

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390511** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.04.21

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.14

(54) **МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ CD47 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **202110404033.2**

(72) Изобретатель:

(32) **2021.04.14**

**Ли Байюн, Ся Юй, Ван Чжунминь
Маквелл (CN)**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2022/086890**

(74) Представитель:

(87) **WO 2022/218384 2022.10.20**

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

**АКЕСО БАЙОФАРМА, ИНК.;
АКЕСО ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ИНК.
(CN)**

(57) Предусматривается моноклональное антитело против CD47 и его применение в комбинации с моноклональным антителом, биспецифическим антителом и/или нацеленным на опухоль средством, где моноклональное антитело против CD47 секретируется гибридной клеточной линией с номером депозита ССТСС № С2018135.

A1

202390511

202390511

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577542EA/085

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ CD47 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области лечения аутоиммунных заболеваний и молекулярной иммунологии, и, в частности, к антителу против CD47, фармацевтической композиции, содержащей его, и к их применению. Более конкретно, настоящее изобретение относится к моноклональному антителу против CD47.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

CD47 также упоминается как интегрин-ассоциированный белок (IAP). CD47 представляет собой пятикратно пересекающий мембрану белок с молекулярной массой приблизительно 50 кДа, и он принадлежит суперсемейству иммуноглобулинов. Его внеклеточный N-конец представляет собой домен IgV, и он связывается с интегринами $\alpha\nu\beta3$ (CD51/CD61) и $\alpha\Pi\beta3$ (CD41/CD61). CD47 вовлечен в различные физиологические функции, такие как клеточный транспорт, активация Т-клеток и дендритных клеток (DC) и развитие аксонов.

CD47 экспрессируется на всех типах клеток, включая эритроциты, и в высокой степени экспрессируется на опухолевых клетках. CD47 имеет два лиганда, а именно, а именно, сигнальный регуляторный белок α (SIRP α) и тромбоспондин-1 (TSP1). SIRP α , рецепторный трансмембранный гликопротеин, содержит иммуноглобулиновый домен, принадлежит к семейству SIRP и в основном экспрессируется на макрофагах и нервных клетках. В каскаде CD47-SIRP α белок CD47 связывается с SIRP α и фосфорилирует его иммунорецепторный тирозиновый ингибиторный мотив (ITIM), и внутриклеточно привлекает белок SHP-1, вызывая последовательность каскадных реакций, ингибирующих фагоцитоз макрофагов (Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, et al., Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRP α signaling pathway. *Trends in cell biology*, 2009, 19(2): 72-80.). Однако нормальные эритроциты не фагоцитируются вследствие ингибиторного сигнала, генерируемого посредством связывания CD47 на поверхности клеточной мембраны с SIRP α макрофагов. (Oldenberg P A, Zheleznyak A, Fang Y F, et al., Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*, 2000, 288(5473): 2051-2054.). TSP1, гомотример, состоящий из 3 пептидных цепей, вовлечен в пролиферацию клеток, апоптоз, адгезию, миграцию, ангиогенез и другие процессы посредством взаимодействия с другими рецепторами клеточной поверхности, компонентами матрикса и факторами роста (Jiang P, Lagenaur CF, Narayanan V. Integrin-associated Protein Is a Ligand for the P84 Neural Adhesion Molecule. *Journal of Biological Chemistry* 1999. 274:559-62).

Макрофаги происходят из моноцитов, которые в свою очередь происходят из клеток-предшественников в костном мозге. Их основной функцией является фагоцитоз клеточного дебриса и патогенов и активация лимфоцитов или других иммунных клеток, чтобы они отвечали на патогены в форме фиксированных клеток или свободных клеток. В настоящее время исследования указывают на то, что опухолевые клетки имеют механизм

ускользания от макрофагального фагоцитоза. В ходе роста опухолевых клеток на поверхности образуются определенные белки, такие как кальретикулин, проявляя характерные черты опухолевых клеток, так что опухолевые клетки фагоцитируются привлеченными макрофагами. Однако опухолевые клетки с высокой экспрессией CD47 ошибочно распознаются как нормальные клетки макрофагами с SIRP α и, таким образом, ускользают от макрофагального фагоцитоза, поскольку каскад CD47-SIRP α активирует ингибирование макрофагального фагоцитоза (CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. Jaiswal S, Jamieson C H M, Pang W W, et al., *Cell*, 2009, 138(3) 271-285).

В настоящее время исследования указывают на то, что антитела против CD47 уничтожают опухолевые клетки в основном посредством двух механизмов. 1. Связывание антител против CD47 с CD47 блокирует каскад CD47-SIRP α , обеспечивая макрофагальный фагоцитоз. 2. Антитела против CD47 демонстрируют эффект уничтожения опухоли через DC-клетки и CD8⁺ Т-клетки. DC-клетки фагоцитируют опухолевые клетки через синергию между антителами против CD47 и профагоцитарными молекулами, такими как кальретикулин, и презентуют опухоль-ассоциированные антигены CD8⁺ Т-клеткам, тем самым демонстрируя специфический эффект уничтожения CD8⁺ Т-клетками опухолей (CD47 blockade as another immune checkpoint therapy for cancer. Vonderheide R H. *Nature Medicine*, 2015, 21(10):1122). Полагают, что посредством этих двух механизмов антитела против CD47 будут обладать способностью активировать как неспецифический иммунитет, так и специфический иммунитет.

В настоящее время лекарственные антитела на основе моноклональных антител против CD47 имеют перспективную применимость в различных применениях и хорошую эффективность в отношении лечения опухолей, и могут использоваться для лечения различных опухолей. Лекарственное средство на основе моноклональных антител против CD47 Hu5F9-G4 эффективно ингибирует рост и метастазирование гематологических злокачественных опухолей и солидных опухолей в доклинических испытаниях (Abstract PR13: The anti-CD47 antibody Hu5F9-G4 is a novel immune checkpoint inhibitor with synergistic efficacy in combination with clinically active cancer targeting antibodies [J] Chao M P, McKenna K M, Cha A, et al., 2016), где аминокислотная последовательность тяжелой цепи приведена под SEQ ID NO: 85, и аминокислотная последовательность легкой цепи приведена под SEQ ID NO: 86.

Таким образом, является важной разработкой антительных лекарственных средств с высокой аффинностью в отношении CD47, более высокой эффективностью и меньшими токсическими побочными эффектами для лечения опухолей.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Экспрессирующие системы клеток млекопитающих использовали для экспрессии рекомбинантного CD47 человека в качестве антигена для иммунизации мышей и получали гибридные клетки путем слияния клеток селезенки мыши и миеломных клеток. Следующие гибридные клеточные линии получены путем скрининга большого

количества образцов.

Авторы изобретения обнаружили, что:

Гибридная клеточная линия LT012 может секретировать моноклональное антитело (называемое 6F7), способное специфически связываться с CD47, и моноклональное антитело может конкурировать с рецепторным ECD SIRP α -hFc-биотином за связывание с CD47, эффективно блокируя связывание SIRP α с CD47 и далее способствуя фагоцитозу опухолевых клеток макрофагами.

Более того, авторы изобретения получили гуманизированные версии моноклонального антитела 6F7 (названные 6F7H1L1, 6F7H2L2 и 6F7H3L3).

Настоящее изобретение подробно описано ниже.

Аминокислотные последовательности областей CDR антител проанализированы посредством технических средств, хорошо известных специалистам в данной области, например, с использованием базы данных VBASE2.

Антитела 6F7, 6F7 H1L1, 6F7 H2L2 и 6F7 H3L3, описанные в настоящем описании, обладают одинаковыми HCDR1-3 и LCDR1-3.

3 CDR вариабельной области тяжелой цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

HCDR1: GYTFTSYW (SEQ ID NO: 5),

HCDR2: IDPSDSET (SEQ ID NO: 6),

HCDR3: ARLYRWYFDV (SEQ ID NO: 7);

3 CDR вариабельной области легкой цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

LCDR1: EIVGTY (SEQ ID NO: 8),

LCDR2: GAS (SEQ ID NO: 9),

LCDR3: GQSYNFPYT (SEQ ID NO: 10).

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем описании, выбраны из группы, состоящей из:

аминокислотной последовательности тяжелой цепи 6F7 H1L1 (G1M) (SEQ ID NO: 59)

аминокислотной последовательности легкой цепи 6F7 H1L1 (G1M) (SEQ ID NO: 60)

аминокислотной последовательности тяжелой цепи 6F7 H2L2 (G1M) (SEQ ID NO: 61)

аминокислотной последовательности легкой цепи 6F7 H2L2 (G1M) (SEQ ID NO: 62)

аминокислотной последовательности тяжелой цепи 6F7 H3L3 (G1M) (SEQ ID NO: 63)

аминокислотной последовательности легкой цепи 6F7 H3L3 (G1M) (SEQ ID NO: 64)

аминокислотной последовательности тяжелой цепи 6F7 H1L1 (hG4) (SEQ ID NO: 65)

аминокислотной последовательности легкой цепи 6F7 H1L1 (hG4) (SEQ ID NO: 66)

аминокислотной последовательности тяжелой цепи 6F7 H2L2 (hG4) (SEQ ID NO: 67)

аминокислотной последовательности легкой цепи 6F7 H2L2 (hG4) (SEQ ID NO: 68)

аминокислотной последовательности тяжелой цепи 6F7 H3L3 (hG4) (SEQ ID NO: 69)
аминокислотной последовательности легкой цепи 6F7 H3L3 (hG4) (SEQ ID NO: 70).

Один из аспектов настоящего изобретения относится к выделенному полипептиду, содержащему последовательности, указанные под SEQ ID NO: 5, 6 и 7, где полипептид, в качестве антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело дополнительно содержит последовательности, указанные под SEQ ID NO: 8, 9 и 10.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к выделенному полипептиду, содержащему последовательности, указанные под SEQ ID NO: 8, 9 и 10, где полипептид, в качестве антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело дополнительно содержит последовательности, указанные под SEQ ID NO: 5, 6 и 7.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к выделенному полипептиду, содержащему последовательность, выбранную из последовательностей, указанных под SEQ ID NO: 2, 12, 16 и 20, или их варианта, где полипептид, в качестве антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело дополнительно содержит последовательность, выбранную из последовательностей, указанных под SEQ ID NO: 4, 14, 18 и 22, или их варианта, где вариант обладает по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более высокой идентичностью последовательности с соответствующей последовательностью, или имеет одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, инсерций или делеций) по сравнению с соответствующей последовательностью; или

один из аспектов настоящего изобретения относится к выделенному полипептиду, содержащему последовательность, выбранную из последовательностей, указанных под SEQ ID NO: 4, 14, 18 и 22, или их варианта, где полипептид, в качестве антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело дополнительно содержит последовательность, выбранную из последовательностей, указанных под SEQ ID NO: 2, 12, 16 и 20, или их варианта, где вариант обладает по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более высокой идентичностью последовательности с соответствующей последовательностью, или имеет одну или несколько (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, инсерций или делеций) по сравнению с соответствующей последовательностью.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающий фрагмент выбран из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, Fab/c, фрагмента в виде определяющей комплементарности области (CDR), одноцепочечного антитела (например, scFv), двухвалентного антитела и доменного антитела.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, которое специфически связывается с CD47, представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, которое специфически связывается с CD47, связывается с белком CD47 человека с KD менее чем приблизительно 10^{-5} М, например, менее чем приблизительно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или менее. Предпочтительно KD определяют с использованием системы Fortebio.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, которое специфически связывается с CD47, связывается с белком CD47 человека с EC_{50} менее чем приблизительно 100 нМ, например, менее чем приблизительно 10 нМ, 1 нМ, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ или 0,1 нМ, или менее. В частности, EC_{50} определяют посредством непрямого ELISA.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитело, которое специфически связывается с CD47, содержит константные области, и константные области происходят из вида, отличного от мыши, например, из антитела человека, предпочтительно из IgG человека, более предпочтительно из IgG1 или IgG4.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения константные области антитела, которое специфически связывается с CD47, являются гуманизированными, например, константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig, более предпочтительно С-область цепи гамма-1 Ig под номером доступа GenBank № P01857 (SEQ ID NO: 58), или представляет собой С-область цепи гамма-4 Ig, более предпочтительно С-область цепи гамма-4 Ig под номером доступа GenBank № P01861.1 (SEQ ID NO: 56); константная область легкой цепи представляет собой С-область цепи каппа Ig, более предпочтительно С-область цепи каппа Ig под номером доступа GenBank № P01834 (SEQ ID NO: 57). В антителах, описанных в настоящем описании, используются следующие константные области на основе переменных областей 6F7 H1L1, 6F7 H2L2 и 6F7 H3L3: константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig под номером доступа № P01857 (SEQ ID NO: 58) или константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-4 Ig под номером доступа № P01861.1 (SEQ ID NO: 56), и, исходя из этого, вносят мутацию S228P для повышения стабильности; константная область легкой цепи представляет собой С-область цепи каппа Ig под номером доступа № P01834 (SEQ ID NO: 57). Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий последовательности, указанные под SEQ ID NO: 5, 6 и 7, где полипептид, в качестве антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело дополнительно содержит последовательности, указанные под SEQ ID NO: 8, 9 и 10.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к выделенному

полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий последовательности, указанные под SEQ ID NO: 8, 9 и 10, где полипептид, в качестве антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело дополнительно содержит последовательности, указанные под SEQ ID NO: 5, 6 и 7.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий последовательность, выбранную из последовательностей, указанных под SEQ ID NO: 2, 12, 16 и 20, или их варианта, где полипептид, в качестве антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело дополнительно содержит последовательность, выбранную из последовательностей, указанных под SEQ ID NO: 4, 14, 18 и 22, или их варианта,

где вариант содержит последовательность, обладающую по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или более высокой идентичностью последовательности с соответствующей последовательностью, или обладающую одной или несколькими (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативными аминокислотными мутациями (предпочтительно заменами, инсерциями или делециями) по сравнению с соответствующей последовательностью; или

один из аспектов настоящего изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий последовательность, выбранную из последовательностей, указанных под SEQ ID NO: 4, 14, 18 и 22, или их варианта, где полипептид, в качестве антитела против CD47 человека, специфически связывается с CD47 человека, причем антитело дополнительно содержит последовательность, выбранную из последовательностей, указанных под SEQ ID NO: 2, 12, 16 и 20, или их варианта,

где вариант обладает по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или более высокой идентичностью последовательности с соответствующей последовательностью, или обладает одной или несколькими (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативными аминокислотными мутациями (предпочтительно, заменами, инсерциями или делециями) по сравнению с соответствующей последовательностью;

в частности, полинуклеотидная молекула содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 19, или последовательности, обладающей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или более высокой идентичностью последовательности с данной последовательностью.

В частности, полинуклеотидная молекула содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 21, или последовательности, обладающей по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или более высокой идентичностью последовательности с данной последовательностью.

Кроме того, один из аспектов настоящего изобретения относится к гибридной клеточной линии, выбранной из гибридной клеточной линии LT012 согласно ССТСС № 2018135, и моноклональному антителу, продуцируемому данной гибридной клеточной линией.

Кроме того, настоящее изобретение относится к следующим аспектам:

1. Фармацевтическая композиция, предпочтительно для лечения опухоли, содержащая компонент А и компонент В, где компонент А представляет собой антитело, которое специфически связывается с CD47, или его антигенсвязывающий фрагмент;

компонент В выбран из одного или нескольких из следующих: компонент В1, компонент В2 и компонент В3, где компонент В1 представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, компонент В2 представляет собой противоопухолевое химиотерапевтическое средство, и компонент В3 представляет собой моноклональное антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент;

предпочтительно, композиция дополнительно содержит компонент С, где компонент С представляет собой противоопухолевое терапевтическое средство, и компонент С отличается от компонента В;

например, в соответствии с системой нумерации Kabat, IMGT, Chothia или AbM, антитело, которое специфически связывается с CD47, содержит последовательности CDR, выбранные из последовательностей, содержащихся в следующих переменных областях тяжелой цепи и переменных областях легкой цепи:

(1) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 2, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 4; или

(2) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 12, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 14; или

(3) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 16, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 18; или

(4) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 20, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 22

(предпочтительно, в соответствии с системой нумерации IMGT, причем антитело содержит:

HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 5, или ее варианта,

HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 6, или ее варианта, и

HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 7, или ее варианта; и антитело дополнительно содержит:

LCDR1, содержащую или состоящую из аминокислот, указанных под SEQ ID NO: 8, или их варианта,

LCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 9, или ее варианта, и

LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 10, или ее варианта);

биспецифическое антитело представляет собой антитело против PD-1/против CTLA4 или антитело против PD-1/против VEGFA, их комбинацию; биспецифическое антитело содержит функциональную область первого белка и функциональную область второго белка, где функциональная область первого белка нацелена на PD-1, и функциональная область второго белка нацелена на CTLA4 или VEGFA; функциональная область первого белка представляет собой иммуноглобулин, и функциональная область второго белка представляет собой одноцепочечное антитело; или функциональная область первого белка представляет собой одноцепочечное антитело, и функциональная область второго белка представляет собой иммуноглобулин;

предпочтительно, две молекулы одноцепочечных антител (предпочтительно, две идентичных молекулы одноцепочечных антител) связаны с одной молекулой иммуноглобулина; предпочтительно, иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин подтипа IgG1 (предпочтительно, подтипа IgG1 человека); предпочтительно, одноцепочечное антитело связано с N-концом или C-концом тяжелой цепи иммуноглобулина, где количества функциональной области первого белка и функциональной области второго белка в каждом случае независимо составляют 1, 2 или более; предпочтительно, функциональная область первого белка связана с функциональной областью второго белка либо прямо, либо через первый линкерный фрагмент; и/или переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с переменной областью легкой цепи одноцепочечного антитела либо прямо, либо через второй линкерный фрагмент; первый линкерный фрагмент и второй линкерный фрагмент являются идентичными или различаются; предпочтительно, линкерный фрагмент представляет собой $(GGGS)_n$, где n представляет собой положительное целое число, или более предпочтительно, n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6; предпочтительно, первый линкерный фрагмент и второй линкерный фрагмент содержат аминокислотные последовательности, независимо выбранные из SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 120; более предпочтительно, первый линкерный фрагмент и второй линкерный фрагмент содержат аминокислотную последовательность, указанную под SEQ ID NO: 120;

когда биспецифическое антитело представляет собой антитело против PD-1/против CTLA4,

функциональная область первого белка содержит HCDR1-HCDR3, содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 87, и LCDR1-LCDR3, содержащиеся в варибельной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 88 (предпочтительно, в соответствии с системой нумерации IMGT, функциональная область первого белка содержит HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 89, или ее варианта,

HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 90, или ее варианта,

HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 91, или ее варианта,

LCDR1, содержащую или состоящую из аминокислот, указанных под SEQ ID NO: 92, или их варианта,

LCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 93, или их варианта, и

LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 94, или их варианта);

функциональная область второго белка содержит HCDR1-HCDR3 в варибельной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 95, и LCDR1-LCDR3 в варибельной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 96 (предпочтительно, в соответствии с системой нумерации IMGT, функциональная область второго белка содержит HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 97, или ее варианта,

HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 98, или ее варианта,

HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 99, или ее варианта,

LCDR1, содержащую или состоящую из аминокислот, указанных под SEQ ID NO: 100, или их варианта,

LCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 101, или ее варианта, и

LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 102, или ее варианта);

или

когда биспецифическое антитело представляет собой антитело против PD-1/против VEGFA,

функциональная область первого белка содержит HCDR1-HCDR3, содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 103, и LCDR1-LCDR3, содержащиеся в варибельной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 104 (предпочтительно, в соответствии с системой нумерации IMGT, функциональная область первого белка содержит HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности,

указанной под SEQ ID NO: 105, или ее варианта,

HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 106, или ее варианта,

HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 107, или ее варианта,

LCDR1, содержащую или состоящую из аминокислот, указанных под SEQ ID NO: 108, или их варианта,

LCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 109, или ее варианта, и

LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 110, или ее варианта);

функциональная область второго белка содержит HCDR1-HCDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 111, и LCDR1-LCDR3 в вариабельной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 112 (предпочтительно, в соответствии с системой нумерации IMGT, функциональная область второго белка содержит HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 113, или ее варианта,

HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 114, или ее варианта,

HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 115, или ее варианта,

LCDR1 содержащую или состоящую из аминокислот, указанных под SEQ ID NO: 116, или их варианта,

LCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 117, или ее варианта, и

LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 118, или ее варианта);

где

моноклональное антитело против PD1 содержит HCDR1-HCDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 121, и LCDR1-LCDR3, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 122 (предпочтительно, в соответствии с системой нумерации IMGT, моноклональное антитело против PD1 содержит HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 123, или ее варианта,

HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 124, или ее варианта,

HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 125, или ее варианта,

LCDR1, содержащую или состоящую из аминокислот, указанных под SEQ ID NO: 126, или их варианта,

LCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 127, или ее варианта, и

LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 128, или ее варианта);

где вариант содержит последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологией с соответствующей последовательностью, или вариант содержит последовательность, обладающую одной или несколькими (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативными аминокислотными мутациями (предпочтительно, заменами, инсерциями или делециями) по сравнению с соответствующей последовательностью.

