCGGATTGGTTCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTG TCTTGTGCCGCCTCCGGCTT

			DAGGYIYRDSV KGRFTISRDN AKN SLYLQMNSLRDED TAVYICARELPWR YALDYWGQ TTV TVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSL SLSPGK (241)	CACCTTCTCCAGCTACGATA TGTCCGTGGGTCCGACAGGCC CCTGGCAAGTCTTTGGAATG GGTCGCCACCATCTCTGACG CTGGCGGCTACATCTACTAC CGGGACTCTGTGAAGGGCA GATTCACCATCAGCCGGGAC AACGCCAAGAAGTCCCTGTA CCTGCAGATGAACAGCCTGC GCGACGAGGATACCGCCGT GTACATCTGTGCTAGAGAGC TGCCTTGGAGATACGCCCTG GATTATTGGGGCCAGGGCAC CACAGTGACCGTGTCTCTG CTTCTACCAAGGGACCCAGC GTGTTCCCTCTGGCTCCTTCC AGCAAGTCTACCTCTGGCGG AACAGCTGCTCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTTCCT GAGCCTGTGACAGTGTCTG GAACTCTGGCGCTCTGACAT CTGGCGTGCACACCTTTCCA GCAGTGCTGCAGTCCTCCGG CCTGTACTCTCTGTCTCTGT CGTGACCGTGCCTTCCAGCT CTCTGGGAACCCAGACCTAC ATCTGCAATGTGAACCACAA GCCTTCCAACACCAAGGTGG ACAAGAAGGTGGAACCCAA GTCCTGCGACAAGACCCACA CCTGTCTCCATGTCCTGCTC CAGAACTGCTCGGCGGACCT TCCGTGTTCTGTTTCCTCCA AAGCCTAAGGACACCCTGAT GATCTCTCGGACCCCTGAAG
	Линкер		GGGGSGGGGSGG GGS (242)	
		VL	QSVLTQPPSASGTP GQRTVISCSSSSN	

scFv 41B01 .03		IGNNYVTWYQQL PGTAPKLLIYADS HRPSGVPDRFSGS KSGTSASLAISGLR SEDEADYYCATW DYSLSGYVFGCGT KLTVL (243)	TGACCTGCGTGGTGGTGGAT GTGTCCCACGAGGATCCAGA AGTGAAGTTCAATTGGTACG TGGACGGCGTGGAAGTGCA CAATGCCAAGACCAAGCCTA GAGAGGAACAGTACGCCTC CACCTACAGAGTGGTGTCGG
	Линкер	GGGSGGGSGG GGSGGGGS (244)	TGCTGACTGTGCTGCACCAG GATTGGCTGAACGGCAAAG
	VH	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQ APGKCLEWVSWIS YSGGSIYYADSVK GRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTA VYYCARD AQRNS MREFDYWGQGT VTVSS (245)	AGTACAAGTGCAAGGTGTCC AACAAGGCCCTGCCTGCTCC TATCGAAAAGACCATCAGCA AGGCCAAGGGCCAGCCTAG GGAACCCAGGTTTACACCC TGCCTCCAAGCCGGAAGA GATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGACCTGCCTCGTGAA GGGCTTCTACCCTTCCGATA TCGCCGTGGAATGGGAGAG CAATGGCCAGCCTGAGAAC AACTACAAGACAACCCCTCC TGTGCTGGACTCCGACGGCT CATTCTTCCTGTACTCCAAG CTGACCGTGGACAAGTCCAG ATGGCAGCAGGGCAACGTG TTCTCCTGCTCCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAATCACT ACACCCAGAAGTCCCTGTCT CTGAGCCCTGAAAAGGCG GCGGAGGATCTGGCGGAGG TGGTAGCGGAGGCGGTGGA TCTCAGTCTGTTCTGACCCA GCCTCCTTCCGCTTCTGGCA CCCCTGGAcAGAGAGTGACC ATCTCTTGCTCCGGCTCCTCC

				TCCAACATCGGCAACAAC TA CGTGACCTGGTATCAGCAGC TGCCCGGCACAGCTCCCAAA CTGCTGATCTACGCCGACTC TCACAGACCTTCCGGCGTGC CCGATAGATTCTCCGGCTCT AAGTCTGGCACCTCTGCCAG CCTGGCTATCAGCGGCCTGA GATCTGAGGACGAGGCCGA CTACTACTGCGCCACCTGGG ATTATTCCTGTCCGGCTAC GTGTTCCGGCTGCGGCACAAA ACTGACAGTGCTCGGAGGCG GAGGAAGTGGTGGCGGAGG TTCAGGTGGTGGTGGTAGTG GCGGAGGCGGATCAGAAGT TCAGCTGTTGGAGTCAGGTG GCGGCTTGGTGCAACCAGGT GGAAGTCTGAGACTCAGCTG TGCTGCCAGCGGCTTTACCT TCAGCTCCTACGACATGAGC TGGGTTGACAAGCTCCCCGG AAAGTGCTTGAGTGGGTTT CCTGGATCTCCTACTCCGGC GGCAGCATCTATTACGCCGA CAGCGTGAAAGGCCGGTTTA CCATCTCTCGGGATAACAGC AAGAATACCCTCTACCTCCA AATGAACTCTCTGAGAGCCG AGGACACTGCTGTGTACTAT TGCGCCAGAGATGcCAGCG GAACTCCATGAGAGAGTTCG ACTACTGGGGACAAGGCAC CCTGGTCACCGTGTCTAGTT GA (246)
--	--	--	--	---