2. Фармацевтическая композиция согласно положению 1, где антитело, которое специфически связывается с CD47, дополнительно содержит каркасные области (FR) в варибельной области тяжелой цепи и каркасные области (FR) в варибельной области легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из следующих:

(1) каркасные области (FR) в варибельной области тяжелой цепи, включающие FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4, где FR-H1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 23, или ее варианта; FR-H2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 24, или ее варианта; FR-H3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 25, или ее варианта; FR-H4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 26, или ее варианта;

каркасные области (FR) в варибельной области легкой цепи, включающие FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, где FR-L1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 27, или ее варианта; FR-L2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 28, или ее варианта; FR-L3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 29, или ее варианта; FR-L4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 30, или ее варианта;

(2) каркасные области (FR) в варибельной области тяжелой цепи, включающие FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4, где FR-H1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 31, или ее варианта; FR-H2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 32, или ее варианта; FR-H3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 33, или ее варианта; FR-H4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 34, или ее варианта;

каркасные области (FR) в варибельной области легкой цепи, включающие FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, где FR-L1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 35, или ее варианта; FR-L2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 36, или ее варианта; FR-L3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной

под SEQ ID NO: 37, или ее варианта; FR-L4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 38, или ее варианта;

(3) каркасные области (FR) в варибельной области тяжелой цепи, включающие FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4, где FR-H1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 39, или ее варианта; FR-H2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 40, или ее варианта; FR-H3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 41, или ее варианта; FR-H4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 42, или ее варианта;

каркасные области (FR) в варибельной области легкой цепи, включающие FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, где FR-L1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 43, или ее варианта; FR-L2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 44, или ее варианта; FR-L3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 45, или ее варианта; FR-L4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 46, или ее варианта;

(4) каркасные области (FR) в варибельной области тяжелой цепи, включающие FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4, где FR-H1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 47, или ее варианта; FR-H2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 48, или ее варианта; FR-H3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 49, или ее варианта; FR-H4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 50, или ее варианта;

каркасные области (FR) в варибельной области легкой цепи, включающие FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, где FR-L1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 51, или ее варианта; FR-L2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 52, или ее варианта; FR-L3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 53, или ее варианта; FR-L4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 54, или ее варианта,

где вариант содержит последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологией с соответствующей последовательностью, или обладающую одной или несколькими (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативными аминокислотными мутациями (предпочтительно, заменами, инсерциями или делециями) по сравнению с соответствующей последовательностью.

3. Фармацевтическая композиция согласно положению 1 или 2, где антитело, которое специфически связывается с CD47, содержит:

(1) варибельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:

- аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 2, или ее варианта,
- и
- вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:
аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 4, или ее варианта;
- (2) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:
аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 12, или ее варианта, и
- вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:
аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 14, или ее варианта;
- (3) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:
аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 16, или ее варианта, и
- вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:
аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 18, или ее варианта; и
- (4) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:
аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 20, или ее варианта, и
- вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:
аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 22, или ее варианта,
- функциональная область первого белка антитела против PD-1/против CTLA4 содержит:
- (1) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:
последовательности, указанной под SEQ ID NO: 87, или ее варианта, и
вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:
последовательности, указанной под SEQ ID NO: 88, или ее варианта; и
- (2) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:
последовательности, указанной под SEQ ID NO: 129, или ее варианта, и
вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:
последовательности, указанной под SEQ ID NO: 130, или ее варианта;
- функциональная область второго белка антитела против PD-1/против CTLA4 содержит:
- (1) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:
последовательности, указанной под SEQ ID NO: 95, или ее варианта, и
вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:
последовательности, указанной под SEQ ID NO: 96, или ее варианта;
- (2) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:
последовательности, указанной под SEQ ID NO: 133, или ее варианта, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 134, или ее варианта;

(3) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 135, или ее варианта, и вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 136, или ее варианта;

(4) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 137, или ее варианта, и вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 138, или ее варианта; и

(5) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 131, или ее варианта, и вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 132, или ее варианта;

предпочтительно, иммуноглобулин антитела против PD-1/против CTLA4 содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную под SEQ ID NO: 139, и нацелен на PD-1;

функциональная область первого белка антитела против PD-1/против VEGFA содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 103, или ее варианта, и вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 104, или ее варианта;

функциональная область второго белка антитела против PD-1/против VEGFA содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 111 (предпочтительно кодируемой нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 145), или ее варианта, и вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 112 (предпочтительно кодируемой нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 146), или ее варианта;

предпочтительно, иммуноглобулин антитела против PD-1/против VEGFA содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную под SEQ ID NO: 140, и нацелен на VEGFA;

моноклональное антитело против PD-1 содержит или состоит из вариабельной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 121, и вариабельной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 122;

где вариант обладает по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или более высокой идентичностью последовательности с соответствующей последовательностью, или содержит

аминокислотную последовательность, обладающую одной или несколькими (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативными аминокислотными мутациями (предпочтительно, заменами, инсерциями или делециями) по сравнению с соответствующей последовательностью.

4. Фармацевтическая композиция согласно любому из положений 1-3, где антитело, которое специфически связывается с CD47, дополнительно содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, и константные области происходят из вида, отличного от мыши, например, из антитела человека, предпочтительно из IgG или IgM человека, и более предпочтительно из IgG1; предпочтительно, константная область тяжелой цепи представляет собой C-область цепи гамма-1 Ig, номер доступа № P01857 (SEQ ID NO: 58), или C-область цепи гамма-4 Ig, номер доступа № P01861.1 (SEQ ID NO: 56); константная область легкой цепи представляет собой C-область цепи каппа Ig, номер доступа № P01834 (SEQ ID NO: 57); предпочтительно антитело, которое специфически связывается с CD47, секретируется гибридомной клеточной линией LT012 под ССТСС № 2018135.

5. Фармацевтическая композиция согласно любому из положений 1-4, где, в соответствии с системой нумерации EU, антитело, которое специфически связывается с CD47, и иммуноглобулин содержат константную область тяжелой цепи, имеющую мутации в любых 1, 2 или 3 из положений 234, 235 и 237, и константа аффинности биспецифического антитела в отношении FcγRIIIa и/или C1q снижается после внесения мутации по сравнению с константой аффинности до внесения мутации; предпочтительно константу аффинности измеряют с использованием системы Fortebio Octet;

предпочтительно антитело, которое специфически связывается с CD47, содержит мутацию L234A и/или L235A в соответствии с системой нумерации EU;

более предпочтительно константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет одну из следующих комбинаций мутаций:

L234A и L235A; или

L234A и G237A; или

L235A и G237A; или

L234A, L235A и G237A;

еще более предпочтительно,

в соответствии с системой нумерации EU, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина дополнительно имеет одну из комбинаций следующих мутаций:

N297A, D265A, D270A, P238D, L328E, E233D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D, G236R, G236A, L328R, A330S, P331S, H268A, E318A и K320A.

6. Фармацевтическая композиция согласно любому из положений 1-5, где антитело, которое специфически связывается с CD47, содержит или состоит из тяжелой цепи и легкой

цепи, выбранных из группы, состоящей из следующих:

(1) тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 59, и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 60;

(2) тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 61, и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 62;

(3) тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 63, и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 64;

(4) тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 65, и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 66;

(5) тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 67, и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 68; и

(6) тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 69, и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 70;

антитело против PD-1/против CTLA4 содержит или состоит из тяжелой цепи и легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из следующих:

тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 78 (предпочтительно кодируемая нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 77), и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 80 (предпочтительно кодируемая нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 79);

антитело против PD-1/против VEGFA содержит или состоит из тяжелой цепи и легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из следующих:

тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 141 (предпочтительно кодируемая нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 142) и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 143 (предпочтительно кодируемая нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 144);

моноклональное антитело против PD-1 содержит или состоит из тяжелой цепи и легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из следующих: тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 82 (предпочтительно кодируемая нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 81) и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 84 (предпочтительно кодируемая нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 83).

7. Фармацевтическая композиция согласно любому из положений 1-6, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, Fab/c, фрагмента в виде определяющей комплементарность области (CDR), одноцепочечного антитела (например, scFv), двухвалентного антитела и доменного антитела.

8. Фармацевтическая композиция согласно любому из положений 1-7, где антитело, которое специфически связывается с CD47, представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело).

9. Фармацевтическая композиция согласно любому из положений 1-8, где антитело,

которое специфически связывается с CD47, связывается с белком CD47 человека с KD менее чем приблизительно 10^{-5} М, например, менее чем приблизительно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М, или менее, или антитело, которое специфически связывается с CD47, связывается с белком CD47 человека с EC_{50} менее чем приблизительно 100 нМ, например, менее чем приблизительно 10 нМ, 1 нМ, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ, 0,1 нМ или менее.

10. Фармацевтическая композиция согласно любому из положений 1-9, где антитело, которое специфически связывается с CD47, имеет форму конъюгата антитела, содержащего антитело, которое специфически связывается с CD47, или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из положений 1-9 и конъюгированную с ним конъюгированную часть, где конъюгированная часть представляет собой метку для очистки (например, His-метка), цитотоксическое средство или поддающуюся детекции метку; предпочтительно конъюгированная часть представляет собой радиоактивный изотоп, люминесцентное вещество, окрашенное вещество, фермент или полиэтиленгликоль; или

антитело, которое специфически связывается с CD47, имеет форму мультиспецифического антитела, предпочтительно биспецифического антитела, содержащего антитело, которое специфически связывается с CD47, или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из положений 1-9, и антитело против другого антигена и/или другого антигенного эпитопа или его антигенсвязывающий фрагмент; или антитело, которое специфически связывается с CD47 имеет форму слитого белка, содержащего антитело, которое специфически связывается с CD47, или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из положений 1-9.

11. Фармацевтическая композиция согласно любому из положений 1-10, где противоопухолевое терапевтическое средство выбрано из одного или нескольких из следующих: ингибитор тирозинкиназы, ингибитор ДНК-полимеразы, антитело против CD20 человека, антитело против PDL-1 человека, антитело против PD-1 человека, антитело против CTLA-4 человека, ингибитор BCL-2, антитело против EGFR человека, антитело против HER2 человека, антитело против HER3 человека, ингибитор циклин-зависимой киназы, антитело против VEGFR2 человека, антитело против VEGF человека, ингибитор протеасом, ингибитор ангиогенеза, ингибитор белка быстро ускоряющейся фибросаркомы (RAF), акалабрутиниб, биспецифическое антитело и лекарственное средство на основе слитого белка; предпочтительно, терапевтическое средство представляет собой цетуксимаб, обинутузумаб или ритуксимаб;

предпочтительно противоопухолевое химиотерапевтическое средство выбрано из одного или нескольких из следующих: алкилирующее средство, антрациклин, антиметаболит, антибиотик, растительное и/или гормональное лекарственное средство, лекарственное средство на основе платины (например, цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин), адриамицин, циклофосфамид, таксан (например, связанный с альбумином паклитаксел, липосомальный паклитаксел и доцетаксел), этопозид, гемцитабин, пеметрексед, капецитабин, олапариб, рупапариб, нирапариб, талазопариб, флузопариб,

алкалоид барвинка, тамоксифен, магестрол, гозерелин, аспарагиназа, антинеопластическое лекарственное средство на основе фторурацила, азациитидин, цитарабин и циклоцитидин.

12. Фармацевтическая композиция согласно любому из положений 1-11, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

13. Фармацевтическая композиция согласно любому из положений 1-12, где, в расчете на массу антитела, компонент А и компонент В1 присутствуют в соотношении масс (1:5)-(5:1), например, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1;

компонент А и компонент В3 присутствуют в соотношении масс (1:5)-(5:1), например, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1;

или

компонент В2 и компонент А присутствуют в соотношении масс 1:(1-1000), предпочтительно 1:(5-500) и более предпочтительно 1:(10-100);

предпочтительно компонент А и компонент В в фармацевтической композиции имеют форму, подходящую для введения посредством внутривенного капельного вливания, подкожной инъекции, внутрикожной инъекции, внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции или внутриочаговой инъекции.

14. Набор, предпочтительно для лечения опухоли, содержащий продукт А и продукт В,

где продукт А содержит антитело, которое специфически связывается с CD47, или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из положений 1-13;

продукт В выбран из одного или нескольких из следующих: продукт В1, продукт В2 и продукт В3, где продукт В1 представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из положений 1-13 (предпочтительно, когда биспецифическое антитело представляет собой комбинацию антитела против PD-1/против CTLA4 и антитела против PD-1/против VEGFA, антитело против PD-1/против CTLA4 и антитело против PD-1/против VEGFA упакованы либо по отдельности, либо вместе), продукт В2 представляет собой противоопухолевое химиотерапевтическое средство согласно любому из положений 1-13, и продукт В3 представляет собой моноклональное антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому из положений 1-13, где продукт В1, продукт В2 и продукт В3 упакованы по отдельности или вместе;

предпочтительно набор дополнительно содержит продукт С, где продукт С представляет собой противоопухолевое терапевтическое средство согласно любому из положений 1-13, и продукт С отличен от продукта В;

предпочтительно набор дополнительно содержит вкладыш в упаковку.

15. Набор согласно положению 14, где, в расчете на массу антитела, продукт А и продукт В1 присутствуют в соотношении масс (1:5)-(5:1), например, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1;

продукт А и продукт В3 находятся в соотношении масс (1:5)-(5:1), например, 1:5,

1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1;

или

противоопухолевое химиотерапевтическое средство присутствует в единичной дозе 0,1-100 мг, 0,5-50 мг, 1-20 мг, 2-15 мг, 4-12 мг или 8-12 мг;

предпочтительно, продукт А, продукт В или продукт С в наборе имеет форму, подходящую для введения посредством внутривенного капельного вливания, подкожной инъекции, внутрикожной инъекции, внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции или внутриочаговой инъекции.

16. Способ лечения или предупреждения опухоли, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества компонента А и компонента В согласно любому из положений 1-13, где предпочтительно способ дополнительно включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества компонента С согласно любому из положений 1-13;

предпочтительно, компонент А, компонент В и компонент С вводят одновременно или последовательно; более предпочтительно, компонент А, компонент В и компонент С вводят до или после хирургического лечения и/или до или после лучевой терапии;

предпочтительно, когда компонент В представляет собой компонент В1 и/или компонент В3, компонент А или компонент В вводят в единичной дозе 0,1-100 мг, предпочтительно 1-10 мг на кг массы тела индивидуума; или компонент А или компонент В вводят в единичной дозе 10-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг или 200 мг каждому индивидууму;

предпочтительно, компонент В2 присутствует в единичной дозе 0,1-100 мг, 0,5-50 мг, 1-20 мг, 2-15 мг, 4-12 мг или 8-12 мг;

предпочтительно, дозу вводят от двух раз в сутки до приблизительно одного раза в двое суток, или один раз в 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 10 суток, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель или 6 недель;

предпочтительно, путь введения представляет собой внутривенное капельное вливание, подкожную инъекцию, внутрикожную инъекцию, внутривенную инъекцию, внутримышечную инъекцию или внутриочаговую инъекцию.

17. Фармацевтическая композиция согласно любому из положений 1-13, набор согласно положению 14 или 15, или способ согласно положению 16, где опухоль предпочтительно представляет собой опухоль, экспрессирующую CD47, и предпочтительно злокачественную опухоль; злокачественная опухоль включает солидную опухоль, гематологическую опухоль, лимфому, бластому, саркому, лейкоз или лимфоидную злокачественную опухоль, и более предпочтительно включает плоскоклеточную карциному, миелому, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточную карциному головы и шеи, глиому (например, нейроглиома и рецидивирующая глиома), острый миелоцитарный лейкоз, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, острый лимфоцитарный лейкоз, острый

миелобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелобластный лейкоз, первичную медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому, мелколимфоцитарную лимфому, богатую Т-клетками/гистиоцитами крупноклеточную В-клеточную лимфому, множественную миелому, лейкоз с белком I миелоидного лейкоза, рецидивирующую и рефрактерную периферическую Т-клеточную лимфому, миелодиспластический синдром, анапластическую крупноклеточную лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому из клеток маргинальной зоны, миелофиброз, истинную полицитемию, злокачественную опухоль костного мозга, миелопролиферативное заболевание, агрессивный системный мастоцитоз, эозинофилию, взрывающую дерматофибросаркому, хронический эозинофильный лейкоз, желудочно-кишечную злокачественную опухоль, аденокарциному желудка или аденокарциному пищеводно-желудочного перехода, рак яичника, рак печени, лимфоцитарный лейкоз, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, меланому, хондросаркому, нейробластому, аденокарциному, рак поджелудочной железы, аденокарциному панкреатических протоков, мультиформную глиобластому, рак кости, саркому Юинга, рак шейки матки, рак носоглотки, злокачественную опухоль головного мозга, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы, злокачественную опухоль кишечника, рак прямой кишки, рак ободочной и прямой кишки, рак ободочной кишки, печеночно-клеточную карциному, почечноклеточный рак, светлоклеточный почечноклеточный рак, рак головы и шеи, рак горла, гепатобилиарный рак, злокачественную опухоль центральной нервной системы, карциному пищевода, плоскоклеточную карциному пищевода, злокачественную плевральную мезотелиому, системный амилоидоз легких цепей, лимфоцитарную лимфому, миелопролиферативное новообразование, нейроэндокринную опухоль, карциному из клеток Меркеля, рак яичка и рак кожи, рак брюшины, рак фаллопиевых труб, рак уротелия, злокачественную опухоль с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или с дефектом репарации ошибочно спаренных оснований (dMMR) и мезотелиому.

18. Единичный состав, предпочтительно для лечения опухоли, содержащий 1-10000 мг (предпочтительно 10-1000 мг, и предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг или 200 мг) компонента А и компонента В согласно любому из положений 1-13,

где, когда компонент В представляет собой компонент В1 и/или компонент В3, единичный состав содержит 1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, и предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг) компонента В согласно любому из положений 1-13;

когда компонент В представляет собой компонент В2, единичный состав содержит 0,1-100 мг, 0,5-50 мг, 1-20 мг, 2-15 мг, 4-12 мг или 8-12 мг компонента В;

предпочтительно, единичный состав дополнительно содержит один или несколько из компонентов С согласно любому из положений 1-13;

где компонент А, компонент В и компонент С упакованы по отдельности.

19. Единичная дозированная единица, предпочтительно для лечения опухоли,

содержащая 0,1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, и предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг) компонента А и компонента В согласно любому из положений 1-13,

где, когда компонент В представляет собой компонент В1 и/или компонент В3, единичная дозированная единица содержит 0,1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, и предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг) компонента В согласно любому из положений 1-13;

когда компонент В представляет собой компонент В2, единичная дозированная единица содержит 0,1-100 мг, 0,5-50 мг, 1-20 мг, 2-15 мг, 4-12 мг или 8-12 мг компонента В.

В конкретном варианте осуществления противоопухолевое химиотерапевтическое средство выбрано из азациитидина, антрациклина, цитарабина, гемцитабина и циклоцитидина.

Антитело против PD-1 человека выбрано из пембролизумаба, ниволумаба, цемиплимаба, торипалимаба, синтилимаба, камрелизумаба и тислелизумаба.

Антитело против CD20 человека выбрано из ритуксимаба, обинутумаба, BCD-132, H-02, B-001, IMM-0306, ACE-1755, IMM-03, JMT-601, TXB-4BC1 и GB-4542.

Антитело против EGFR человека выбрано из цетуксимаба, панитумумаба, нецитумумаба, непидермина, нимотузумаба, амивантамаба, HS-627, амелимумаба, депатуксимаба, FmAb-2, GC-1118A, имгатузумаба, MVC-101, SCT-200, QL-1203, томозотуксимаба, JMT-101, MCLA-158, QL-1105, SYN-004, MCLA-129, WBP-297, AM-105, BH-2922, BMX-002, CMAV-017, DF-203, GB-263, JZB-29, SAN-EJ1, SFR-9X0122, UBP-1215, ABX-901, MCLA-125, TXB-4BC2, 111-In-ch806, депатуксизумаба мафодотина, DR-50201, DXL-1218, ENLS-1, FS-101 и GI-3000.

Ингибитор BCL-2 выбран из венетоклакса.

Антитело против HER2 или против HER3 выбрано из трастузумаба, трастузумаба эмтанзина, трастузумаба дерукстекана, маргетуксимаба, пертузумаба, диситамаба ведотина, U-31402, ISU-104, SIB-001, 9F7-F11, EV-20Sap, U-31402, ARX-788, BAT-8001, HL-02, TAA-013, трастузумаба дуокармазина, A-166, AU-101, AU-105, BPX-603, ISB-1302, KN-026, MB-103, MRG-002, занидатамаба, зенокутузумаба, ACE-1702, ALTP-7, B-002, BAT-8001, BAT-1006, BAY-2701439, BTRC-4017A, CAMH-2, цинребафуспа альфа, CT-0508, DP-303c, DX-126262, FS-102, FS-1502, GQ-1001, HS-630, LCB-14, M-802, MBS-301, MT-5111, NJH-395, PF-06804103, SBT-6050, SENL-006, SHRA-1201, SHRA-1811, TT-16, ZW-49 и LZM-006.

Антитело против VEGFR2 человека выбрано из рамуцирумаба, AK109, VXM-01, AVI-3207, гентуксимаба, KD-035 и JY-025.

Таксан выбран из паклитаксела, альбумин-связанного паклитаксела, липосомального паклитаксела и доцетаксела.

Ингибитор циклин-зависимой киназы выбран из пальбоциклиба, селициклиба, милциклиба, лероциклиба, абемациклиба, эбвациклиба, рибоциклиба сукцината,

трилациклиба, SHR-6390, альвоцидиба гидрохлорида, AT-7519, AZD-4573, BEY-1107, BPI-1178, CT-7001, FCN-437c, FIT-039, NUV-422, PF-07104091, XZP-3287, зотирациклиба цитрата, AGM-130, AUR-102, фадрациклиба, LY-3405105, HS-10342, ON-123300, QHRD-107, TQ-05510, воруциклиба, JS-101, ХН-30002, AZ-5576, ETH-155008, JS-104 и RMC-4550.

Ингибитор протеасом выбран из бортезомиба, карфилзомиба и иксазомиба.

Ингибитор тирозинкиназы выбран из анлотиниба, акалабрутиниба, бригатиниба, алектиниба гидрохлорида, ибрутиниба, радотиниба дигидрохлорида, босутиниба моногидрата, понатиниба гидрохлорида, кризотиниба, руксолитиниба фосфата, нилотиниба гидрохлорида гидрата, дасатиниба гидрата и иматиниба мезилата.

Лекарственное средство на основе антитела, являющегося ингибитором ангиогенеза, выбрано из бевацизумаба, рамуцирумаба и ранибизумаба.

Лекарственное средство на основе антитела, являющегося ингибитором белка быстро ускоряющейся фибросаркомы (RAF), выбрано из LY3009120, дабрафениба, вемурафениба и сорафениба.

Гормональный ингибитор выбран из дексаметазона, тамоксифена, торемифена, флутамида, нилутамида, леупролида, гозерелина, бузерелина, аминоклутетимида и формесфана.

Антитело против PD-1 человека выбрано из пембролизумаба, ниволумаба, цемиплимаба, торипалимаба, синтилимаба, камрелизумаба, тислелизумаба и пенпулимаба.

Антитело против PDL-1 человека выбрано из атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба и АК105.

Антитело против CTLA-4 человека выбрано из ZW25, ипилимумаба и тремелимумаба.

Биспецифическое антитело против PD-1/CTLA-4 человека выбрано из кадонилимаба, SI-B003, QL1706, XmAb-20717, KN046, MGD019 и MEDI5752.

Биспецифическое антитело против PD-1/VEGFA человека выбрано из АК112 (т.е. VP101(hG1DM)).

Лекарственное средство на основе платины выбрано из цисплатина (DDP), карбоплатина (CBP) и оксалиплатина (L-ОНР).

Антитело против PDL-1 человека выбрано из авелумаба, атезолизумаба, дурвалумаба, JS-003, CS-100L, LY-3300054, KD-033, СК-301, ССХ-4503, СХ-072, KN-035, HRP00052, HRP00049, FAZ-053, GR-1405, KD-005, HLX-20, KL-A167, СBT-502, STI-A1014, REMD-290, BGB-A333, BCD-135 и MCLA-1450.

Лекарственное средство на основе слитого белка выбрано из афлиберцепта, AVID200, требананиба и M7824.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство имеет форму, подходящую для инъекции, предпочтительно форму, подходящую для введения посредством подкожной инъекции, внутрикожной инъекции, внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

В рамках настоящего изобретения, если не определено иным образом, научные и

технические термины, используемые в настоящем описании, имеют значения, понятные специалистам в данной области. Кроме того, лабораторные манипуляции в области культивирования клеток, молекулярной генетики, химии нуклеиновых кислот и иммунологии, используемые в рамках настоящего описания, являются стандартными манипуляциями, широко используемыми в соответствующих областях. Между тем, для лучшего понимания настоящего изобретения определения и пояснения соответствующих терминов приведены ниже.

Как используют в рамках изобретения, термин "антигенсвязывающая область" означает белок или часть белка, которая специфически связывается с данным антигеном. Например, часть антитела, содержащая аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с антигеном и обеспечивают специфичность и аффинность в отношении антигена, упоминают как "антигенсвязывающая область". Антигенсвязывающая область, как правило, содержит одну или несколько "определяющих комплементарность областей" (CDR). Определенные антигенсвязывающие области дополнительно содержат одну или несколько "каркасных" областей (FR). CDR представляют собой аминокислотные последовательности, которые обеспечивают специфичность связывания антигена и аффинность.

Как используют в рамках изобретения, термин "антитело" относится к интактному иммуноглобулину любого изотипа или его антигенсвязывающему фрагменту, которые могут конкурировать с интактным антителом за специфическое связывание с антигеном-мишенью, и включает, например, химерные, гуманизированные, полностью гуманизированные и биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Такие "антитела" представляют собой антигенсвязывающие белки. Интактное антитело, как правило, содержит по меньшей мере две полноразмерных тяжелых цепи и две полноразмерных легких цепи, однако в некоторых случаях может содержать меньше цепей, как например, антитело, в природе существующее у животных семейства верблюдовых, которое может содержать только тяжелую цепь. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут происходить только из одного источника или могут быть "химерными", т.е. разные части антитела могут происходить из двух разных источников, как дополнительно описано ниже. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть продуцированы в гибридомах посредством технологии рекомбинантных ДНК, или посредством ферментативного или химического расщепления интактных антител. Если нет иных указаний, термин "антитело", в дополнение к антителам, содержащим две полноразмерных тяжелых цепи и две полноразмерных легких цепи, также включает их производные, варианты и фрагменты.

Как используют в рамках изобретения, термин "антигенсвязывающий фрагмент" (или сокращенно обозначаемый как "фрагмент") "антитела" или "цепи иммуноглобулина" (тяжелая или легкая цепь) включает часть антитела (как полученную, так и синтезированную), которая лишена по меньшей мере некоторых из аминокислот, присутствующих в полноразмерном антителе, но способна специфически связываться с

антигеном. Такие фрагменты являются биологически активными, поскольку они специфически связываются с антигеном-мишенью и могут конкурировать с другими антителами или их антигенсвязывающими фрагментами за специфическое связывание с данным эпитопом. В одном аспекте такие фрагменты сохраняют по меньшей мере одну CDR, присутствующую в полноразмерной легкой или тяжелой цепи антитела и в некоторых вариантах осуществления содержат единичную тяжелую и/или легкую цепь или их часть. Такие биологически активные фрагменты могут быть получены посредством технологии рекомбинантных ДНК, или, например, посредством ферментативного или химического расщепления интактных антител. Иммунологически функциональные фрагменты иммуноглобулинов включают, но не ограничиваются ими, Fab, Fab', F(ab')₂, Fab/c, dAb, Fv, доменные антитела и одноцепочечные антитела, и они могут происходить из любого источника-млекопитающего, включая, но не ограничиваясь ими, человека, мышь, крысу, животное семейства верблюдовых и кролика. Кроме того, предусматривается, что функциональная часть антитела, описанного в настоящем описании, такая как одна или несколько CDR, может быть ковалентно связана со вторым белком или микромолекулой с получением терапевтического средства, направленного на конкретную мишень в организме, тем самым имея бифункциональные терапевтические свойства или имея пролонгированное время полужизни в сыворотке, как например, в случае слитого белка.

Как используют в рамках изобретения, термины "полноразмерная цепь антитела", "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "целое антитело" используют в настоящем описании взаимозаменяемо для указания на антитело, имеющее по существу сходную структуру со структурой природного антитела или имеющее Fc-области тяжелых цепей, как определено в настоящем описании.

Термин "легкая цепь" включает полноразмерные легкие цепи и их фрагменты с достаточными последовательностями переменных областей для обеспечения специфичности связывания. Полноразмерная легкая цепь содержит домен V_L переменной области и домен C_L константной области. Домен переменной области легкой цепи находится на N-конце полипептида. Легкие цепи включают цепи каппа (κ) и лямбда (λ).

Термин "тяжелая цепь" включает полноразмерные тяжелые цепи и их фрагменты с достаточными последовательностями переменных областей для обеспечения специфичности связывания. Полноразмерная тяжелая цепь включает домен V_H переменной области и 3 домена C_{H1}, C_{H2} и C_{H3} константной области. Домен V_H находится на N-конце полипептида, и домены C_H находятся на C-конце, причем C_{H3} находится наиболее близко к C-концу полипептида. Тяжелая цепь может быть любого изотипа, включая IgG (включая подтипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgA (включая подтипы IgA1 и IgA2), IgM и IgE.

Как используют в рамках изобретения, термин "Fab-фрагмент" состоит из одной легкой цепи, C_{H1} и переменной области одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидные связи с другой молекулой тяжелой цепи.

Как используют в рамках изобретения, термин "Fc"-область включает два фрагмента

тяжелой цепи, содержащих домены C_{H1} и C_{H2} антитела. Два фрагмента тяжелой цепи удерживаются вместе посредством двух или более дисульфидных связей и посредством гидрофобного взаимодействия доменов C_{H3} .

Как используют в рамках изобретения, термин "Fab'-фрагмент" включает одну легкую цепь и часть одной тяжелой цепи (содержащую V_H -домен, C_{H1} -домен, и часть области между доменами C_{H1} и C_{H2}), так чтобы между двумя тяжелыми цепями двух Fab'-фрагментов могли образовываться межцепочечные дисульфидные связи с образованием молекулы $F(ab')_2$.

Как используют в рамках изобретения, термин " $F(ab')_2$ -фрагмент" включает две легких цепи и две тяжелых цепи, содержащих часть константной области между доменами C_{H1} и C_{H2} , так чтобы между двумя тяжелыми цепями образовывались межцепочечные дисульфидные связи. Таким образом, $F(ab')_2$ -фрагмент состоит из двух Fab'-фрагментов, удерживаемых вместе дисульфидными связями между двумя тяжелыми цепями.

Как используют в рамках изобретения, термин "Fv-область" включает переменные области тяжелых и легких цепей, но лишен константных областей.

Как используют в рамках изобретения, термин "Fd"-фрагмент относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_H и C_{H1} (Ward et al., *Nature*, 341:544-546 (1989)).

Как используют в рамках изобретения, термин "dAb"-фрагмент состоит из V_H -доменов (Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)).

Как используют в рамках изобретения, термин "Fab'-SH" представляет собой обозначение в настоящем описании для Fab', где один или несколько остатков цистеина константного домена содержат свободную тиольную группу.

Как используют в рамках изобретения, термин "Fab/c"-фрагмент относится к промежуточной структуре, образованной путем расщепления пепсином иммуноглобулина, и он сочетает в себе преимущества областей Fab и Fc, т.е. высокую диффузионную способность и низкое метаболическое выведение *in vivo*, при сохранении высокой аффинности (Liu Jianjun, *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 1989(4):29-29).

Как используют в рамках изобретения, термин "одноцепочечное антитело" относится к молекуле Fv, в которой переменные области тяжелой и легкой цепей соединены гибким линкером с образованием единой полипептидной цепи (которая образует антигенсвязывающую область) (см., например, Bird et al., *Science*, 242:423-426 (1988), и Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90:5879-5883 (1988)). Одноцепочечные антитела подробно описаны в международной публикации патента № WO 88/01649 и в патентах США № 4946778 и 5260203, содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Как используют в рамках изобретения, термин "доменное антитело" представляет собой иммунофункциональный фрагмент иммуноглобулина, который содержит только переменную область тяжелой цепи или легкой цепи, включая поливалентные доменные

антитела или двухвалентные доменные антитела. В некоторых случаях две или более областей V_H ковалентно связаны пептидным линкером с образованием поливалентного доменного антитела (в частности, двухвалентного доменного антитела). Две области V_H двухвалентного доменного антитела могут быть нацелены на один и тот же или разные антигены.

Как используют в рамках изобретения, термин "двухвалентный антигенсвязывающий белок" или "двухвалентное антитело" включает два антигенсвязывающих центра. В некоторых случаях два связывающих центра имеют одну и ту же специфичность связывания. Двухвалентное антитело может быть биспецифическим.

Как используют в рамках изобретения, термин "мультиспецифический антигенсвязывающий белок" или "мультиспецифическое антитело" представляет собой антигенсвязывающий белок или антитело, которые нацелены более чем на один антиген или эпитоп.

Как используют в рамках изобретения, термин "биспецифический", "обладающий двойной специфичностью" или "бифункциональный" антигенсвязывающий белок или антитело представляет собой гибридный антигенсвязывающий белок или антитело, имеющие два разных антигенсвязывающих центра. Биспецифическое антитело представляет собой мультиспецифический антиген-связывающий белок или мультиспецифическое антитело, и оно может быть получено различными способами, включая, но не ограничиваясь ими, слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai and Lachmann, 1990, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.*, 148:1547-1553. Два связывающих центра биспецифического антигенсвязывающего белка или антитела связывают два разных эпитопа, присутствующих в одной и той же или разных белковых мишенях.

Как используют в рамках изобретения, термины "mAb" и "моноклональное антитело" относятся к антителу или фрагменту антитела, которые происходят из группы высокомолекулярных антител, т.е. из группы идентичных молекул антител за исключением природных мутаций, которые могут возникать спонтанно. Моноклональное антитело является в высокой специфическим в отношении одного эпитопа на антигене. Поликлональное антитело, относительно моноклонального антитела, обычно содержит по меньшей мере 2 или более разных антител, которые обычно распознают разные эпитопы на антигене. Моноклональные антитела обычно могут быть получены с использованием способа гибридом, который впервые описан Kohler et al. (*Nature*, 256:495, 1975), но также могут быть получены с использованием технологии рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567).