Легкий компонент	Легкая цепь B6	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITITCKASQ DVTPAVAWYQQK PGKAPKLLIYSTSS RYTGVPSTRFSGSG SGTDFTFITISLQPE DIATYYCQQHYTT PLTFGQGKLEIK RTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNS QESVTEQDSKST YLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNR GEC (40)	GACATCCAGATGACCCAGA GCCCTAGCAGCCTGAGCGCT AGCGTGGGCGACAGGGTGA CCATCACCTGCAAGGCCAGC CAGGATGTGACCCCTGCCGT GGCCTGGTACCAGCAGAAG CCCGGCAAGGCCCCCAAGCT GCTGATCTACAGCACCAGCA GCAGGTACACCGGCGTGCCC AGCAGGTTTAGCGGAAGCG GCAGCGGCACCGACTTCACC TTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCCGAGGACATCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTAC ACCACCCCTCTGACCTTCGG CCAGGGCACCAAGCTGGAG ATCAAGAGAACCGTGCCCG CTCCCTCCGTGTTTCATCTCC CACCATCTGACGAGCAGCTG AAGTCCGGCACCGCTTCTGT CGTGTGCCTGCTGAACAAC TCTACCCTCGGGAAGCCAAG GTGCAGTGGAAGGTGGACA ATGCCCTGCAGTCCGGCAAC TCCCAAGAGTCTGTGACCGA GCAGGACTCCAAGGACAGC ACCTACTCCCTGTCCTCTAC CCTGACCCTGTCCAAGGCCG ACTACGAGAAGCACAAGGT GTACGCCTGCGAAGTGACCC ACCAGGGACTGTCTAGCCCC GTGACCAAGTCCTTCAACAG AGGCGAGTGCTGA (247)
ABLPNB.08			

(биспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 B6 клон в форме IgG и анти-4-1BB 41B01.04 клон в форме scFv)			
		Аминокислотная последовательность (N'→C') (Seq ID No.)	Нуклеотидная последовательность (5'→3') (Seq ID No.)
Тяжелый компонент	Тяжелая цепь B6	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQ APGKSLEWVATIS DAGGYIYYRDSV KGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRDED TAVYICARELPWR YALDYWGQGT TVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDI	GAAGTGCAGCTGGTTGAATC TGGCGGCGGATTGGTTCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTG TCTTGTGCCGCCTCCGGCTT CACCTTCTCCAGCTACGATA TGTCTGGGTCCGACAGGCC CCTGGCAAGTCTTTGGAATG GGTCGCCACCATCTCTGACG CTGGCGGCTACATCTACTAC CGGGACTCTGTGAAGGGCA GATTCACCATCAGCCGGGAC AACGCCAAGAACTCCCTGTA CCTGCAGATGAACAGCCTGC GCGACGAGGATACCGCCGT GTACATCTGTGCTAGAGAGC TGCCTTGAGATACGCCCTG GATTATTGGGGCCAGGGCAC CACAGTGACCGTGTCTCTG CTTCTACCAAGGGACCCAGC GTGTCCCTCTGGCTCCTTCC AGCAAGTCTACCTCTGGCGG AACAGCTGCTCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTTCCT GAGCCTGTGACAGTGTCTG GAACTCTGGCGCTCTGACAT CTGGCGTGACACCTTTCCA GCAGTGCTGCAGTCCTCCGG CCTGTACTCTCTGTCTCTGT CGTGACCGTGCCTTCCAGCT

			AVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSL SLSPGK (248)	CTCTGGGAACCCAGACCTAC ATCTGCAATGTGAACCACAA GCCTTCCAACACCAAGGTGG ACAAGAAGGTGGAACCCAA GTCCTGCGACAAGACCCACA CCTGTCCTCCATGTCCTGCTC
	Линкер		GGGSGGGGSGG GGG (249)	CAGAACTGCTCGGCGGACCT TCCGTGTTCTGTTTCCTCCA
	scFv 41B01 .04	VL	QSVLTQPPSASGTP GQRTVISC SGSSN IGNNYVTWYQQL PGTAPKLLIY ADS HRPSGVPDRFSGS KSGTSASLAISGLR SEDEADYY CATW DYSLSGYVFGCGT KLTVL (250)	AAGCCTAAGGACACCCTGAT GATCTCTCGGACCCCTGAAG TGACCTGCGTGGTGGTGGAT GTGTCCACGAGGATCCAGA AGTGAAGTTCAATTGGTACG TGGACGGCGTGGAAGTGCA CAATGCCAAGACCAAGCCTA GAGAGGAACAGTACGCCTC CACCTACAGAGTGGTGTCGG
	Линкер		GGGSGGGGSGG GGSGGGGS (251)	TGCTGACTGTGCTGCACCAG GATTGGCTGAACGGCAAAG
		VH	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSS YDMSWVRQ APGKCLEWV SWIS YSGSIIYADSVK GRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTA VYYCARD AQRQS MREFDYWGQGT VTVSS (252)	AGTACAAGTGCAAGGTGTCC AACAAGGCCCTGCCTGCTCC TATCGAAAAGACCATCAGCA AGGCCAAGGGCCAGCCTAG GGAACCCAGGTTACACCC TGCCTCCAAGCCGGAAGA GATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGACCTGCCTCGTGAA GGGCTTCTACCCTTCCGATA TCGCCGTGGAATGGGAGAG CAATGGCCAGCCTGAGAAC AACTACAAGACAACCCCTCC TGTGCTGGACTCCGACGGCT CATCTTCTGTACTCCAAG CTGACCGTGGACAAGTCCAG ATGGCAGCAGGGCAACGTG

				TTCTCCTGCTCCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAATCACT ACACCCAGAAGTCCCTGTCT CTGAGCCCTGGAAAAGGCG GCGGAGGATCTGGCGGAGG TGGTAGCGGAGGCGGTGGA TCTCAGTCTGTTCTGACCCA GCCTCCTTCCGCTTCTGGCA CCCCTGGAcAGAGAGTGACC ATCTCTTGCTCCGGCTCCTCC TCCAACATCGGCAACAATA CGTGACCTGGTATCAGCAGC TGCCCGGCACAGCTCCAAA CTGCTGATCTACGCCGACTC TCACAGACCTTCCGGCGTGC CCGATAGATTCTCCGGCTCT AAGTCTGGCACCTCTGCCAG CCTGGCTATCAGCGGCCTGA GATCTGAGGACGAGGCCGA CTACTACTGCGCCACCTGGG ATTATTCCTGTCCGGCTAC GTGTTCCGGCTGCGGCACAAA ACTGACAGTGCTCGGAGGCG GAGGAAGTGGTGGCGGAGG TTCAGGTGGTGGTGGTAGTG GCGGAGGCGGATCAGAAGT TCAGCTGTTGGAGTCAGGTG GCGGCTTGGTGCAACCAGGT GGAAGTCTGAGACTCAGCTG TGCTGCCAGCGGCTTTACCT TCAGCTCCTACGACATGAGC TGGGTTGACAAGCTCCCGG AAAGTGCTTGGAGTGGGTTT CCTGGATCTCCTACTCCGGC GGCAGCATCTATTACGCCGA
--	--	--	--	--

				CAGCGTGAAAGGCCGGTTTA CCATCTCTCGGGATAACAGC AAGAATACCCTCTACCTCCA AATGAACTCTCTGAGAGCCG AGGACACTGCTGTGTACTAT TGCGCCAGAGATGccCAGCG GCAATCCATGAGAGAGTTTCG ACTACTGGGGACAAGGCAC CCTGGTCACCGTGTCTAGTT GA (253)
Легкий компонент	Легкая цепь B6	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITIT KASQ DVTP AVAWYQQK PGKAPKLLIY STSS RYT GVPSRFSGSG SGTDFTFTISLQPE DIATYYC QQHYTT PLT FGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNR GEC (42)	GACATCCAGATGACCCAGA GCCCTAGCAGCCTGAGCGCT AGCGTGGGCGACAGGGTGA CCATCACCTGCAAGGCCAGC CAGGATGTGACCCCTGCCGT GGCCTGGTACCAGCAGAAG CCCGCAAGGCCCCCAAGCT GCTGATCTACAGCACCAGCA GCAGGTACACCGGCGTGCCC AGCAGGTTTAGCGGAAGCG GCAGCGGCACCGACTTCACC TTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCCCAGGACATCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTAC ACCACCCCTCTGACCTTCGG CCAGGGCACCAAGCTGGAG ATCAAGAGAACCGTGGCCG CTCCCTCCGTGTTTCATCTCC CACCATCTGACGAGCAGCTG AAGTCCGGCACCGCTTCTGT CGTGTGCCTGCTGAACAAC TCTACCCTCGGGAAGCCAAG GTGCAGTGGAAGGTGGACA ATGCCCTGCAGTCCGGCAAC TCCCAAGAGTCTGTGACCGA	

			GCAGGACTCCAAGGACAGC ACCTACTCCCTGTCCTCTAC CCTGACCCTGTCCAAGGCCG ACTACGAGAAGCACAAGGT GTACGCCTGCGAAGTGACCC ACCAGGGACTGTCTAGCCCC GTGACCAAGTCCTTCAACAG AGGCGAGTGCTGA (254)
ABLPNB.09 (биспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 B6 клон в форме IgG и анти-4-1BB 41B02 клон в форме scFv)			
		Аминокислотная последовательность (N'→C') (Seq ID No.)	Нуклеотидная последовательность (5'→3') (Seq ID No.)
Тяжелый компонент	Тяжелая цепь B6	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSSYDMSWVRQ APGKSLEWVATIS DAGGYIYYRDSV KGRFTISRDAKN SLYLQMNSLRDED TAVYICARELPWR YALDYWGQGTIV TVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKS CDKTHCPCPAP ELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVT	GAAGTGCAGCTGGTTGAATC TGGCGGCGGATTGGTTCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTG TCTTGTGCCGCCTCCGGCTT CACCTTCTCCAGCTACGATA TGTCTGGGTCCGACAGGCC CCTGGCAAGTCTTTGGAATG GGTCGCCACCATCTCTGACG CTGGCGGCTACATCTACTAC CGGGACTCTGTGAAGGGCA GATTCACCATCAGCCGGGAC AACGCCAAGAAGTCCCTGTA CCTGCAGATGAACAGCCTGC GCGACGAGGATACCGCCGT GTACATCTGTGCTAGAGAGC TGCCTTGGAGATACGCCCTG GATTATTGGGGCCAGGGCAC CACAGTGACCGTGTCTCTG CTTCTACCAAGGGACCCAGC GTGTCCCTCTGGCTCCTTCC

			CVVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSL SLSPGK (255)	AGCAAGTCTACCTCTGGCGG AACAGCTGCTCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTTCCT GAGCCTGTGACAGTGTCTG GAACTCTGGCGCTCTGACAT CTGGCGTGACACCTTTCCA GCAGTGCTGCAGTCCTCCGG CCTGTACTCTCTGTCTCTGT CGTGACCGTGCCCTCCAGCT CTCTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAACCACAA GCCCTCCAACACCAAGGTGG ACAAGAAGGTGGAACCCAA GTCCTGCGACAAGACCCACA CCTGTCTCTCCATGTCTGTCTC
	Линкер		GGGGSGGGSGG GGG (256)	CAGAACTGCTGGGCGGACCC TCCGTGTTCTGTTCCTCCA
	scFv 41B02	VL	QSVLTQPPSASGTP GRRVTISCSGSSN IGNNYVTWYQQL PGTAPKLLIY ADS HRPS GVPDFRSGS KSGTSASLAISGLR SEDEADYYCAT W DYSLSGYV FGCGT KLTVL (257)	AAGCCTAAGGACACCCTGAT GATCTCCCGGACCCCTGAAG TGACCTGCGTGGTGGTGGAT GTGTCCACGAGGATCCCGA AGTGAAGTTCAATTGGTACG TGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCT AGAGAGGAACAGTAC _{gcc} TC CACCTACCGGGTGGTGTCCG
		Линкер	GGGGSGGGSGG GGSGGGGS (258)	TGCTGACCGTTCTGCACCAG GATTGGCTGAACGGCAAG
		VH	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFS GYDMS WVR QAPGKCLEWVS VI YPDDGNTYYADS VKGRFTIS RDNSK	AGTACAAGTGCAAGGTGTCC AACAAGGCCCTGCCTGCCCC TATCGAAAAGACCATCTCTA AGGCCAAGGGCCAGCCCCG GGAACCTCAAGTGACACCT TGCCTCCCAGCCGGGAAGAG ATGACCAAGAACCAGGTGTC

		NTLYLQMNSLRAE DAAVYYCAKHGG QKPTTKSSSAYG MDGWGQGTLVTV SS (259)	CCTGACCTGCCTGGTTAAGG GCTTCTACCCCTCCGATATC GCCGTGGAATGGGAGTCTAA CGGCCAGCCCGAGAACAAAC TACAAGACCACCCCTCCTGT GCTGGACTCCGACGGCTCAT TCTTCCTGTACTCCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCTCGGTG GCAGCAGGGCAACGTGTTCT CCTGCTCTGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGTCCCTGT CTCCCGGCAAAGGTGGGGG GGGATCTGGTGGTGGTGGAT CAGGGGGTGGGGGGTCTCA AAGCGTACTACCCAACCTC CATCTGCATCCGGTACACCT GGTCGGCGAGTAACCATCTC CTGCTCTGGGAGCTCTTCTA ATATTGGTAACAACATATGTC ACCTGGTATCAGCAGTTGCC TGGGACAGCACCCAACTTC TTATATATGCCGATAGCCAT CGGCCTTCCGGCGTACCCGA TCGCTTCTCCGGGTCAAAT CTGGAACATCTGCCTCACTC GCAATTAGTGGATTGCGATC TGAGGATGAAGCAGATTATT ATTGCGCTACCTGGGATTAT TCACTTCTGGCTACGTCTTT GGT ^{igt} GGAACAAAACCTTACC GTGTTGGGCGGCGGAGGAA GCGGAGGCGGCGGTTCTGGT GGTGGCGGTAGCGGAGGTG GTGGATCTGAGGTTCAACTG
--	--	--	---

			TTGGAGTCAGGTGGCGGACT TGTCCAGCCTGGCGGGTCTC TGAGGCTGAGTTGCGTGCT TCTGGGTTTACTTTTTCAGG ATATGACATGAGTTGGGTAC GTCAGGCTCCAGGTAAGtgcC TCGAATGGGTCTCCGTTATC TATCCCGATGATGGAAATAC TACTACGCTGACAGTGTGA AAGGCAGGTTACAATCAGT AGGGACAATTCTAAAAATAC ACTCTACCTCCAGATGAACT CACTTCGAGCCGAGGACGCC GCCGTATATTACTGTGCCAA ACACGGCGGGCAAAAACCC ACTACTAAATCCAGTAGTGC TTACGGGATGGATGGCTGGG GACAGGGGACATTGGTCACT GTATCTTCCtga (260)
Легкий компонент	Легкая цепь B6	DIQMTQSPSSLSAS VGDRVITIT KASQ DVTP AVAWYQKK PGKAPKLLIY STSS RYT GVPSRFSGSG SGTDFTFITISLQPE DIATYYC QQHYTT PLT FGQGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTH	GACATCCAGATGACCCAGA GCCCTAGCAGCCTGAGCGCT AGCGTGGGCGACAGGGTGA CCATCACCTGCAAGGCCAGC CAGGATGTGACCCCTGCCGT GGCCTGGTACCAGCAGAAG CCCGGCAAGGCCCCCAAGCT GCTGATCTACAGCACCAGCA GCAGGTACACCGCGTGCCC AGCAGGTTTAGCGGAAGCG GCAGCGGCACCGACTTCACC TTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCCGAGGACATCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTAC ACCACCCCTCTGACCTTCGG CCAGGGCACCAAGCTGGAG

		QGLSSPVTKSFNR GEC (44)	ATCAAGAGAACCGTGGCCG CTCCCTCCGTGTTTCATCTTCC CACCATCTGACGAGCAGCTG AAGTCCGGCACCGCTTCTGT CGTGTGCCTGCTGAACAAC TCTACCCTCGGGAAGCCAAG GTGCAGTGGAAGGTGGACA ATGCCCTGCAGTCCGGCAAC TCCCAAGAGTCTGTGACCGA GCAGGACTCCAAGGACAGC ACCTACTCCCTGTCTCTAC CCTGACCCCTGTCCAAAGGCCG ACTACGAGAAGCACAAGGT GTACGCCTGCGAAGTGACCC ACCAGGGACTGTCTAGCCCC GTGACCAAGTCCCTCAACAG AGGCGAGTGCTGA (261)
--	--	---------------------------	---