Как используют в рамках изобретения, термин "гуманизованное антитело" относится к антителу или фрагменту антитела, полученным, когда все или часть областей CDR иммуноглобулина человека (рецепторное антитело) заменены областями CDR не являющегося человеческого антитела (донорное антитело), где донорное антитело может представлять собой не являющееся человеческим (например, мыши, крысы или кролика)

антитело, обладающее ожидаемой специфичностью, аффинностью или реактивностью. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки в каркасных областях (FR) рецепторного антитела также могут быть заменены аминокислотными остатками соответствующих не являющихся человеческими антител или аминокислотными остатками других антител для дальнейшего улучшения или оптимизации характеристик антитела. Для более подробного описания гуманизированных антител см., например, Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992); и Clark, *Immunol. Today*, 21: 397-402 (2000).

Как используют в рамках изобретения, термин "эпитоп" относится к участку на антигене, с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело. "Эпитоп" также упоминается в данной области как "антигенная детерминанта". Эпитоп или антигенная детерминанта обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты, углеводы или боковые цепи сахаров, и обычно имеет определенные трехмерные структурные характеристики и определенные зарядовые характеристики. Например, эпитоп, как правило, содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 последовательно расположенных или не последовательно расположенных аминокислот в уникальной пространственной конформации, которая может быть "линейной" или "конформационной". См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)*. В линейном эпитопе все участки взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (например, антителом) расположены линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе участки взаимодействия расположены в аминокислотных остатках белка, которые отделены друг от друга.

Термины "полипептид" или "белок" используют в настоящем описании взаимозаменяемо для указания на полимер из аминокислотных остатков. Также термин используется для указания на аминокислотный полимер, в котором один или несколько аминокислотных остатков являются аналогами или миметиками существующих в природе аминокислот, и на существующие в природе аминокислотные полимеры. Термин также может включать, например, аминокислотные полимеры, которые модифицированы присоединением сахаридных остатков с образованием гликопротеинов, или фосфорилированы. Полипептиды и белки могут быть продуцированы существующими в природе клетками и нерекомбинантными клетками, или они могут быть продуцированы генно-модифицированными или рекомбинантными клетками, и они включают молекулу, имеющую аминокислотную последовательность нативного белка, или молекулу, имеющую делеции, инсерции и/или замены одной или нескольких аминокислот в нативной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления термины "полипептид" и "белок", в частности, включают антитела, такие как антитела против CD47 человека (также упоминаемые как антитела против CD47), CD47-связывающие белки, или их варианты, например, антитела или последовательности, имеющие делеции, инсерции и/или замены

одной или нескольких аминокислот.

Термин "полипептидный фрагмент" относится к полипептиду, имеющему N-концевую делецию, C-концевую делецию и/или внутреннюю делецию по сравнению с полноразмерным белком. Такие фрагменты также могут содержать модифицированные аминокислоты по сравнению с полноразмерным белком. В определенных вариантах осуществления такие фрагменты имеют длину приблизительно от 5 до 500 аминокислот. Например, фрагмент может иметь длину по меньшей мере 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот. Пригодные полипептидные фрагменты включают иммунологически функциональные фрагменты антител, включая связывающие домены. В случае антител человека против CD47, пригодные фрагменты включают, но не ограничиваются ими, области CDR, вариабельные домены тяжелых или легких цепей, части цепей антител, вариабельные домены, содержащие строго 2 CDR, и т.п.

"Производное" полипептида представляет собой полипептид (например, антигенсвязывающий белок или антитело), который химически модифицирован способами, отличными от инсерции, делеции или замены, например, путем конъюгации с другой химической частью, например, конъюгированный с ПЭГ полипептид.

В рамках настоящего изобретения буквы перед номером положения соответствуют аминокислотам до мутации и буквы после номера положения соответствуют аминокислотам после мутации, если нет иных указаний.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения между VH и VL одноцепочечного антитела присутствует дисульфидная связь. Способы внесения дисульфидной связи между VH и VL антитела хорошо известны в данной области, см., например, US 5747654; Rajagopal et al., *Prot. Engin.* 10(1997)1453-1459; Reiter et al., *Nat. Biotechnol.* 14(1996)1239-1245; Reiter et al., *Protein Engineering* 8(1995)1323-1331; Webber et al., *Molecular Immunology* 32(1995)249-258; Reiter et al., *Immunity* 2(1995)281-287; Reiter et al., *JBC* 269(1994)18327-18331; Reiter et al., *Inter. J. of Cancer* 58(1994)142-149; или Reiter et al., *Cancer Res.* 54(1994)2714-2718, которые включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Как используют в рамках изобретения, термин "специфически связывает" относится к неслучайной реакции связывания между двумя молекулами, такой как реакция между антителом и антигеном, на который оно нацелено. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с антигеном (или антитело, которое является специфическим в отношении антигена), означает, что антитело связывается с антигеном с аффинностью (K_D) менее чем приблизительно 10^{-5} М, как например, менее чем приблизительно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М, или менее.

Как используют в рамках изобретения, термин " K_D " относится к равновесной константе диссоциации для специфического взаимодействия антитело-антиген, которая используется для описания аффинности связывания между антителом и антигеном. Среди нескольких параметров, измеряемых в кинетике молекулярного связывания, величина K_D является равновесной константой диссоциации. В исследованиях антительных

лекарственных средств она является параметром, характеризующим интенсивность аффинности между представляющим интерес антителом и молекулой антигена-мишени, и ее вычисляют по формуле: $KD = k_{dis}/k_{on}$. Меньшая равновесная константа диссоциации указывает на более интенсивное связывание антитело-антиген и более высокую аффинность между антителом и антигеном. k_{on} (константа скорости ассоциации) представляет собой скорость образования комплекса антиген-антитело, и меньшая k_{on} указывает на более быстрое связывание антитела с антигеном. k_{dis} (константа скорости диссоциации) представляет собой скорость, с которой антитело диссоциирует из комплекса антиген-антитело, и меньшая k_{dis} указывает на более медленную скорость диссоциации антитела от антигена и более прочное связывание между антителом и антигеном. Как правило, антитело связывается с антигеном (например, белком L1) с равновесной константой диссоциации (K_D) менее чем приблизительно 10^{-5} М, например, менее чем приблизительно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М, или менее, например, при определении с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на системе BIACORE или с использованием системы Fortebio.

Как используют в рамках изобретения, термины "моноклональное антитело" и "McAb" имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины "поликлональное антитело" и "PcAb" имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины "полипептид" и "белок" имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо. Помимо этого, как используют в рамках изобретения, аминокислоты обычно обозначаются посредством однобуквенных и трехбуквенных сокращений, известных в данной области. Например, аланин может быть обозначен как А или Ala.

Как используют в рамках изобретения, термины "гибридома" и "гибридная клеточная линия" могут использоваться взаимозаменяемо, и при указании на термины "гибридома" и "гибридная клеточная линия", также включаются субклоны и клетки-потомки гибридомы.

Как используют в рамках изобретения, термины "процентная идентичность последовательностей" и "процентная гомология последовательностей" используются взаимозаменяемо.

Как используют в рамках изобретения, термины "сходство", "сходство последовательностей" и "идентичность" относятся к корреляции между последовательностями двух или более белковых или полипептидных молекул при определении путем выравнивания и сравнения последовательностей. "Процентная идентичность" относится к проценту идентичных аминокислотных остатков в сравниваемых молекулах, и она может быть вычислена, исходя из размера наименьшей из подлежащих сравнению молекул. Для таких вычислений пропуски в выравнивании (при их наличии) должны вноситься с использованием конкретной математической модели или компьютерной программы (т.е. "алгоритма"). Термин "существенная идентичность" при использовании для полипептидов означает, что две пептидных последовательности при

оптимальном выравнивании, например, с использованием программ GAP или BESTFIT при использовании веса пропуска по умолчанию, предоставляемого программами, имеют идентичность последовательностей по меньшей мере 70%, 75% или 80%, идентичность последовательностей по меньшей мере 90% или 95%, или идентичность последовательностей по меньшей мере 97%, 98% или 99%. В некоторых случаях, положения остатков, которые не являются идентичными, различаются консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, когда аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим R-группу боковой цепи, которая обладает сходными химическими свойствами (например, заряд или гидрофильность). Как правило, консервативные аминокислотные замены в значительной степени сохраняют функции и свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процентная идентичность последовательностей может быть увеличена для внесения поправки на консервативную природу замены. Способы внесения такой поправки хорошо известны специалистам в данной области. См., например, Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 243:307-31 (1994). Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают следующие: 1) алифатическая гидроксильная боковая цепь: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин, 2) алифатическая гидроксильная боковая цепь: серин и треонин, 3) амидсодержащая боковая цепь: аспарагин и глутамин, 4) ароматическая боковая цепь: фенилаланин, тирозин и триптофан, 5) основная боковая цепь: лизин, аргинин и гистидин, 6) кислотная боковая цепь: аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота, и 7) серосодержащая боковая цепь: цистеин и метионин. Например, группами консервативных аминокислотных замен являются валин-лейцин-изолейцин-глицин-аланин, фенилаланин-тирозин, треонин-серин, лизин-аргинин, глутаминовая кислота-аспарагиновая кислота и аспарагин-глутамин.

Необязательно, консервативная замена представляет собой любое изменение с положительной величиной в матрице логарифмического правдоподобия RAM250, описанной в Gonnet et al., *Science*, 256:1443-45 (1992), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. "Умеренно консервативная" замена представляет собой любое изменение с неотрицательной величиной в матрице логарифмического правдоподобия RAM250.

Идентичность последовательностей полипептидов обычно измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков осуществляет выравнивание последовательностей с использованием показателя свойства, приписываемого различными заменам, делециям и другим модификациям (включая консервативные аминокислотные замены). Например, GCG, включающий программы, такие как "Gap" и "Bestfit", (с использованием параметров по умолчанию, определяемых программой), может использоваться для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами (например,

гомологичные полипептиды из разных биологических видов) или между белком дикого типа и его мутантным белком. См., например, GCG Version 6.1 (University of Wisconsin, WI). Полипептидные последовательности также могут быть сравнены с использованием FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендованными параметрами. См. GCG Version 6.10 FASTA (например, FASTA2 и FASTA3), где приводится выравнивание областей с оптимальным перекрытием между загруженными и запрашиваемыми последовательностями и процентной идентичностью последовательностей (Pearson, *Methods Enzymol.*, 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 132:185-219 (2000)). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательностей с базой данных, содержащей массивные последовательности из разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности, blastp или tblastn (с использованием параметров по умолчанию, предусматриваемых программой). См., например, Altschul et al., *Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-402 (1997).

Как используют в рамках изобретения, термин "фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент" относится к носителю и/или эксципиенту, который является фармакологически и/или физиологически совместимым с индивидуумом и активным ингредиентом. Такие носители и/или эксципиенты хорошо известны в данной области (см., например, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, edited by Gennaro AR, 19th Ed., Pennsylvania, Mack Publishing Company, 1995), включая, но не ограничиваясь ими: регуляторы pH, поверхностно-активные вещества, адъюванты и усилители ионной силы. Например, регуляторы pH включают, но не ограничиваются ими, фосфатный буфер; поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваются ими, катионные, анионные или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Tween-80; усилители ионной силы включают, но не ограничиваются ими, хлорид натрия.

Как используют в рамках изобретения, термин "эффективное количество" относится к количеству, достаточному для достижения или по меньшей мере частичного достижения желаемого эффекта. Например, профилактически эффективное количество против заболевания (например, опухоли) относится к количеству, достаточному для предупреждения, остановки или отсрочивания возникновения заболевания (например, опухоли); терапевтически эффективное количество относится к количеству, достаточному для излечения или по меньшей мере частичной остановки заболевания и его осложнений у пациентов, страдающих от заболевания.

Термин "единичная дозированная единица" означает единичную фармацевтическую дозированную форму, такую как инъекция, например, упакованную в ампулу, содержащую антитело против CD47 и комбинируемые терапевтические средства (например, биспецифическое антитело, моноклональное антитело против PD-1 и/или противоопухолевое химиотерапевтическое средство) в соответствии с настоящим изобретением для введения индивидууму в моменты времени в соответствии с режимом, предпочтительно на кг массы тела индивидуума. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения режим включает, например, введение единичной дозированной

единицы в соответствии с курсом лечения от двух раз в сутки до приблизительно одного раза в двое суток, или одного раза в 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 10 суток, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель или 6 недель.

В рамках настоящего изобретения термины "первый" (например, функциональная область первого белка или первый линкерный фрагмент) и "второй" (например, функциональная область второго белка или второй линкерный фрагмент) используются для различения или ясности выражения, и они не имеют типичных последовательных значений, если нет иных указаний.

"Терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" лекарственного средства или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при использовании отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством защищает индивидуума от возникновения заболевания или способствует регрессии заболевания, о чем свидетельствует уменьшение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания, или предупреждение повреждения или инвалидизации в результате наличия заболевания. Способность терапевтического средства способствовать регрессии заболевания можно оценивать с использованием различных способов, известных специалистам в данной области, например, у человека в клинических испытаниях, в модельной системе на животных, которая прогнозирует эффективность у человека, или путем определения активности лекарственного средства в анализе *in vitro*.

"Профилактически эффективное количество" лекарственного средства относится к любому количеству лекарственного средства, которое ингибирует возникновение или рецидив злокачественной опухоли при введении, отдельно или в комбинации с антинеопластическим средством, индивидууму, имеющему риск развития злокачественной опухоли (например, индивидуум, имеющий предзлокачественное состояние), или индивидууму, имеющему риск рецидива злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления профилактически эффективное количество полностью препятствует возникновению или рецидиву злокачественной опухоли. "Ингибирование" возникновения или рецидива злокачественной опухоли означает снижение вероятности возникновения или рецидива злокачественной опухоли или полное предупреждение возникновения или рецидива злокачественной опухоли.

По сравнению с уровнем техники, настоящее изобретение имеет следующие преимущества:

Моноклональное антитело против CD47 в соответствии с настоящим изобретением может эффективно блокировать связывание SIRP α с CD47 путем специфического связывания с CD47, тем самым способствуя фагоцитозу опухолевых клеток макрофагами, и оно может использоваться в комбинации с ингибиторами иммунной точки контроля или другими лекарственными средствами, демонстрируя лучшую противоопухолевую активность.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг.1 представлен индекс фагоцитоза для НРММ в отношении клеток Raji, опосредуемый 6F7H1L1(hG4) в комбинации с ритуксимабом.

На фиг.2 представлен индекс фагоцитоза для НРММ в отношении клеток HL-60, опосредуемый 6F7H1L1(hG4) в комбинации с азациитидином.

На фиг.3 представлена активация иммунных клеток, обеспечиваемая 6F7H1L1(hG4) в комбинации с биспецифическим антителом против PD-1/CTLA-4.

На фиг.4 представлен иммунный ответ иммунных клеток против клеток аденокарциномы легкого человека A549, обеспечиваемый 6F7H1L1(hG4) в комбинации с антителом против PD-1.

На фиг.5 представлен иммунный ответ иммунных клеток против клеток рака яичника человека SK-OV-3, обеспечиваемый 6F7H1L1(hG4) в комбинации с антителом против PD-1.

На фиг.6 представлен иммунный ответ иммунных клеток против клеток рака предстательной железы человека LNCAP, обеспечиваемый 6F7H1L1(hG4) в комбинации с антителом против PD-1.

На фиг.7 представлен индекс фагоцитоза для НРММ в отношении клеток HT-29, опосредуемый 6F7H1L1(hG4) в комбинации с цетуксимабом.

На фиг.8 представлен индекс фагоцитоза для НРММ в отношении клеток Raji, опосредуемый 6F7H1L1(hG4) в комбинации с обинутузумабом.

На фиг.9 представлена эффективность 6F7H1L1(hG4) в комбинации с биспецифическим антителом против PD-1/против CTLA-4 кадонилимабом в модели опухоли CT26-hCD47 у мышей BALB/c-hPD1/hSIRP α .

На фиг.10 представлено изменение массы тела в модели опухоли CT26-hCD47 у мышей BALB/c-hPD1/hSIRP α , которым вводили 6F7H1L1(hG4) в комбинации с биспецифическим антителом против PD-1/против CTLA-4 кадонилимабом.

На фиг.11 представлена эффективность 6F7H1L1(hG4) в комбинации с биспецифическим антителом против PD-1/против VEGFA VP101(hG1DM) в модели опухоли MDA-MB-231 у мышей SCID Beige.

На фиг.12 представлено изменение массы тела в модели опухоли MDA-MB-231 у мышей SCID Beige, которым вводили 6F7H1L1(hG4) в комбинации с биспецифическим антителом против PD-1/против VEGFA VP101(hG1DM).

Запись о депозите биологических материалов:

Гибридная клеточная линия LT012 была депонирована в China Center for Type Culture Collection (CCTCC) 21 июня 2018 года под номером CCTCC № C2018135, адрес депозитария: Wuhan University, Wuhan, Китай, почтовый индекс: 430072.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Варианты осуществления настоящего изобретения подробно описаны ниже с помощью примеров. Специалистам в данной области будет понятно, что приведенные ниже примеры приведены только для иллюстрации настоящего изобретения, и они не должны

быть истолкованы как ограничивающие объем настоящего изобретения. Примеры, где конкретные технологии или условия не указаны, осуществлены в соответствии с технологиями или условиями, описанными с публикациями данной области (например, см., *Guide to Molecular Cloning Experiments*, за авторством J. Sambrook et al., и в переводе Huang Peitang et al., третье издание, Science Press) или в соответствии с инструкциями к продукту. Используемые реагенты или инструменты являются коммерчески доступными общепринятыми продуктами, если их производители не указаны.

В приведенных ниже примерах настоящего изобретения мышей BALB/C приобретали в Guangdong Medical Laboratory Animal Center.

В приведенных ниже примерах настоящего изобретения использованные изотипические контрольные антитела, т.е. hIgG1 и hIgG4, представляли собой антитела, нацеленные на антитело человека против лизоцима куриного яйца (HEL), и последовательности переменных областей этих антител были взяты из исследования, описанного Acierno et al., под названием "Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies" (Acierno et al., *J Mol biol.*, 2007; 374(1): 130-46, где последовательность переменной области тяжелой цепи указана под SEQ ID NO: 75, и последовательность переменной области легкой цепи указана под SEQ ID NO: 76). Во фрагменте константной области hIgG1 константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig, номер доступа № P01857, и константная область легкой цепи представляет собой С-область цепи каппа Ig, номер доступа № P01834. В hIgG4 константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-4 Ig, номер доступа № P01861.1 с мутацией S228P, внесенной для повышения стабильности, и константная область легкой цепи представляет собой С-область цепи каппа Ig, номер доступа № P01834. Как hIgG1, так и hIgG4, были получены в Akeso Biopharma, Inc.

В приведенных ниже примерах настоящего изобретения использованные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) были выделены и получены Akeso Biopharma, Inc. PBMC были выделены из периферической крови здорового человека в соответствии с инструкцией реагента Ficoll-Paque™ Plus, и выделенные PBMC были подсчитаны и заморожены. Периферическую кровь здорового человека и PBMC выделяли и экстрагировали после получения информированного согласия доноров.

В приведенных ниже примерах настоящего изобретения использованные периферические макрофаги моноцитарного происхождения человека (HPMM) происходили из PBMC.

В приведенных ниже примерах настоящего изобретения последовательности легкой и тяжелой цепей биспецифического антитела против PD-1/CTLA-4 кадонилимаба, т.е. антитела CP004(hG1TM), происходили из последовательностей, приведенных в *WHO Drug Information*, Proposed INN: List 124 (*WHO Drug Information*, 2020; 34(4):947-949, где последовательность тяжелой цепи указана под SEQ ID NO: 78, и кодирующая ее нуклеотидная последовательность указана под SEQ ID NO: 77; последовательность легкой цепи указана под SEQ ID NO: 80, и кодирующая ее нуклеотидная последовательность

указана под SEQ ID NO: 79). Последовательности легкой и тяжелой цепей антитела против PD-1 антитело пенпулимаба происходили из последовательностей, приведенных в *WHO Drug Information*, Proposed INN: List 123 (*WHO Drug Information*, 2020; 34(2): 375-376, где последовательность тяжелой цепи указана под SEQ ID NO: 82, и кодирующая ее нуклеотидная последовательность указана под SEQ ID NO: 81; последовательность легкой цепи указана под SEQ ID NO: 84, и кодирующая ее нуклеотидная последовательность указана под SEQ ID NO: 83). Последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи антитела против PD-1/против VEGFA указаны под SEQ ID NO: 141 (кодируемая нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 142) и SEQ ID NO: 143 (кодируемая нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 144), соответственно.

Способы получения кадонилимаба, антитела против PD-1/против VEGFA и пенпулимаба являются следующими. Последовательность ДНК гена, кодирующего тяжелую цепь (включая константную область и переменную область), и последовательность ДНК гена, кодирующего легкую цепь (включая константную область и переменную область) антител-кандидатов клонировали по отдельности в векторы pUC57simple (предоставляемые GenScript) с получением плазмид pUC57simple-H и pUC57simple-L, соответственно. Указанные выше плазмиды подвергали ферментативному расщеплению (HindIII и EcoRI), и тяжелые и легкие цепи, выделенные посредством электрофореза, по отдельности субклонировали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 (приобретенный от Invitrogen). Рекомбинантные плазмиды экстрагировали и комбинацию pcDNA3.1-H+pcDNA3.1-L совместно трансфицировали в клетки 293F. После культивирования клеток в течение 7 суток культуру центрифугировали на высокой скорости. Супернатант концентрировали, загружали на колонку HiTrap MabSelect SuRe и очищали с использованием системы жидкостной хроматографии для очистки белков (AKTA Purifier 10, GE). Очищенный образец, т.е. антитело кадонилимаб, добавляли как в восстановленный буфер загрузки для электрофореза белков, так и в невосстановленный буфер загрузки для электрофореза белков, а затем кипятили для электрофореза SDS-PAGE. Путем скрининга и подтверждения того, соответствует ли белок теоретическому размеру, получали очищенное антитело.

Пример 1: Получение антитела 6F7 против CD47 человека

1. Получение гибридомной клеточной линии 6F7

Антиген, использованный для получения антитела против CD47 с использованием гибридомной клеточной линии 6F7, представлял собой CD47 IgV TEV-His (включая зрелый пептид CD47 человека из положений 19-141 GenbankID: NP 942088.1 и слитый белок TEV (аминокислотная последовательность: ENLYFQG, SEQ ID NO: 74)-his-метка, синтезированный Akeso Biopharma, Inc.) и клетки 3T3-CD47 (NIH/3T3, производитель: ATCC, каталожный номер №: CRL-1658; зрелым пептидом CD47 человека трансфицировали клетки на основе NIH/3T3 для конструирования клеточной линии, стабильно экспрессирующей 3T3-CD47). Клетки селезенки иммунизированных мышей

подвергали слиянию с миеломными клетками с получением гибридомных клеток. С использованием CD47 IgV TEV-His и клеток 3T3-CD47, отдельно взятых в качестве антигенов, гибридомные клетки подвергали скринингу посредством непрямого ELISA с получением гибридомных клеток, способных секретировать антитела, способные специфически связываться с CD47. Гибридомные клетки, полученные посредством скрининга ELISA, подвергали скринингу посредством конкурентного ELISA с получением гибридомной клеточной линии, способной секретировать моноклональное антитело, способное конкурировать за связывание CD47 IgV TEV-His с рецепторным SIRP α ECD человека-hFc-биотином (SIRP α ECD относится к внеклеточной области SIRP α , положения 31-373 белка GenBank под номером доступа № NP_542970.1; hFc относится к метке для очистки - Fc IgG человека, в частности к C-области цепи гамма-1 Ig, положения 114-330 GenbankID: P01857), которую затем подвергали клонированию путем разведения с получением стабильной гибридомной клеточной линии. Гибридомная клеточная линия была обозначена как гибридомная клеточная линия LT012, и моноклональное антитело, секретированное этой клеточной линией, было обозначено как 6F7.

Гибридомная клеточная линия LT012 была депонирована в China Center for Type Culture Collection (CCTCC) 21 июня 2018 года под номером CCTCC № C2018135, адрес депозитария: Wuhan University, Wuhan, Китай, почтовый индекс: 430072.

2. Получение антитела против CD47 6F7

Клеточные линии LT011, LT012 и LT015, полученные, как описано выше, по отдельности культивировали в среде с определенным химическим составом (среда CD; содержащая 1% пенициллин-стрептомицин) в инкубаторе с 5% CO₂, 37°C. Через 7 суток супернатанты собирали и очищали посредством высокоскоростного центрифугирования и вакуумной фильтрации через мембрану для микрофильтрации и через колонку HiTrap protein A HP с получением антитела 6F7.

Пример 2: Анализ последовательности антитела против CD47 6F7

мРНК экстрагировали из клеточной линии LT012, культивированной согласно примеру 1, в соответствии со способом, описанным в инструкциях к набору RNAPrep pure Cell/Bacteria Kit (Tiangen, каталожный номер № DP430).

кДНК синтезировали в соответствии с инструкциями Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System для ОТ-ПЦР и амплифицировали посредством ПЦР.

Амплифицированные способом ПЦР продукты прямо подвергали ТА-клонированию в соответствии с инструкциями набора pEASY-T1 Cloning Kit (Transgen CT101).

ТА-клонированные продукты прямо секвенировали, и результаты секвенирования являются следующими:

Последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области тяжелой цепи приведена под SEQ ID NO: 1 с длиной 351 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность приведена под SEQ ID NO: 2 с длиной 117 а.к., и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи приведены под

SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты вариательной области легкой цепи приведена под SEQ ID NO: 3 с длиной 321 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность приведена под SEQ ID NO: 4 с длиной 107 а.к., и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи приведены под SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно.

Пример 3: Конструирование и получение легких и тяжелых цепей гуманизированных антител против CD47 человека 6F7 H1L1(hG4), 6F7 H2L2(hG4) и 6F7 H3L3(hG4)

1. Конструирование легких и тяжелых цепей гуманизированных антител против CD47 человека 6F7 H1L1(hG4), 6F7 H2L2(hG4) и 6F7 H3L3(hG4)

На основе трехмерной кристаллической структуры белка CD47 человека (Hage T, Reinemer P, Sebald W., Crystals of a 1:1 Complex Between Human Interleukin-4 and the Extracellular Domain of Its Receptor Alpha Chain, *Eur. J. Biochem.*, 1998; 258(2):831-6.) и последовательности антитела 6F7, полученного согласно примеру 2, получали последовательности вариательных областей антител 6F7 H1L1, 6F7 H2L2 и 6F7 H3L3 посредством компьютерного моделирования и разработки мутаций (последовательности константных областей антител из базы данных NCBI: константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-4 Ig, номер доступа № P01861.1 с внесенной мутацией S228P для повышения стабильности посредством этого; константная область легкой цепи представляет собой С-область цепи каппа Ig, номер доступа № P01834). Интактные антитела, содержавшие константные области, были обозначены как 6F7 H1L1(hG4), 6F7 H2L2(hG4) и 6F7 H3L3(hG4), соответственно.

Сконструированные последовательности вариательных областей являются следующими:

(1) Последовательности вариательных областей тяжелых и легких цепей гуманизированного моноклонального антитела 6F7 H1L1

Последовательность нуклеиновой кислоты вариательной области тяжелой цепи указана под SEQ ID NO: 11 с длиной 351 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность указана под SEQ ID NO: 12 с длиной 117 а.к., и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи указаны под SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты вариательной области легкой цепи указана под SEQ ID NO: 13 с длиной 321 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность указана под SEQ ID NO: 14 с длиной 107 а.к., и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи указаны под SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно.

(2) Последовательности вариательных областей тяжелой и легкой цепей гуманизированного моноклонального антитела 6F7 H2L2

Последовательность нуклеиновой кислоты вариательной области тяжелой цепи

указана под SEQ ID NO: 15 с длиной 351 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность указана под SEQ ID NO: 16 с длиной 117 а.к., и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи указаны под SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области легкой цепи указана под SEQ ID NO: 17 с длиной 321 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность указана под SEQ ID NO: 18 с длиной 107 а.к., и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи указаны под SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно.

(3) Последовательности варибельных областей тяжелой и легкой цепей гуманизированного моноклонального антитела 6F7 H3L3

Последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области тяжелой цепи указана под SEQ ID NO: 19 с длиной 351 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность указана под SEQ ID NO: 20 с длиной 117 а.к., и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи указаны под SEQ ID NO: 5, 6 и 7, соответственно.

Последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области легкой цепи указана под SEQ ID NO: 21 с длиной 321 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность указана под SEQ ID NO: 22 с длиной 107 а.к., и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи указаны под SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно.

2. Получение гуманизированных антител 6F7 H1L1(hG4), 6F7 H2L2(hG4) и 6F7 H3L3(hG4)

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 6F7H1L1(hG4), кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 6F7H2L2(hG4), и кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 6F7H3L3(hG4) по отдельности клонировали в векторы pUC57simple (предоставленные Genscript) с получением pUC57simple-6F7H1(hG4) и pUC57simple-6F7L1, pUC57simple-6F7H2(hG4) и pUC57simple-6F7L2, и pUC57simple-6F7H3(hG4) и pUC57simple-6F7L3, соответственно. С использованием стандартных способов, описанных в *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition), полноразмерные гены тяжелых и легких цепей, синтезированные путем расщепления генов посредством EcoRI и HindIII, субклонировали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 с использованием фермента рестрикции EcoRI и HindIII с получением экспрессирующих плазмид pcDNA3.1-6F7H1(hG4) и pcDNA3.1-6F7L1, pcDNA3.1-6F7H2(hG4) и pcDNA3.1-6F7L2, и pcDNA3.1-6F7H3(hG4) и pcDNA3.1-6F7L3, и гены тяжелых и легких цепей рекомбинантных экспрессирующих плазмид далее секвенировали. Затем комбинации сконструированных генов, содержавшие соответствующие рекомбинантные плазмиды легких и тяжелых цепей (pcDNA3.1-6F7H1(hG4)/pcDNA3.1-6F7L1, pcDNA3.1-6F7H2(hG4)/pcDNA3.1-6F7L2, и pcDNA3.1-6F7H3(hG4)/pcDNA3.1-6F7L3) по отдельности совместно трансфицировали в клетки 293F, и культуры собирали и очищали. После подтверждения последовательности получали

свободные от эндотоксинов экспрессирующие плазмиды и временно трансфицировали в клетки НЕК293 для экспрессии антитела. Культуры собирали через 7 суток и подвергали аффинной очистке на колонке с белком А (MabSelect SURE (GE)) с получением гуманизированных антител.

Пример 4: Конструирование и получение легких и тяжелых цепей гуманизированных антител против CD47 человека 6F7 H1L1(G1M), 6F7 H2L2(G1M) и 6F7 H3L3(G1M)

1. Конструирование легких и тяжелых цепей гуманизированных антител против CD47 человека 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) и 6F7 H3L3(G1)

На основе трехмерной кристаллической структуры белка CD47 человека (Hage T, Reinemer P, Sebald W., Crystals of a 1:1 Complex Between Human Interleukin-4 and the Extracellular Domain of Its Receptor Alpha Chain, *Eur. J. Biochem.*, 1998; 258(2):831-6) и последовательности антитела 6F7, полученного согласно примеру 2, получали последовательности переменных областей антител 6F7 H1L1, 6F7 H2L2 и 6F7 H3L3 посредством компьютерного моделирования и разработки мутаций (последовательности константных областей антител из базы данных NCBI: константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig, номер доступа № P01857; константная область легкой цепи представляет собой С-область цепи каппа Ig, номер доступа № P01834). Для отличия от гуманизированных антител согласно примеру 3, гуманизированные антитела, указанные выше, были обозначены как 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) и 6F7 H3L3(G1), соответственно.

Последовательности переменных областей гуманизированных антител 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) и 6F7 H3L3(G1), сконструированные согласно этому примеру, были идентичными последовательностям 6F7 H1L1(hG4), 6F7 H2L2(hG4) и 6F7 H3L3(hG4) согласно примеру 3.

2. Получение гуманизированных антител 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) и 6F7 H3L3(G1)

На основе 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) и 6F7 H3L3(G1) были получены новые гуманизированные антитела путем внесения точковой мутации лейцина на аланин в положении 234 (L234A, в соответствии с системой нумерации EU) и точковой мутации в положении 235 (L235A, в соответствии с системой нумерации EU) в шарнирной области тяжелой цепи, и они были обозначены как 6F7 H1L1(G1M), 6F7 H2L2(G1M) и 6F7 H3L3(G1M), соответственно.

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 6F7H1L1(G1M), кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 6F7H2L2(G1M), и кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 6F7H3L3(G1M) по отдельности клонировали в векторы pUC57simple (предоставленные Genscript) с получением pUC57simple-6F7H1(G1M) и pUC57simple-6F7L1, pUC57simple-6F7H2(G1M) и pUC57simple-6F7L2, и pUC57simple-6F7H3(G1M) и pUC57simple-6F7L3, соответственно. С использованием стандартных способов, описанных в *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition), полноразмерные гены тяжелых и легких цепей,

синтезированные путем расщепления генов посредством EcoRI и HindIII, субклонировали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 с использованием фермента рестрикции EcoRI и HindIII с получением экспрессирующих плазмид pcDNA3.1-6F7H1(G1M) и pcDNA3.1-6F7L1, pcDNA3.1-6F7H2(G1M) и pcDNA3.1-6F7L2, и pcDNA3.1-6F7H3(G1M) и pcDNA3.1-6F7L3, и гены тяжелых и легких цепей рекомбинантных экспрессирующих плазмид далее секвенировали. Затем комбинации сконструированных генов, содержавшие соответствующие рекомбинантные плазмиды легких и тяжелых цепей (pcDNA3.1-6F7H1(G1M)/pcDNA3.1-6F7L1, pcDNA3.1-6F7H2(G1M)/pcDNA3.1-6F7L2, и pcDNA3.1-6F7H3(G1M)/pcDNA3.1-6F7L3) по отдельности совместно трансфицировали в клетки 293F, и культуры собирали и очищали. После подтверждения последовательности получали свободные от эндотоксинов экспрессирующие плазмиды и временно трансфицировали в клетки HEK293 для экспрессии антитела. Культуры собирали через 7 суток и подвергали аффинной очистке на колонке с белком А (MabSelect SURE (GE)) с получением гуманизированных антител.

Пример 5: Фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами, обеспечиваемый 6F7H1L1(hG4) в комбинации с ритуксимабом или азациитидином

Материалы: азациитидин (приобретенный от Baxter Oncology GmbH); Hu5F9-G4 (предоставленный Akeso Biopharma, Inc.); клетки Raji (Chinese Academy of Sciences Shanghai Branch); клетки HL-60 (ATCC); RPMI 1640 (Gibco, каталожный номер № 22400-105); панкреатин (0,25% Trypsin-EDTA (1×)) (Gibco, каталожный номер № 25200072); эмбриональная телячья сыворотка (FBS; Excell bio, каталожный номер № FSP500); флуоресцентный краситель 56-карбоксихлорофлуоресцеин диацетатсукцинимидиловый эфир (CFSE; Biolegend, каталожный номер № 423801); рекомбинантный макрофагальный колониестимулирующий фактор человека (M-CSF человека; PeproTech, каталожный номер № 300-25); антитело против CD11c человека APC (Biolegend, каталожный номер № 301614); изотипический контроль (IgG4 человека; предоставленный Akeso Biopharma, Inc.); ритуксимаб (Roche); BSA (Sigma, каталожный номер № V900933-1KG); Ficoll raque plus (GE, каталожный номер № 17-1440-02).

Периферические макрофаги моноцитарного происхождения человека (HPMM) получали путем индукции PBMC. Замороженные PBMC размораживали общепринятыми способами и инкубировали в инкубаторе в течение ночи. На следующие сутки PBMC собирали, центрифугировали при $170 \times g$ в течение 5 мин, ресуспендировали в среде 1640, содержащей 2% FBS, и инкубировали в инкубаторе в течение 2 ч. Супернатант удаляли и клетки промывали два раза посредством PBS. Добавляли полную среду 1640 (содержавшую 10% FBS) и 100 нг/мл M-CSF человека, и клетки индуцировали в течение 7 суток. Среду заменяли и добавляли 100 нг/мл M-CSF человека на сутки 3 и 5. После завершения индукции на 7 сутки HPMM собирали и центрифугировали при $170 \times g$ в течение 5 мин. Супернатант удаляли и клетки ресуспендировали в полной среде 1640 (содержавшей 10% FBS), с доведением клеточной плотности до 1×10^{10} клеток/мл. Затем клетки распределяли аликвотами в 1,5-мл EP-пробирки для последующего применения.

1. Фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами, обеспечиваемый 6F7H1L1(hG4) в комбинации с ритуксимабом

Задача: в этом исследовании сравнивали эффекты 6F7H1L1(hG4) в комбинации с ритуксимабом и 6F7H1L1(hG4) отдельно на антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), опосредуемый клетками лимфомы Беркитта человека Raji, на цитологическом уровне *in vitro*. В данной системе анализа НРММ использовали в качестве эффекторных клеток и клетки лимфомы Беркитта Raji использовали в качестве клеток-мишеней.