Сконструированные векторы транзientно экспрессировали в клетках ExpiCHO-S™ (Thermo Fisher, A29127) с использованием набора (ExpiFectamine™ CHO Kit, Thermo, A29129), культивированных в среде для экспрессии ExpiCHO™ (Thermo, A29100-01) в условиях от 30 до 37°C в течение 7-15 дней в CO₂-инкубаторе, оборудованном вращающимся шейкером. Плазмидную ДНК (250 мкг) и реагент ExpiFectamin CHO (800 мкл) смешивали со средой Opti-MEM® I (конечный объем 20 мл) и оставляли при комнатной температуре на 5 мин. В смешанный раствор добавляли к 6×10^6 клеток ExpiCHO, культивированных в среде для экспрессии ExpiCHO, и осторожно перемешивали в шейкере-инкубаторе при 37°C в увлажненной атмосфере с 8% CO₂ в воздухе. Через 18 ч после трансфекции в каждую колбу добавляли 1,5 мл ExpiFectamin CHO Transfection Enhancer 1 и 60 мл ExpiFectamin CHO Transfection Feed.

Каждое BsAb очищали от супернатанта клеточной культуры с помощью аффинной хроматографии с рекомбинантным белком A (Hitrap Mabselect Sure, GE Healthcare, 28-4082-55) и гель-фильтрационной хроматографии на колонке HiLoad 26/200 Superdex200 prep grade column (GE Healthcare, 28-9893-36). SDS-PAGE (NuPage 4-12% Bis-Tris gel, NP0321) и эксклюзионную по размеру ВЭЖХ (Agilent, 1200 series) с колонкой SE-HPLC (SWXL SE-HPLC колонка, TOSOH, G3000SWXL) проводили для обнаружения и подтверждения размера и чистоты каждого BsAb. Очищенные белки концентрировали в PBS с помощью ультрафильтрации с использованием устройства Amicon Ultra 15 30K (Merck, UFC903096), и концентрации белка оценивали с помощью нанокапель (Thermo, Nanodrop One). При применении двухвекторной системы, соотношение между легкой и тяжелой цепями может составлять от 1:1 до 1:3 по массе. В качестве альтернативы также может использоваться одновекторная система, которая содержит обе цепи в одном единственном векторе.

Полученные анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифические антитела названы H12×41B01(ABLPNB.01), H12×41B01.03(ABLPNB.02), H12×41B02(ABLPNB.03), B6×41B01(ABLPNB.04), B6×41B01.01(ABLPNB.05), B6×41B01.01(ABLPNB.06), B6×41B01.03(ABLPNB.07), B6×41B01.04(ABLPNB.08) и B6×41B02(ABLPNB.09) соответственно, где первый относится к клону в форме IgG, а последний относится к клону в форме scFv.

Пример 4. Определение характеристик биспецифических антител PD-L1×4-1BB 4.1. Связывание биспецифических антител.

Чтобы оценить активность связывания с PD-L1 и 4-1BB биспецифических антител, полученных в примере 3, BsAb (ABLPNB.01, ABLPNB.03, ABLPNB.04 и ABLPNB.07) подвергали испытанию DACE (ELISA с захватом двойного антигена). Кратко микротитровальные планшеты покрывали 100 нг/лунка человеческого белка PD-L1-Fc (Sinobio, 10084-H02H) в PBS при 4°C в течение ночи, затем блокировали 100 мкл/лунка 1% BSA в течение 2 ч при 37°C. Трехкратные разведения каждого из BsAb, начиная с 100 нМ, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Планшеты промывали PBS/Tween, а затем инкубировали с 50 нг/лунка человеческого белка 4-1BB-His (Sinobio, 16498-H08H) в 1% BSA в течение 1 ч при 37°C. Планшеты промывали PBS/Tween, а затем инкубировали с Anti-His HRP (Roche, номер по каталогу: 11965085001) в течение 1 ч при 37°C. После промывки планшеты проявляли субстратом TMB и анализировали на спектрофотометре при OD 450-650 нм. Результаты показаны на фиг. 7А и 7В. Как показано на фиг. 7А и 7В, все протестированные BsAb могут связываться как с человеческими белками PD-L1, так и с человеческими белками 4-1BB с высокой активностью.

4.2 Стабильность в сыворотке биспецифического антитела.

Чтобы оценить стабильность сыворотки биспецифических антител против PD-L1 и 4-1BB (ABLPNB.05, ABLPNB.06, ABLPNB.07 и ABLPNB.08), BsAb инкубировали в сыворотке человека в течение 3,7, 14 дней при 37°C. Активность связывания анализировали с помощью теста DACE (ELISA с захватом двойного антигена). Кратко, микротитровальные планшеты покрывали 100 нг/лунка человеческого белка PD-L1-Fc (Sinobio, 10084-H02H) в PBS при 4°C в течение ночи, затем блокировали 100 мкл/лунка 1% BSA в течение 2 ч при 37°C. Трехкратные разведения каждого из BsAb, начиная с 100 нМ, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Планшеты промывали PBS/Tween, а затем инкубировали с 50 нг/лунка человеческого белка 4-1BB-His (Sinobio, 16498-H08H) в 1% BSA в течение 1 ч при 37°C. Планшеты промывали PBS/Tween, а затем инкубировали с Anti-His HRP (Roche, номер по каталогу: 11965085001) в течение 1 ч при 37°C. После промывки планшеты проявляли субстратом TMB и анализировали на спектрофотометре при OD 450-650 нм. Активность связывания каждого из BsAb (ABLPNB.05 - ABLPNB.08) с обоими антигенами была сопоставимой для каждого образца. Это означает, что BsAb стабильны в сыворотке крови человека в течение 2 недель при 37°C. Репрезентативные данные приведены на фиг. 8.