Методики: клетки Raji на логарифмической фазе собирали общепринятыми способами, центрифугировали при $170 \times g$ в течение 5 мин, ресуспендировали, а затем промывали один раз PBS. Клетки Raji ресуспендировали в CFSE (2,5 мкМ) до плотности окрашивания 1×10^7 клеток/мл и инкубировали в инкубаторе в течение 20 мин. Добавляли 6 мл полной среды 1640 для остановки окрашивания. Клетки центрифугировали при $170 \times g$ в течение 5 мин и супернатант удаляли. Затем добавляли 1 мл полной среды 1640 для ресуспендирования и клетки инкубировали в инкубаторе в течение 10 мин. Антитела разбавляли полной средой 1640 до рабочей концентрации, представленной на фигуре, и создавали группу изотипического контрольного антитела (антитело против HEL, IgG4 человека). Антитела и клетки-мишени добавляли в EP-пробирки, содержавшие НРММ, в соотношении по объему 1:1 (конечный объем составлял 100 мкл, соотношение эффектора и мишени составляло $5 \times 10^4:1,5 \times 10^5$), и смеси хорошо перемешивали для ресуспендирования и инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 2 ч. В каждую пробирку добавляли 800 мкл 1% PBSA (PBS, содержащий 1% BSA) при комнатной температуре, и систему центрифугировали при $1200 \times g$ в течение 5 мин, и супернатант удаляли. Клетки промывали один раз 800 мкл 1% PBSA. Антитело против CD11c человека APC (Biolegend, партия номер № 371506; разбавленное в 400 раз 1% PBSA) добавляли к соответствующим образцам в количестве 100 мкл/образец для мечения, и образцы инкубировали на льду в течение 40 мин. В каждую пробирку добавляли 800 мкл 1% PBSA. Смесь центрифугировали при $1200 \times g$ в течение 5 мин и супернатант удаляли. Клетки промывали один раз посредством 800 мкл 1% PBSA. В каждую пробирку добавляли 200 мкл 1% PBSA для ресуспендирования и проводили детекцию клеток на проточном цитометре FACS Calibur. Макрофаги в системе были APC-CD11b⁺-положительными, и макрофаги, вовлеченные в фагоцитоз, были дважды положительными по APC-CD11b⁺ и CFSE⁺. Индекс фагоцитоза определяли в качестве соотношения количества дважды положительных клеток и количества APC-положительных клеток, и оценивали активность опосредуемого антителом ADCP. Активность ADCP в каждой группе, представленная в качестве P%, вычисляли по следующей формуле:

$$P\% = \frac{\text{Количество макрофагов, вовлеченных в фагоцитоз}}{\text{Общее количество макрофагов}} \times 100\%$$

Результаты: в этом исследовании активность фагоцитоза (ADCP), опосредуемую 6F7H1L1(hG4) в комбинации с ритуксимабом, определяли с использованием НРММ в качестве эффекторных клеток и клеток Raji в качестве клеток-мишеней. Результаты, как

показано в (ошибка, источник ссылки не найден), продемонстрировали, что индекс фагоцитоза для ритуксимаба и 6F7H1L1(hG4) был значительно более высоким, чем у пустого контроля и изотипического контроля (IgG4 человека), что указывает на то, что ритуксимаб и 6F7H1L1(hG4) обладают активностью ADCP. Индексы фагоцитоза 6F7H1L1(hG4) в комбинации с ритуксимабом были значительно более высокими, чем у 6F7H1L1(hG4), что указывает на то, что активность ADCP у 6F7H1L1(hG4) в комбинации с ритуксимабом является более высокой, чем в случае монотерапии.

2. Фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами, обеспечиваемый 6F7H1L1(hG4) в комбинации с азацитидином

Задача: в этом исследовании сравнивали эффекты 6F7H1L1(hG4) в комбинации с азацитидином и 6F7H1L1(hG4) отдельно на антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), опосредуемый клетками острый миелоцитарного лейкоза (AML) HL-60, на цитологическом уровне *in vitro*. В данной системе анализа НРММ использовали в качестве эффекторных клеток, и клетки AML HL-60, обработанные разными концентрациями азацитина, использовали в качестве клеток-мишеней.

Методики: клетки HL-60 собирали общепринятыми способами и высевали в 6-ячеечный планшет в количестве 4×10^5 клеток/2 мл полной среды 1640 на лунку. Добавляли различные концентрации азацитина (в рабочих концентрациях 3 мкМ или 1 мкМ). Получали пустую группу HL-60. Клетки инкубировали в инкубаторе в течение 24 ч. На следующие сутки обработанные и пустые клетки HL-60 собирали, центрифугировали при $170 \times g$ в течение 5 мин, ресуспендировали и подсчитывали. Затем клетки анализировали в отношении жизнеспособности и промывали один раз PBS. CFSE разбавляли до 2,5 мкМ посредством PBS. Клетки HL-60 ресуспендировали в разбавленном CFSE при плотности окрашивания 1×10^7 клеток/мл и инкубировали в инкубаторе в течение 20 мин. Добавляли 6 мл полной среды 1640 (содержавшей 10% FBS) для остановки окрашивания. Клетки центрифугировали при $170 \times g$ в течение 5 мин, и супернатант удаляли. Затем добавляли 1 мл полной среды 1640 для ресуспендирования и клетки инкубировали в инкубаторе в течение 10 мин. Антитела разбавляли полной средой 1640 до 20 мкг/мл и 2 мкг/мл (рабочие концентрации составляли 10 мкг/мл и 1 мкг/мл) и создавали группу изотипического контрольного антитела (антитело против HEL, IgG4 человека). Антитела и клетки-мишени добавляли в планшеты с V-образным дном, содержавшие НРММ (конечный объем составлял 100 мкл, соотношение эффектора и мишени составляло $5 \times 10^4:1,5 \times 10^5$), и смеси хорошо перемешивали для ресуспендирования и инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 2 ч. В каждую ячейку добавляли 150 мкл 1% PBSA (PBS, содержащий 1% BSA) при комнатной температуре, и систему центрифугировали при $1000 \times g$ в течение 5 мин, и супернатант удаляли. Клетки промывали один раз 200 мкл 1% PBSA. Антитело против CD11c человека APC (разбавленное в 400 раз 1% PBSA) добавляли к соответствующим образцам в количестве 100 мкл/образец для мечения, и образцы инкубировали на льду в течение 40 мин. В каждую ячейку добавляли 150 мкл 1% PBSA. Смесь центрифугировали при $1000 \times g$ в течение 5 мин и супернатант удаляли. Клетки промывали один раз

посредством 200 мкл 1% PBSA. В каждую ячейку добавляли 200 мкл 1% PBSA для ресуспендирования и проводили детекцию клеток на проточном цитометре FACS Calibur. Макрофаги в системе были APC-CD11b⁺-положительными, и макрофаги, вовлеченные в фагоцитоз, были дважды положительными по APC-CD11b⁺ и CFSE⁺. Индекс фагоцитоза определяли в качестве соотношения количества дважды положительных клеток и количества APC-положительных клеток, и оценивали активность опосредуемого антителом ADCP. Активность ADCP в каждой группе, представленную в качестве P%, вычисляли по формуле, представленной в (1) этого примера.

Результаты: в этом исследовании анализ активности ADCP у 6F7H1L1(hG4) в комбинации с азациитидином, проводили с использованием Hu5F9-G4, нацеленного на CD47, в качестве положительного контроля, HPMM в качестве эффекторных клеток и клеток HL-60 в качестве клеток-мишеней. Результаты, как показано в (ошибка, источник ссылки не найден), продемонстрировали, что индекс фагоцитоза для азациитидина, 6F7H1L1(hG4) и Hu5F9-G4 был значительно более высоким, чем у пустого контроля и изотипического контроля (IgG4 человека), что указывает на то, что азациитидин, 6F7H1L1(hG4) и Hu5F9-G4 обладают профагоцитарной активностью. Индекс фагоцитоза у 6F7H1L1(hG4) и Hu5F9-G4 в комбинации с азациитидином был значительно более высоким, чем в случае монотерапии антителами, что указывает на то, что активность ADCP у 6F7H1L1(hG4) и Hu5F9-G4 в комбинации с азациитидином является более высокой, чем в случае монотерапии антителами. По сравнению с контрольным антителом Hu5F9-G4 к той же мишени, активность ADCP 6F7H1L1(hG4) в комбинации с азациитидином была сравнимой с активностью Hu5F9-G4 в комбинации с азациитидином.

Пример 6: Активация иммунных клеток, обеспечиваемая 6F7H1L1(hG4) в комбинации с биспецифическим антителом против PD-1/CTLA-4 или антителом против PD-1

Материалы: PBMC (выделенные и подготовленные Akeso Biopharma, Inc.); клетки A549 (Cell Center of the Chinese Academy of Sciences, каталожный номер № KCB-200434YJ); клетки SK-VO-3 (ATCC, каталожный номер № HTB-77); клетки HL-60 (ATCC, каталожный номер № CCL-240); LNCAP (Chinese Academy of Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences Cell Center); клетки Raji-PDL1 (сконструированные Akeso Biopharma, Inc., посредством конструирования лентивирусного вектора PDL-1, инфицирования клеток Raji после инкапсулирования вируса и скрининга с бластицидином с использованием общепринятых методик); среда DMEM (Gibco, каталожный номер № 11995-081); трипсин-EDTA (0,25%); феноловый красный (Gibco, каталожный номер № 25200072); среда RPMI 1640 (Gibco, каталожный номер № 22400-105); бластицидин (Gibco, каталожный номер № R210-01); FBS (Excell bio, каталожный номер № FSP500); SEB (энтеротоксин *Staphylococcus aureus*; Dianotech, каталожный номер № S010201); MMC (митомицин C; Stressmarq, каталожный номер № SIH-246); Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, каталожный номер № 17-1440-02); набор ELISA для IL-2 человека (Dakewe, каталожный номер № 1110202), набор ELISA для IFN-γ человека (Dakewe, каталожный номер № 1110002); изотипический

контроль (IgG1 человека или изотипический контроль против HEL).

1. Активация иммунных клеток, обеспечиваемая 6F7H1L1(hG4) в комбинации с биспецифическим антителом против PD-1/CTLA-4

Задача: в этом исследовании сравнивали активность 6F7H1L1(hG4) в комбинации с биспецифическим антителом против PD-1/CTLA-4 (кадонилимаб) и 6F7H1L1(hG4) отдельно в отношении индукции иммунного ответа иммунных клеток против клеток лимфомы Беркитта человека Raji-PDL1, сверхэкспрессирующих PDL-1 человека, на цитологическом уровне *in vitro*.

Методики: клетки Raji-PDL1 культивировали общепринятым образом в полной среде 1640+10% FBS. PBMC размораживали и активировали посредством 0,5 мкг/мл SEB в течение двух суток. В день эксперимента клетки Raji-PDL1 обрабатывали 2 мкг/мл MMC в течение 1 ч. SEB-активированные PBMC и обработанные MMC клетки Raji-PDL1 собирали, промывали два раза PBS, ресуспендировали в полной среде 1640+10% FBS и подсчитывали. Клетки Raji-PDL1 и PBMC высевали в 96-луночные планшеты в количестве 1×10^5 клеток/луночка. Добавляли разбавленное антитело в соответствии со схемой исследования. Смесь перемешивали равномерно и инкубировали в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C в течение 3 суток. Через 3 суток супернатант клеточной культуры собирали и анализировали в отношении IL-2 и IFN-γ в соответствии с инструкциями набора для ELISA (Dakewe Biotech Co., Ltd.). Среда в этом исследовании во всех случаях представляла собой 10% FBS+1640.

Результаты: результаты, как показано на фиг.3, продемонстрировали, что монотерапия 6F7H1L1(hG4) или биспецифическим антителом против PD-1/CTLA-4 может в значительной степени стимулировать секрецию IFN-γ в PBMC, в то время как 6F7H1L1(hG4) в комбинации с биспецифическим антителом против PD-1/CTLA-4 продемонстрировало лучшую активность относительно монотерапий, т.е. в большей степени усиливает иммунный ответ иммунных клеток против клеток лимфомы Беркитта человека Raji-PDL1.

2. Активация иммунных клеток, обеспечиваемая 6F7H1L1(hG4) в комбинации с антителом против PD-1

(1) Иммунный ответ иммунных клеток против клеток аденокарциномы легкого человека A549, обеспечиваемый 6F7H1L1(hG4) в комбинации с антителом против PD-1

Задача: в этом исследовании сравнивали активность 6F7H1L1(hG4) в комбинации с антителом против PD-1 (пенпулимаб) и 6F7H1L1(hG4) отдельно в отношении индукции иммунного ответа иммунных клеток против клеток Raji-PDL1 и клеток аденокарциномы легкого человека A549 на цитологическом уровне *in vitro*.

Методики: клетки Raji-PDL1 культивировали общепринятым образом в полной среде 1640+10% FBS и клетки A549 культивировали общепринятым образом в полной среде DMEM+10% FBS. PBMC размораживали и активировали посредством 0,5 мкг/мл SEB в течение двух суток. В день эксперимента клетки Raji-PDL1 обрабатывали 2 мкг/мл MMC

в течение 1 ч. SEB-активированные PBMC и обработанные MMC клетки Raji-PDL1 собирали, промывали два раза PBS, ресуспендировали в полной среде 1640+10% FBS и подсчитывали. Клетки Raji-PDL1 и PBMC высевали в 96-луночные планшеты в количестве 1×10^5 клеток/лунка. Клетки A549 на логарифмической фазе собирали и высевали на 96-луночный планшет в количестве 5×10^4 клеток/лунка. Добавляли разбавленное антитело в соответствии со схемой исследования. Смесь перемешивали равномерно и инкубировали в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C в течение 3 суток. Через 3 суток супернатант клеточной культуры собирали и анализировали в отношении IL-2 и IFN-γ в соответствии с инструкциями набора для ELISA. Среда в этом исследовании во всех случаях представляла собой 10% FBS+1640.

Результаты: результаты, как показано на фиг.4, продемонстрировали, что монотерапия 6F7H1L1(hG4) или антителом против PD-1 может в значительной степени стимулировать секрецию IFN-γ в PBMC, в то время как 6F7H1L1(hG4) в комбинации с антителом против PD-1 продемонстрировало лучшую активность относительно монотерапий, т.е. в большей степени усиливает иммунный ответ иммунных клеток против клеток аденокарциномы легкого человека A549.

(2) Иммунный ответ иммунных клеток против клеток рака яичника человека SK-OV-3, обеспечиваемый 6F7H1L1(hG4) в комбинации с антителом против PD-1

Задача: в этом исследовании сравнивали активность 6F7H1L1(hG4) в комбинации с антителом против PD-1 (пенпулимаб) и 6F7H1L1(hG4) отдельно в отношении индукции иммунного ответа иммунных клеток против клеток Raji-PDL1 и клеток рака яичника SK-OV-3 на цитологическом уровне *in vitro*.

Методики: клетки Raji-PDL1 культивировали общепринятым образом в полной среде 1640+10% FBS и клетки SK-OV-3 культивировали общепринятым образом в полной среде МакКоя 5А (модифицированная) + 10% FBS. PBMC размораживали и активировали посредством 0,5 мкг/мл SEB в течение двух суток. В день эксперимента клетки Raji-PDL1 обрабатывали 2 мкг/мл MMC в течение 1 ч. SEB-активированные PBMC и обработанные MMC клетки Raji-PDL1 собирали, промывали два раза PBS, ресуспендировали в полной среде 1640+10% FBS и подсчитывали. Клетки Raji-PDL1 и PBMC высевали в 96-луночные планшеты в количестве 1×10^5 клеток/лунка. Клетки SK-OV-3 на логарифмической фазе собирали и высевали на 96-луночный планшет в количестве 5×10^4 клеток/лунка. Добавляли разбавленное антитело в соответствии со схемой исследования. Смесь перемешивали равномерно и инкубировали в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C в течение 3 суток. Через 3 суток супернатант клеточной культуры собирали и анализировали в отношении IL-2 и IFN-γ в соответствии с инструкциями набора для ELISA. Среда в этом исследовании во всех случаях представляла собой 10% FBS+1640.

Результаты: результаты, как показано на фиг.5, продемонстрировали, что монотерапия 6F7H1L1(hG4) или антителом против PD-1 может в значительной степени стимулировать секрецию IL-2 в PBMC, в то время как 6F7H1L1(hG4) в комбинации с антителом против PD-1 продемонстрировало лучшую активность относительно

монотерапий, т.е. в большей степени усиливает иммунный ответ иммунных клеток против клеток рака яичника человека SK-OV-3.

(3) Иммунный ответ иммунных клеток против клеток рака предстательной железы человека LNCAP, обеспечиваемый 6F7H1L1(hG4) в комбинации с антителом против PD-1

Задача: в этом испытании сравнивали активность 6F7H1L1(hG4) в комбинации с антителом против PD-1 (пенпулимаб) и 6F7H1L1(hG4) отдельно в отношении индукции иммунного ответа иммунных клеток против клеток Raji-PDL1 и рака предстательной железы человека LNCAP на цитологическом уровне *in vitro*.

Методология: клетки Raji-PDL1 культивировали общепринятым образом в полной среде 1640+10% FBS и клетки LNCAP культивировали общепринятым образом в полной среде RPMI-1640+10% FBS. PBMC размораживали и активировали посредством 0,5 мкг/мл SEB в течение двух суток. В день эксперимента клетки Raji-PDL1 обрабатывали 2 мкг/мл MMC в течение 1 ч. SEB-активированные PBMC и обработанные MMC клетки Raji-PDL1 собирали, промывали два раза PBS, ресуспендировали в полной среде 1640+10% FBS и подсчитывали. Клетки Raji-PDL1 и PBMC высевали в 96-луночные планшеты в количестве 1×10^5 клеток/луночка. Клетки LNCAP на логарифмической фазе собирали и высевали на 96-луночный планшет в количестве 5×10^4 клеток/луночка. Добавляли разбавленное антитело в соответствии со схемой исследования. Смесь перемешивали равномерно и инкубировали в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C в течение 3 суток. Через 3 суток супернатант клеточной культуры собирали и анализировали в отношении IL-2 и IFN- γ в соответствии с инструкциями набора для ELISA. Среда в этом исследовании во всех случаях представляла собой 10% FBS+1640.

Результаты: результаты, как показано на фиг.6, продемонстрировали, что монотерапия 6F7H1L1(hG4) или антителом против PD-1 может в значительной степени стимулировать секрецию IL-2 в PBMC, в то время как 6F7H1L1(hG4) в комбинации с антителом против PD-1 продемонстрировало лучшую активность относительно монотерапий, т.е. в большей степени усиливает иммунный ответ иммунных клеток против клеток рака предстательной железы человека LNCAP.

Пример 7: Фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами, обеспечиваемый 6F7H1L1(hG4) в комбинации с цетуксимабом

PBMC (полученные в Akeso Biopharma, Inc., партия номер № 20200521-E) размораживали и инкубировали с полной средой 1640+10% FBS (Excell bio, каталожный номер № FSP500, партия номер № 11I025) в течение ночи. На следующие сутки среду заменяли на полную среду 1640+2% FBS, и клетки инкубировали со средой в течение 2 ч. Супернатант удаляли и клетки промывали два раза PBS и инкубировали в инкубаторе (90% 1640+10% FBS+M-CSF-100 нг/мл) для индукции взрослых макрофагов человека (HPMM, полученные в Akeso Biopharma, Inc.). Среду заменяли и обработку проводили на 3 и 5 сутки. Эксперимент проводили на 7 сутки индукции.

Клетки HT-29 (Chinese Academy of Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences

Cell Center, каталожный номер № TCHu103) собирали общепринятым образом, центрифугировали при $170 \times g$ в течение 5 мин, ресуспендировали, а затем подсчитывали. Затем клетки анализировали в отношении жизнеспособности и промывали один раз PBS. CFSE (Biolegend, каталожный номер № 423801) разбавляли до 2,5 мкМ посредством PBS. Клетки ресуспендировали в надлежащем количестве разбавленного CFSE до плотности окрашивания 1×10^7 клеток/мл и инкубировали в инкубаторе в течение 20 мин. Добавляли 6 мл полной среды 1640 (содержавшей 10% FBS) для остановки окрашивания. Клетки центрифугировали при $170 \times g$ в течение 5 мин, и супернатант удаляли. Добавляли 1 мл полной среды 1640 и клетки инкубировали в инкубаторе в течение 10 мин, ресуспендировали и подсчитывали. Корректировали количество клеток.

6F7H1L1(hG4) и цетуксимаб (полученный в Akeso Biopharma, Inc., партия номер № 20200917) разбавляли до желаемых концентраций полной средой 1640 и создавали группу изотипического контрольного антитела. Макрофаги человека собирали и центрифугировали при $7170 \times g$ в течение 5 мин и супернатант удаляли. Клетки подсчитывали, переносили в 1,5-мл EP-пробирки и центрифугировали при $1200 \times g$ в течение 5 мин, и супернатант удаляли. В 1,5-мл EP-пробирки, содержавшие макрофаги, добавляли суспензию опухолевых клеток+антитело (по 50 мкл в каждую), и смеси хорошо перемешивали для ресуспендирования и инкубировали в инкубаторе при 37°C в течение 2 ч. В каждую пробирку добавляли 800 мкл 1% PBSA при комнатной температуре. Пробирки центрифугировали при $1200 \times g$ в течение 5 мин и супернатант удаляли. Клетки промывали один раз 800 мкл PBSA. Антитело против CD11c мыши/человека APC (Biolegend, партия номер № 101212, концентрация: 0,2 мг/мл; разбавленное в 500 раз PBSA) добавляли к соответствующим образцам в количестве 100 мкл/образец, и смеси хорошо перемешивали и инкубировали на льду в течение 40 мин. В каждую пробирку добавляли 800 мкл 1% PBSA. Смесь центрифугировали при $1200 \times g$ в течение 5 мин и супернатант удаляли. Клетки промывали один раз посредством 800 мкл 1% PBSA. Пробирки центрифугировали при $1200 \times g$ в течение 5 мин и супернатант удаляли. Клетки в каждой пробирке промывали один раз 800 мкл PBSA. В каждую пробирку добавляли 200 мкл 1% PBSA для ресуспендирования и клетки переносили в пробирку для проточной цитометрии и подвергали детекции.

Результаты: в этом исследовании активность фагоцитоза (ADCP), опосредуемая 6F7H1L1(hG4) в комбинации с цетуксимабом, определяли с использованием HPMM в качестве эффекторных клеток и клеток HT29 в качестве клеток-мишеней. Результаты, как показано на фиг.7, продемонстрировали, что индекс фагоцитоза цетуксимаба и 6F7H1L1(hG4) был на значимом уровне более высоким, чем в случае пустого контроля и изотипического контроля (IgG4 человека), что указывает на то, что цетуксимаб и 6F7H1L1(hG4) обладают активностью ADCP. Индекс фагоцитоза 6F7H1L1(hG4) в комбинации с цетуксимабом был значимо более высоким, чем у 6F7H1L1(hG4), что указывает на то, что активность ADCP у 6F7H1L1(hG4) в комбинации с цетуксимабом является более высокой, чем у монотерапии.

Пример 8: Фагоцитоз опухолевых клеток макрофагами, обеспечиваемый

6F7H1L1(hG4) в комбинации с обинутузумабом

РВМС (полученные в Akeso Biopharma, Inc., партия номер № 20201126-G) размораживали и инкубировали с полной средой 1640+10% FBS (Excell bio, каталожный номер № FSP500, партия номер № 11I025) в течение ночи. На следующие сутки среду заменяли на полную среду 1640+2% FBS, и клетки инкубировали со средой в течение 2 ч. Супернатант удаляли и клетки промывали два раза PBS и инкубировали в инкубаторе (90% 1640+10% FBS+M-CSF-100 нг/мл) для индукции взрослых макрофагов человека (HPMM, полученные в Akeso Biopharma, Inc.). Среду заменяли и обработку проводили на 3 и 5 сутки. Эксперимент проводили на 7 сутки индукции.

Клетки Raji (приобретенные в ATCC) собирали общепринятым образом и промывали один раз PBS. CFSE разбавляли до 2,5 мкМ посредством PBS. Клетки ресуспендировали в надлежащем количестве разбавленного CFSE до плотности окрашивания 1×10^7 клеток/мл и инкубировали в инкубаторе в течение 20 мин. Добавляли 6 мл полной среды 1640 (содержавшей 10% FBS) для остановки окрашивания. Клетки центрифугировали при $170 \times g$ в течение 5 мин и супернатант удаляли. Добавляли 1 мл полной среды 1640 и клетки инкубировали в инкубаторе в течение 10 мин с клеточной плотностью, доведенной до 3×10^6 клеток/мл. Антитела разбавляли до желаемых концентраций полной средой 1640 и создавали группу изотипического контрольного антитела. Макрофаги человека собирали и центрифугировали при $170 \times g$ в течение 5 мин и супернатант удаляли. Клетки доводили до плотности 1×10^6 клеток/мл, переносили в 96-луночные планшеты с V-образным дном и центрифугировали при $750 \times g$ в течение 5 мин и супернатант удаляли. В 96-луночные планшеты с V-образным дном, содержавшие макрофаги, добавляли суспензию опухолевых клеток+антитело, и смеси хорошо перемешивали для ресуспендирования и инкубировали в инкубаторе при $37^\circ C$ в течение 2 ч. В каждую лунку добавляли 150 мкл 1% PBSA при комнатной температуре. Смесь центрифугировали при $750 \times g$ в течение 5 мин и супернатант удаляли. Клетки промывали один раз 200 мкл PBSA. Антитело против CD11c мыши/человека APC (разбавленное в 500 раз PBSA) добавляли к соответствующим образцам в количестве 100 мкл/образец и смеси хорошо перемешивали и инкубировали на льду в течение 40 мин. В каждую пробирку добавляли 150 мкл 1% PBSA. Клетки центрифугировали при $750 \times g$ в течение 5 мин и супернатант удаляли. Клетки в каждой лунке промывали один раз посредством 200 мкл 1% PBSA. В каждую пробирку добавляли 200 мкл 1% PBSA для ресуспендирования и клетки переносили в пробирку для проточной цитометрии и подвергали детекции.

Результаты: в этом исследовании активность фагоцитоза (ADCP), опосредуемую 6F7H1L1(hG4) в комбинации с обинутузумабом, определяли с использованием HPMM в качестве эффекторных клеток и клеток Raji в качестве клеток-мишеней. Результаты, как показано на фиг.8, продемонстрировали, что индекс фагоцитоза обинутузумаба и 6F7H1L1(hG4) был на значимом уровне более высоким, чем в случае пустого контроля и изотипического контроля (IgG4 человека и IgG1 человека), что указывает на то, что обинутузумаб и 6F7H1L1(hG4) обладают активностью ADCP. Индекс фагоцитоза

6F7H1L1(hG4) в комбинации с обинутузумабом был значимо более высоким, чем у 6F7H1L1(hG4), что указывает на то, что активность ADCP у 6F7H1L1(hG4) в комбинации с обинутузумабом является более высокой, чем у монотерапии.

Пример 9: Эффективное противоопухолевое лечение 6F7H1L1(hG4) в комбинации с биспецифическим антителом против PD-1/против CTLA-4

Для определения активности ингибирования опухоли *in vivo* у антитела 6F7H1L1(hG4) в комбинации с биспецифическим антителом против PD-1/против CTLA-4 кадонилимабом самкам мышей BALB/c-hPD1/hSIRP α в возрасте 6,43-8,43 недель (приобретенным у GemPharmatech Co., Ltd.) подкожно трансплантировали клетки CT26-hCD47 (клетки рака толстого кишечника мыши, приобретенные у GemPharmatech Co., Ltd.). Когда объем опухоли достигал 80-120 мм³ мышей случайным образом распределяли на 4 группы по 6 в соответствии с объемом опухоли. День распределения на группы определяли как D0, и дозирование начинали в день распределения на группы D0. Режим в группе комбинированной терапии является следующим: лекарственные средства составляли по отдельности и вводили последовательно (не требовалось определенного порядка или временного интервала, и одно лекарственное средство должно было вводиться после завершения введения другого). Моделирование и конкретный режим представлены в таблице 1. После введения определяли длину и ширину опухолей в каждой группе и вычисляли объем опухоли. Для данных вычисляли T-критерий независимой выборки, SPSS 17,0 *P <0,05, **P<0,01.

Таблица 1: режим лечения в модели на мышях BALB/c-hPD1/hSIRP α с ксенотрансплантатом опухоли CT26-hCD47 посредством антитела 6F7H1L1(hG4) в комбинации с биспецифическим антителом против PD-1/против CTLA-4 кадонилимабом

Группа	Количество	Трансплантация	Введение
Изотипический контроль 5 мг/кг	6	CT26-hCD47, 5×10 ⁵ клеток, мыши BALB/c-hPD1/hSIRP α , п/к	Изотипическое контрольное антитело hIgG4, внутривенно вводимое два раза в неделю в течение 4 недель, 7 доз
6F7H1L1(hG4) 5 мг/кг	6		6F7H1L1(hG4), 5 мг/кг; внутривенно вводимое два раза в неделю в течение 4 недель, 7 доз.
Кадонилимаб 0,5 мг/кг	6		Кадонилимаб (полученный в Akeso Biopharma, Inc., партия номер № B104C20191206), 0,5 мг/кг;

			внутрибрюшинно вводимый два раза в неделю в течение 4 недель, 7 доз.
6F7H1L1(hG4) 5 мг/кг, Кадонилимаб 0,5 мг/кг	6		6F7H1L1(hG4), 5 мг/кг; кадонилимаб, 0,5 мг/кг; внутрибрюшинно вводимый два раза в неделю в течение 4 недель, 7 доз

Результаты представлены на фиг.9. Результаты показали, что, по сравнению с изотипическим контрольным антителом hIgG4, как 6F7H1L1(hG4), так и биспецифическое антитело против PD-1/CTLA-4 кадонилимаб, могут эффективно ингибировать опухоли у мышей и группа комбинированной терапии 6F7H1L1(hG4) + кадонилимаб продемонстрировала синергическую противоопухолевую эффективность в модели и была лучшей относительно групп монотерапии в отношении ингибирования опухолей.

Кроме того, как показано на фиг.10, как 6F7H1L1(hG4), так и кадонилимаб, хорошо переносились у мышей, имеющих опухоль, как по отдельности, так и в комбинации, и не было выявлено эффекта на массу тела у имеющих опухоль мышей в группах.

Пример 10: Эффективное противоопухолевое лечение 6F7H1L1(hG4) в комбинации с биспецифическим антителом против PD-1/ против VEGFA

Для определения активности ингибирования опухоли *in vivo* у антитела 6F7H1L1(hG4) в комбинации с биспецифическим антителом против PD-1/против VEGFA VP101(hG1DM) мышам SCID Beige в возрасте 5-7 недель (приобретенным у Charles River, Beijing) подкожно трансплантировали клетки MDA-MB-231 (приобретенные у ATCC). Когда объем опухоли достигал 120-150 мм³ мышей случайным образом распределяли на 4 группы по 6 в соответствии с объемом опухоли. День распределения на группы определяли как D0. Дозирование начинали в день распределения на группы D0 и мышам проводили внутрибрюшинную инъекцию активированных РВМС. Режим в группе комбинированной терапии является следующим: лекарственные средства составляли по отдельности и вводили последовательно (не требовалось определенного порядка или временного интервала, и одно лекарственное средство должно было вводиться после завершения введения другого). Моделирование и конкретный режим представлены в таблице 2. После введения определяли длину и ширину опухолей в каждой группе и вычисляли объем опухоли. Проводили односторонний дисперсионный анализ данных (апостериорный критерий Бонферрони), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Таблица 2: Режим введения в модели на мышах SCID Beige с ксенотрансплантатом опухоли MDA-MB-231 с использованием антитела 6F7H1L1(hG4) в комбинации с биспецифическим антителом против PD-1/против VEGFA VP101(hG1DM)

Распределение на	Количес	Трансплантация	Введение
------------------	---------	----------------	----------

группы	ТВО		
Изотипический контроль	6	MDA-MB-231, 8×10^6 клеток, мыши SCID Beige, п/к; в день	Изотипическое контрольное антитело hIgG4, 0,05 мг/кг; внутрибрюшинно вводимое два раза в неделю в течение 4 недель; Изотипическое контрольное антитело hIgG1DM, 3,75 мг/кг; внутрибрюшинно вводимое один раз в неделю в течение 4 недель
6F7H1L1(hG4) 0,05 мг/кг	6	распределения на группы мышам трансплантировали	6F7H1L1(hG4), 0,05 мг/кг; внутрибрюшинно вводимое два раза в неделю в течение 4 недель
VP101(hG1DM) 2 мг/кг	6	4×10^6 активированных посредством антитела против CD3 PBMC человека посредством внутрибрюшинной инъекции	VP101(hG1DM) (полученное в Akeso Biopharma, Inc., партия номер № B112C20201205), 2 мг/кг; внутрибрюшинно вводимое один раз в неделю в течение 4 недель
6F7H1L1(hG4) 0,05 мг/кг, VP101(hG1DM) 2 мг/кг	6		6F7H1L1(hG4), 0,05 мг/кг; внутрибрюшинно вводимое два раза в неделю в течение 4 недель; VP101(hG1DM), 2 мг/кг; внутрибрюшинно вводимое один раз в неделю в течение 4 недель

Результаты представлены на фиг.11. Результаты показали, что, по сравнению с группой изотипического контроля, как 6F7H1L1(hG4), так и VP101(hG1DM), могут эффективно ингибировать рост опухолей у мышей, и группа комбинированной терапии 6F7H1L1(hG4) + VP101(hG1DM) продемонстрировала синергическую противоопухолевую эффективность в этой модели и была лучшей, чем группы монотерапии, в отношении ингибирования опухолей.

Кроме того, как показано на фиг.12, как 6F7H1L1(hG4), так и VP101(hG1DM) хорошо переносились имеющими опухоль мышами, как по отдельности, так и в комбинации, и не было выявлено эффекта на массу тела у имеющих опухоль мышей в группах.

Варианты осуществления настоящего изобретения описаны выше более подробно, однако настоящее изобретение не ограничивается данными вариантами осуществления. Специалисты в данной области могут осуществить различные эквивалентные модификации

или замены без отклонения от сущности настоящего изобретения. Эти эквивалентные модификации или замены входят в объем, определяемый формулой изобретения настоящей заявки.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ:

SEQ ID NO: 1: нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 6F7

CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCAGAGCTGGTGAGGCCAGGAGCATCC
GTGAAGCTGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACATCCTATTGGATGAACTGG
GTGAAGCAGAGGCCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGCATGATCGACCCAAGCG
ATTCCGAGACCCACAACAATCAGATGTTTAAGGACAAGGCCACCCTGACAGTGGAT
AAGAGCTCCAATACCGCCTACATGCACCTGTCTAGCCTGACATCTGAGGACAGCGCC
GTGTATCACTGCGCCCGGCTGTACAGATGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACC
ACAGTGACCGTGTCTCT

SEQ ID NO: 2: аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 6F7

QVQLQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNVVKRPGQGLEWIGMIDP
SDSETHNNQMFKDKATLTVDKSSNTAYMHLSSLTSEDSAVYHNCARLYRWYFDVWGAG
TTVTVSS

SEQ ID NO: 3: нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи 6F7

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCCAAGTCTATGAGCATGTCCCTGGGCGAGA
GGGTGACCCTGTCCTGTAAGGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACGTGTCTTGGTTTC
AGCAGAAGCCACACCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCAATCGGTAT
ACAGGCGTGCCTGACAGATTCACCGGCTCTGGCAGCGCCACAGACTTCACCCTGAC
AATCTCTAACGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGATTATCACTGCGGCCAGAGCTACA
ATTTCCCTTATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 4: аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 6F7

NIVMTQSPKSMSLGERVTLSCKASEIVGTYVSWFQQKPHQSPKLLIYGASNRY
TGVPDRFTGSGSATDFTLTISNVQAEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 5 HCDR1 6F7CDR

GYTFTSYW

SEQ ID NO: 6 HCDR2 6F7CDR

IDPSDSET

SEQ ID NO: 7 HCDR3 6F7CDR

ARLYRWYFDV

SEQ ID NO: 8 LCDR1 6F7CDR

EIVGTY

SEQ ID NO: 9 LCDR2 6F7CDR

GAS

SEQ ID NO: 10 LCDR3 6F7CDR

GQSYNFPYT

SEQ ID NO: 11 нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи 6F7H1

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCT
GTGAAGCTGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACAAGCTATTGGATGAACTGG
GTGCGGCAGAGACCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGAATGATCGACCCTTCCGA
TTCTGAGACCCACAATGCCCAGAAGTTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGACA
AGAGCACCTCCACAGCCTACATGCACCTGAGCTCCCTGCGGTCCGAGGACACAGCC
GTGTAATAATTGCGCCAGGCTGTACCGCTGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACC
ACAGTGACCGTGTCTAGC