4.3. Возможность разработки биспецифических антител.

Была оценена возможность разработки в отношении физико-химических свойств PD-L1 и 4-1BB BsAb (ABLPNB.02 и ABLPNB.07). Признаки качества биспецифических антител (BsAb) оценивали несколькими аналитическими методами. Кратко, чистоту измеряли с помощью эксклюзионной по размеру высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-ВЭЖХ), и оба BsAb показали высокую чистоту более 99%. Анализировали термическую стабильность по тепловому сдвигу белка (PTS) с флуоресцентной меткой в ходе полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-ПЦР). Их температура плавления превышала 67°C, что указывает на стабильную структурную целостность исследуемых веществ. Для оценки растворимости молекул белки концентрировали до 20 мг/мл с помощью ультрафильтрации (центробежный концентратор Amicon Ultra-15). В результате видимые частицы не наблюдались при визуальном осмотре, и увеличение агрегатов не было подтверждено при SE-ВЭЖХ. Изoeлектрическая точка (pI) ABLPNB.02 и ABLPNB.07, измеренная с помощью капиллярного изoeлектрического фокусирования (cIEF), составила 8,26 и 8,35 соответственно. Этот диапазон pI подходит для последующих обработок и разработки состава. В целом, как показано в табл. 19, испытания показали, что протестированные BsAb (ABLPNB.02 и ABLPNB.07) обладают надлежащими физико-химическими свойствами для успешной разработки.

Таблица 19

Характеристика	Способ	ABLPNB.07	ABLPNB.02
Чистота	SEC	99,6	99,8
Термическая стабильность	PTS	67,0	67,1
		76,8	80,5
Растворимость	Визуальный осмотр	Легко концентрировать до 20 мг/мл, прозрачный	Легко концентрировать до 20 мг/мл, прозрачный
pI	cIEF	8,26	8,35

4.4. Активность биспецифических антител стимулировать сигнал 4-1BB.

Для проверки способности биспецифических антител (ABLPNB.01, ABLPNB.03, ABLPNB.07 и ABLPNB.08) стимулировать сигнал 4-1BB использовали клеточный анализ 4-1BB. В этом анализе использовали клеточную линию GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat (Promega, номер по каталогу CS196004) в качестве эффекторных клеток, а в качестве клеток-мишеней использовали линию раковых клеток, экспрессирующую или не экспрессирующую PD-L1. Клеточная линия GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat генетически модифицирована для стабильной экспрессии 4-1BB и люциферазы ниже по ходу транскрипции от ответного элемента. Экспрессия люциферазы индуцируется при связывании антитела с рецептором 4-1BB. Кратко, планшет с HCC1954 (экспрессия PD-L1) или BT474 или NCI-N87 (не экспрессии PD-L1) в количестве $2,5 \times 10^4$ клеток на лунку на белом 96-луночном планшете для анализа в 100 мкл культуральной среды (RPMI1640+10% FBS). Культивировали в течение ночи в инкубаторе с увлажнением 37°C+5% CO₂. После культивирования в течение ночи удаляли 100 мкл культуральной среды и добавляли 25 мкл среды для анализа (RPMI1640+1% FBS) к предварительно высеянному на чашках клеткам-мишеням. 25 мкл биспецифических антител (начиная с 15 нМ разводили в 8 раз или начиная с 1,5 нМ разводили в 4 раза) и BMUR или моноклональное антитело 41B01 (начиная с 20 нМ разводили в 10 раз или начиная с 133 нМ разводили в 6 раз) добавляли на планшет. Собранную клеточную линию GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat ресуспендировали в среде для анализа. Добавляли 25 мкл клеточной

линии GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat на лунку с получением $2,5 \times 10^4$ клеток на лунку на планшете. Культивировали 6 ч при $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ в инкубаторе с увлажнением. В ходе времени инкубирования добавляли восстанавливающий реагент Bio-Glo™ согласно инструкциям производителя. После 6 ч инкубации добавляли 75 на лунку реагента Bio-Glo™ на аналитический планшет. Ждали 5 мин и анализировали люминесценцию с помощью считывающего устройства для микропланшета. Анализ четырехпараметрической логистической кривой выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad. Результаты показаны на фиг. 9А-9F. Как показано на фиг. 9А, 9В, моноклональное антитело против 4-1BB показало очень ограниченную активацию сигнала 4-1BB по сравнению с BUMR. 41B01 (проанализированный в сшитой с Fc форме) показал только слабую активацию сигнала 4-1BB (фиг. 9В). В случае биспецифического антитела, совместно культивированного с PD-L1-отрицательными раковыми клетками (фиг. 9С и 9D), биспецифическое антитело PD-L1×4-1BB не показало активации сигнала 4-1BB (фиг. 9С) и активацию слабого сигнала 4-1BB при Fc-сшивании, как представлено на фиг. 9С и 9D соответственно. В присутствии PD-L1, т.е. при совместном культивировании с PD-L1-положительными клетками-мишенями (фиг. 9Е и 9F), биспецифическое антитело PD-L1×4-1BB показало активацию сигнала 4-1BB, которая зависела от присутствия опухолевого антигена (PD-L1).

4.5. Активность биспецифических антител стимулировать Т-клеточный иммунный ответ у человека.

Чтобы проверить способность биспецифических антител стимулировать ответ человеческих РВМС, использовали анализ продукции цитокинов. Человеческие РВМС, стимулированные человеческим анти-CD3-антителом, использовали в качестве эффекторных клеток. Клетки HCC1954, которые экспрессируют PD-L1, использовали в качестве клеток-мишеней. В этой системе РВМС (3×10^4) культивировали совместно с HCC1954 (1×10^4) в присутствии человеческого анти-CD3-антитела. Биспецифические антитела (ABLPNB.01 и ABLPNB.04) (начиная с 20 нМ (=4 мкг/мл), разведенные на 10 доз) и их аналогичные моноклональные антитела (41B01 и H12) (начиная с 26,67 нМ (=4 мкг/мл), разведенные на 10 доз) добавляли к смешанной культуре. Как показано на фиг. 10А и 10В, только биспецифические антитела могут активировать Т-клетки в присутствии опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1 (см. фиг. 10А). Более того, биспецифические антитела активировали Т-клетки зависимым от дозы образом (см. фиг. 10В).

4.6. Ингибирование роста опухоли биспецифическими антителами (анализ *in vivo*).

Использовали гуманизированных мышей, экспрессирующих внеклеточный домен 4-1BB человека. Клетки мышинной аденокарциномы толстой кишки (MC38) конструировали для экспрессии человеческого PD-L1. Гуманизированным мышам (h4-1BB) подкожно имплантировали клетки MC38-hPD-L1. Мышам внутривенно вводили Q3D 5 раз (пятикратная инъекция антитела каждые три дня) со следующими антителами: изотипический контроль (10 мг/кг), анти-PD-L1 антитело (H12, 10 мг/кг), анти-4-1BB антитело (41B01, 10 мг/кг), комбинация анти-PD-L1 (H12, 10 мг/кг) и анти-4-1BB (41B01, 10 мг/кг) антител и биспецифическое антитело PD-L1×4-1BB (BsAb) {BLPNB.01, 13,3 мг/кг}. Объем опухолей контролировали с помощью штангенциркуля два раза в неделю в течение эксперимента. Ингибирование роста опухоли, индуцированное ABLPNB.01, было значительно больше, чем наблюдаемое для комбинации каждого нацеливающего моноклонального антитела (см. фиг. 11).

Объем настоящего раскрытия не должен ограничиваться описанными конкретными вариантами осуществления, которые предназначены как отдельные иллюстрации отдельных аспектов настоящего раскрытия, и любые композиции или способы, которые являются функционально эквивалентными, входят в объем настоящего раскрытия. Для специалистов в данной области техники очевидно, что различные модификации и изменения могут быть сделаны в способах и композициях согласно настоящему изобретению без отклонения от сущности или объема настоящего раскрытия. Таким образом, предполагается, что настоящее раскрытие охватывает модификации и вариации настоящего изобретения, при условии, что они входят в объем прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

Все публикации и заявки на патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была специально и индивидуально указана как включенная посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где

анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и

анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14,

анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

7. Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело, содержащее анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где

анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и

анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, CDR3 VH, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, CDR1 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDR2 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и CDR3 VL, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

8. Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело по пп.1-7, где анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно специфически связываться с доменом иммуноглобулина C (IgC) человеческого белка лиганд 1 белка программируемой смерти (PD-L1), где домен IgC состоит из аминокислотных остатков 133-225.

9. Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело по пп.1-8, где анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не способно связываться с доменом иммуноглобулина V (IgV) белка PD-L1, где домен IgV состоит из аминокислотных остатков 19-127.

10. Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело по любому из пп.1-9, где анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 103 и 104.

11. Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело по любому из пп.1-10, где анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 105 и 106.

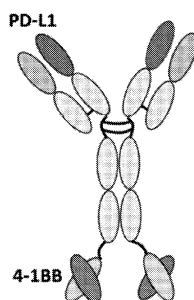
12. Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело по любому из пп.1-11, где анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 22, 23 и 24.

13. Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело по любому из пп.1-12, где анти-4-1BB антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25 и 26.

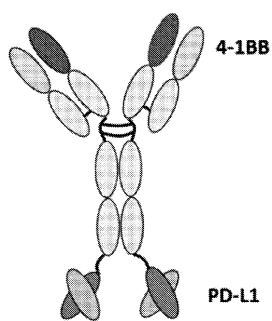
14. Анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело по любому из пп.1-13, которое находится в форме IgG-scFv.

15. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики заболевания, связанного с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим, выбранное из рака, опухолей, инфекционных заболеваний, аутоиммунных реакций и нарушений нервной системы, причем композиция содержит анти-PD-L1/анти-4-1BB биспецифическое антитело по любому из пп.1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

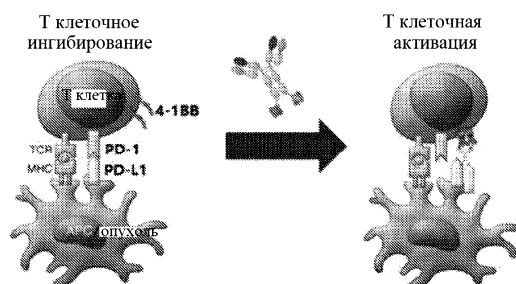
16. Фармацевтическая композиция по п.15, где заболеванием, связанным с PD-L1, 4-1BB или и тем, и другим, является рак.



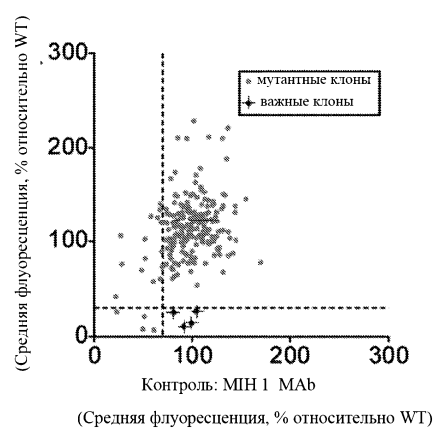
Фиг. 1А



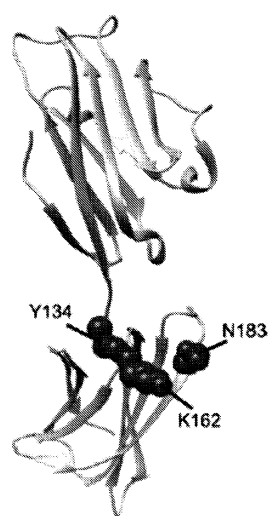
Фиг. 1В



Фиг. 2

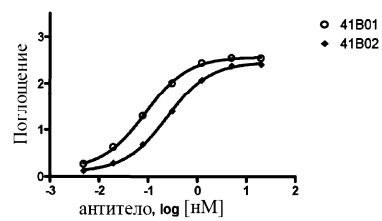


Фиг. 3

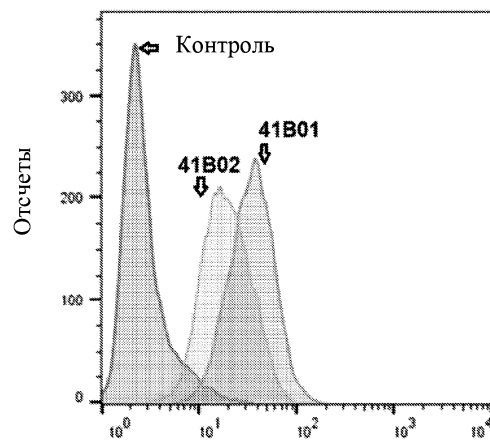


Фиг. 4

Человеческое 4-1BB

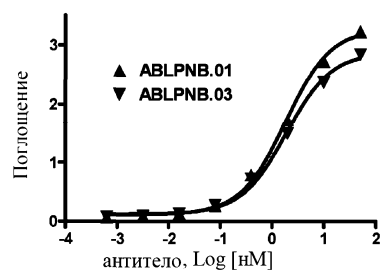


Фиг. 5



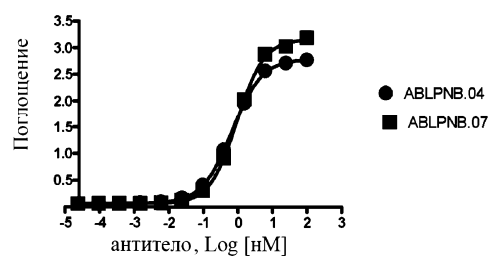
Фиг. 6

DACE



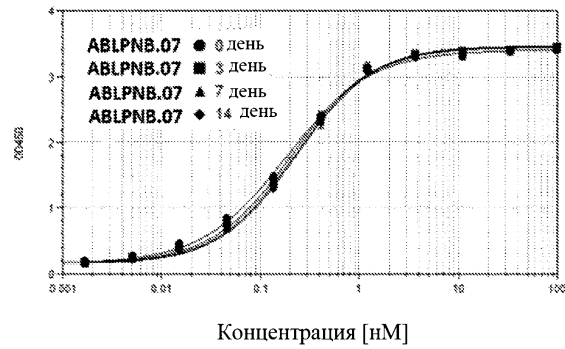
Фиг. 7A

DACE

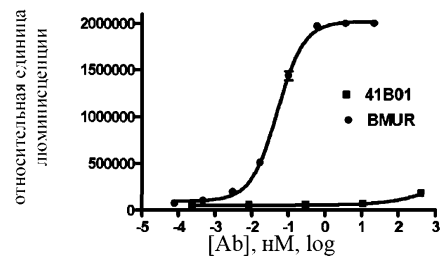


Фиг. 7B

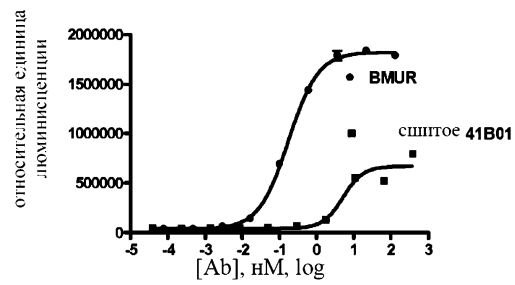
Сыворотка человека



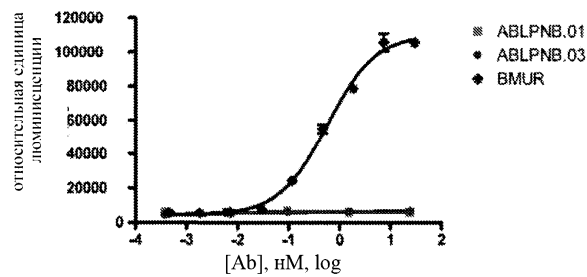
Фиг. 8



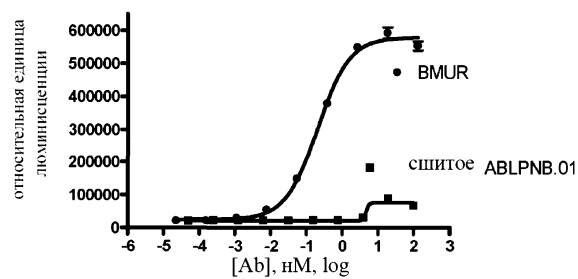
Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 9С



Фиг. 9D