SEQ ID NO: 12 аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи 6F7H1

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGLEWIGMID
PSDSETHNAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGA
GTTVTVSS

SEQ ID NO: 13 нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи 6F7L1

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGCCACAATGTCTATGAGCCCAGGAGAGA
GGGTGACCCTGTCCTGTAGAGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACGTGTCTTGGTTTC
AGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTAGGCTGCTGATCTACGGAGCAAGCAACAGGTAT
ACCGGAGTGCCAGCACGCTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACAGACTTTACCCTGACA
ATCAGCTCCGTGCAGCCTGAGGACCTGGCCGATTATCACTGCGGCCAGTCTTACAAT
TTCCCATATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 14 аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи 6F7L1

NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSCRASEIVGTYSWVWFQKPKGQAPRLLIYGASNR
YTGVPARFSGSGSGTDFLTLSVQPEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 15 нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи 6F7H2

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCT
GTGAAGGTGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACATCCTATTGGATGAACTGG
GTGCGGCAGAGACCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGAATCATCGACCCTTCCGA
TTCTGAGACCTCTAATGCCCAGAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCCTGACAGTGGACA
AGAGCACCTCCACAGCCTACATGCACCTGAGCTCCCTGAGGAGCGAGGACACAGCC
GTGTAATAATTGCGCCAGGCTGTACCGCTGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACC
ACAGTGACCGTGTCTAGC

SEQ ID NO: 16 аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи 6F7H2

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGLEWIGIIDP

SDSETSNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDТАVYYCARLYRWYFDVWGAG
TTVTVSS

SEQ ID NO: 17 нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи
6F7L2

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGCCACACTGTCTCTGAGCCCAGGAGAGA
GGGTGACCCTGTCCTGTAGAGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACGTGTCTTGGTTTC
AGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTAGGCTGCTGATCTATGGCGCCAGCAACAGGGCA
ACCGGCATCCCCGCACGCTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACAGACTTTACCCTGACA
ATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACCTGGCCGATTACTATTGCGGCCAGTCTTACAAT
TTCCCATATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 18 аминокислотная последовательность варибельной области легкой
цепи 6F7L2

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLADYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 19 нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой
цепи 6F7H3

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCT
GTGAAGGTGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACATCCTATTGGATGAACTGG
GTGCGGCAGGCACCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGCATCATCGACCCTTCCGA
TTCTGAGACCTCTTACGCCCAGAAGTTTCAGGGCAGGGTGACCCTGACAGTGGACA
AGAGCACCTCCACAGCCTATATGGAGCTGAGCTCCCTGCGCAGCGAGGACACAGCC
GTGTACTATTGCGCCCGGCTGTACAGATGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCAGGAACC
ACAGTGACCGTGTCTAGC

SEQ ID NO: 20 аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой
цепи 6F7H3

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGIIDP
SDSETSNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCARLYRWYFDVWGAG
TTVTVSS

SEQ ID NO: 21 нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи
6F7L3

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGCCACACTGTCTCTGAGCCCAGGAGAGA
GGGTGACCCTGTCCTGTAGAGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACCTGTCTTGGTATC
AGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTAGGCTGCTGATCTACGGAGCCAGCACCAGGGCA
ACAGGCATCCCCGCACGCTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTTACCCTGACA
ATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCCGTGTACTATTGCGGCCAGTCTTACAAT
TTCCCATATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG

SEQ ID NO: 22 аминокислотная последовательность варибельной области легкой
цепи 6F7L3

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRASEIVGTYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 23 аминокислотная последовательность каркасной области тяжелой цепи FR-H1 6F7

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKAS

SEQ ID NO: 24 аминокислотная последовательность каркасной области тяжелой цепи FR-H2 6F7

MNWVKQRPGQGLEWIGM

SEQ ID NO: 25 аминокислотная последовательность каркасной области тяжелой цепи FR-H3 6F7

HNNQMFKDKATLTVDKSSNTAYMHLSSLTSEDSAVYHC

SEQ ID NO: 26 аминокислотная последовательность каркасной области тяжелой цепи FR-H4 6F7

WGAGTTVTVSS

SEQ ID NO: 27 аминокислотная последовательность каркасной области легкой цепи FR-L1 of 6F7

NIVMTQSPKSMMSLGERVTLSCAS

SEQ ID NO: 28 аминокислотная последовательность каркасной области легкой цепи FR-L2 6F7

VSWFQQKPHQSPKLLIY

SEQ ID NO: 29 аминокислотная последовательность каркасной области легкой цепи FR-L3 6F7

NRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISNVQAEDLADYHC

SEQ ID NO: 30 аминокислотная последовательность каркасной области легкой цепи FR-L4 6F7

FGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 31 аминокислотная последовательность каркасной области FR-H1 6F7H1

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKAS

SEQ ID NO: 32 аминокислотная последовательность каркасной области FR-H2 6F7H1

MNWVRQRPGQGLEWIGM

SEQ ID NO: 33 аминокислотная последовательность каркасной области FR-H3 6F7H1

HNAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDVAVYYC

SEQ ID NO: 34 аминокислотная последовательность каркасной области FR-H4 6F7H1

WGAGTTVTVSS

SEQ ID NO: 35 аминокислотная последовательность каркасной области FR-L1 6F7L1

NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSCRAS

SEQ ID NO: 36 аминокислотная последовательность каркасной области FR-L2 6F7L1

VSWFQQKPGQAPRLLIY

SEQ ID NO: 37 аминокислотная последовательность каркасной области FR-L3 6F7L1
NRYTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDLADYHC

SEQ ID NO: 38 аминокислотная последовательность каркасной области FR-L4 6F7L1
FGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 39 аминокислотная последовательность каркасной области FR-H1
6F7H2

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVCKAS

SEQ ID NO: 40 аминокислотная последовательность каркасной области FR-H2
6F7H2

MNWVRQRPQGGLWIGI

SEQ ID NO: 41 аминокислотная последовательность каркасной области FR-H3
6F7H2

SNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDVAVYYC

SEQ ID NO: 42 аминокислотная последовательность каркасной области FR-H4
6F7H2

WGAGTTVTVSS

SEQ ID NO: 43 аминокислотная последовательность каркасной области FR-L1 6F7L2
NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRAS

SEQ ID NO: 44 аминокислотная последовательность каркасной области FR-L2 6F7L2
VSWFQQKPGQAPRLLIY

SEQ ID NO: 45 аминокислотная последовательность каркасной области FR-L3 6F7L2
NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLADYYC

SEQ ID NO: 46 аминокислотная последовательность каркасной области FR-L4 6F7L2
FGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 47 аминокислотная последовательность каркасной области FR-H1
6F7H3

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVCKAS

SEQ ID NO: 48 аминокислотная последовательность каркасной области FR-H2
6F7H3

MNWVRQAPQGGLWIGI

SEQ ID NO: 49 аминокислотная последовательность каркасной области FR-H3
6F7H3

SYAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYC

SEQ ID NO: 50 аминокислотная последовательность каркасной области FR-H4
6F7H3

WGAGTTVTVSS

SEQ ID NO: 51 аминокислотная последовательность каркасной области FR-L1 6F7L3
NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRAS

SEQ ID NO: 52 аминокислотная последовательность каркасной области FR-L2 6F7L3
LSWYQQKPGQAPRLLIY

SEQ ID NO: 53 аминокислотная последовательность каркасной области FR-L3 6F7L3
 TRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYC

SEQ ID NO: 54 аминокислотная последовательность каркасной области FR-L4 6F7L3
 FGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 55 аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1M

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 56 аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи, C-области цепи гамма-4 Ig

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
 DKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 57 аминокислотная последовательность константной области легкой цепи, C-области цепи каппа Ig

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 58 аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи, C-области цепи гамма-1 Ig

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 59 аминокислотная последовательность тяжелой цепи 6F7H1L1(G1M)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGLEWIGMID
 PSDSETHNAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDVAVYYCARLYRWYFDVWGA
 GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL

YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 60 аминокислотная последовательность легкой цепи 6F7H1L1(G1M)

NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSCRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNR
YTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 61 аминокислотная последовательность тяжелой цепи 6F7H2L2(G1M)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGQGLEWIGIIDP
SDSETSNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDNAVYYCARLYRWYFDVWGAG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 62 аминокислотная последовательность легкой цепи 6F7H2L2(G1M)

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLADYYCGQSYNFPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 63 аминокислотная последовательность тяжелой цепи 6F7H3L3(G1M)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWIGIIDP
SDSETSYAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARLYRWYFDVWGAG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCP
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 6F764 аминокислотная последовательность легкой цепи H3L3(G1M)

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRASEIVGTYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCGQSYNFPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 65 аминокислотная последовательность тяжелой цепи 6F7H1L1(hG4)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGQGLEWIGMID
PSDSETHNAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDNAVYYCARLYRWYFDVWGA
GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAP
EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP

REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 66 аминокислотная последовательность легкой цепи 6F7H1L1(hG4)

NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNR
YTGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSITLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 67 аминокислотная последовательность тяжелой цепи 6F7H2L2(hG4)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGQGLEWIGIIDP
SDSETSNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPE
FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT
VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 68 аминокислотная последовательность легкой цепи 6F7H2L2(hG4)

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLADYYCGQSYNFPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 69 аминокислотная последовательность тяжелой цепи 6F7H3L3(hG4)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAPQGQGLEWIGIIDP
SDSETSYAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPE
FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT
VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 70 аминокислотная последовательность легкой цепи 6F7H3L3(hG4)

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSRASEIVGTYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCGQSYNFPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 71 последовательность mFc-метки

PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPD
VQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLR
APIERTISKPKGVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTE

caaggagtacaagtgaaggtgtccaacaaggctctccctgccccattgagaagaccatcagcaaggccaaaggccaaccaggag
 ccccaggtctataactgctccctccaggagcgaactcaccaagaaccaggtgtccctgacctgacctgctgctcaagggtttatcccagcga
 catgcccgtcgagtgaggagtcacacggacagcccgagaataactacaagaccacctctctgctctgactccgacggctccttctctgt
 acagcAAACTGACCGTGGATAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCATGTTC
 CGTGATGCACGAGGCACTGCACAACCACTATAACCAGAAGTCTCTGAGTCTGTCC
 AGGAAAAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGCGGAAGTGGAGGCGGAGGATCAGG
 AGGGGGAGGATCTCAGGTGCAGCTGGTCAATCCGGAGCCGAGGTGAAGAAACCC
 GGCGCTTCCGTGAAGGTCTCTTGCAAAGCATCAGGCTACAGCTTCACAGGGTATACT
 ATGAACTGGGTGCGGCAGGCACCTGGACAGTGTCTGGAATGGATCGGCCTGATTAA
 CCCATAACAACATCACTAACTACGCCAGAAGTTCCAGGGCCGGGTGACTTTTAC
 CGTGGACACTAGCATTTCCACCGCTTACATGGAGCTGAGTCGGCTGAGATCAGACG
 ATACCGGCGTGTATTTTTGCGCAAGGCTGGATTACAGAAGTTATTGGGGACAGGGA
 AACTTGTACAGTCTCTGCTGGAGGAGGCGGATCTGGAGGAGGAGGATCTGGCGG
 AGGAGGCAGTGGAGGAGGAGGATCACAGGCTGTGGTTACTCAGGAACCAAGCCTG
 ACCGTGAGCCCCGGAGGCACAGTCACTCTGACCTGTGGGAGCTCCACAGGAGCTGT
 GACCACATCTAACTTCCCTAATTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTCGAT
 CCCTGATCGGGGGAACCAACAACAAGGCCAGCTGGACACCCGCCAGATTTTCTGGC
 AGTCTGCTGGGCGGGAAAGCCGCTCTGACCATTAGCGGCGCTCAGCCTGAGGACGA
 AGCAGAGTACTATTGCGCCCTGTGGTATAGTAATCATTGGGTGTTTCGGGTGTGGGAC
 AAAACTGACCGTGCTGAGA

SEQ ID NO: 78 аминокислотная последовательность (полноразмерная) тяжелой цепи
 CP004(hG1TM)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG
GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLS PGKGGGGSGGGGSGGGGSG
 GGGSQVQLVESGAEVK KPGASVKV SCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQCLEWIGLINP
YNNITNYAQKFQGRVFTFVDT SISTA YMEL SRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGLV
 TVSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFP
 NWVQQKPGQAPRSLIGGTNNKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALW
YSNHWVFGCGTKLTVLR (примечание: подчеркнутые части соответствуют
 последовательностям CDR)

SEQ ID NO: 79 последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи
 CP004(hG1TM)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACA
 GGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTC

AGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTG
 TCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGAC
 CATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGA
 GTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAAGTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCG
 CTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCA
 GCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGGAAAG
 GTCGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTC
 AAAAGATAGCACCTATTCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGA
 GAAGCACAAAGTGTATGCATGCGAAGTGACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGTGA
 CTAAGTCTTTTAACCGGGGCGAATGT

SEQ ID NO: 80 аминокислотная последовательность (полноразмерная) легкой цепи
 CP004(hG1TM)

DIQMTQSPSSMSASVGDRTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV
 SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
 LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 81 последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи
 пенпулимаба: (1344 п.н.)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCCGGCGGGTCA
 CTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGG
 GTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGGCGG
 GAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATA
 ACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCA
 CTGTAATATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGA
 ACCCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGGCCAGCGTGTTCCTCTCGCC
 CCCTCCTCCAAAAGCACCCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGA
 CTAATTCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGT
 CCATACATTCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCTGTCCAGCGTCGT
 CACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACA
 AGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACA
 CACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAAGCTGCTGGAGCCCCTAGCGTCTTCCTCT
 TTCCTCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCTGAAGTCACCTGTG
 TCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATG
 GCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACC
 TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGA
 GTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATGAGAAGACCATCA
 GCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCAGGTCTATACTGCCTCCCTCCAGG
 GACGAACTCACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC
 AGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCAGAGAATAACTACAAGAC
 CACCCCTCCTGTCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG

GACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGC
CCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA

SEQ ID NO: 82 аминокислотная последовательность тяжелой цепи пенпулимаба:
(448 а.к.)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG
GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

SEQ ID NO: 83 последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи пенпулимаба:
(642 п.н.)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACA
GGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTC
AGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTG
TCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGAC
CATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGA
GTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAA ACTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCG
CTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCA
GCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGAAG
GTCGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTC
AAAAGATAGCACCTATTCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGA
GAAGCACAAAGTGTATGCATGCGAAGTGACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGTGA
CTAAGTCTTTTAACCGGGGCGAATGT

SEQ ID NO: 84 аминокислотная последовательность легкой цепи пенпулимаба: (214
а.к.)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV
SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 121 аминокислотная последовательность варибельной области
тяжелой цепи пенпулимаба

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG
GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ
GTLVTVSS

SEQ ID NO: 122 аминокислотная последовательность варибельной области легкой
цепи пенпулимаба

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV

SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 123 HCDR1 пенпулимаба

GFAFSSYD

SEQ ID NO: 124 HCDR2 пенпулимаба

ISGGGRYT

SEQ ID NO: 125 HCDR3 пенпулимаба

ANRYGEAWFAY

SEQ ID NO: 126 LCDR1 пенпулимаба

QDINTY

SEQ ID NO: 127 LCDR2 пенпулимаба

RAN

SEQ ID NO: 128 LCDR3 пенпулимаба

LQYDEFPLT

SEQ ID NO: 85 аминокислотная последовательность тяжелой цепи Hu5F9-G4

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYNMHWVRQAPGQRLEWMGTIY
 PGNDDTSYNQKFKDRVITITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYRAMDYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP
 EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT
 LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
 TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGLGK

SEQ ID NO: 86 аминокислотная последовательность легкой цепи Hu5F9-G4

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVYSNGNTYLGWYLQKPGQSPQLLIYKV
 SNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVYTFGQGTKLEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
 STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 87 аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 14C12

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAPSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISGG
 GRYTYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYCANRYGEAWFAYWGQG
 TLVTVSA

SEQ ID NO: 88 аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 14C12

DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV
 DGVPSRFSGSGSGQDYSLTISLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 89 HCDR1 14C12

GFAFSSYD

SEQ ID NO: 90 HCDR2 14C12

ISGGGRYT

SEQ ID NO: 91 HCDR3 14C12

ANRYGEAWFAY

SEQ ID NO: 92 LCDR1 14C12

QDINTY

SEQ ID NO: 93 LCDR2 14C12

RAN

SEQ ID NO: 94 LCDR3 14C12

LQYDEFPLT

SEQ ID NO: 95 аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 4G10

QVKLQESGPELVKPGASKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPY
NNITNYNQKFMGKATFTVDKSSSTAYMELLRLTSEDSGVYFCARLDYRSYWGQGLVT
VSAAKTTPPSVY

SEQ ID NO: 96 аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 4G10

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNFANWVQEKPDHLFTSLIGGTNN
RAPGVPARFSGSLIGDKAAL TITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKS
SPSVTLFQQQFC

SEQ ID NO: 97 HCDR1 4G10

GYSFTGYT

SEQ ID NO: 98 HCDR2 4G10

INPYNNIT

SEQ ID NO: 99 HCDR3 4G10

ARLDYRSY

SEQ ID NO: 100 LCDR1 4G10

TGAVTTSNF

SEQ ID NO: 101 LCDR2 4G10

GTN

SEQ ID NO: 102 LCDR3 4G10

ALWYSNHWV

SEQ ID NO: 103 аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи гуманизованного моноклонального антитела 14C12H1L1: (118 а.к.)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG
GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ
GTLVTVSS

SEQ ID NO: 104 аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 14C12H1L1(M): (108 а.к., мутация на основе 14C12H1L1 подчеркнута в аминокислотной последовательности)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV
SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKR

SEQ ID NO: 105 аминокислотная последовательность HCDR1 варибельной области тяжелой цепи 14C12H1L1(M)

GFAFSSYD

SEQ ID NO: 106 аминокислотная последовательность HCDR2 варибельной области тяжелой цепи 14C12H1L1(M)

ISGGGRYT

SEQ ID NO: 107 аминокислотная последовательность HCDR3 варибельной области тяжелой цепи 14C12H1L1(M)

ANRYGEAWFAY

SEQ ID NO: 108 аминокислотная последовательность LCDR1 варибельной области легкой цепи 14C12H1L1(M)

QDINTY

SEQ ID NO: 109 аминокислотная последовательность LCDR2 варибельной области легкой цепи 14C12H1L1(M)

RAN

SEQ ID NO: 110 аминокислотная последовательность LCDR3 варибельной области легкой цепи 14C12H1L1(M)

LQYDEFPLT

SEQ ID NO: 111 аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи бевацизумаба (бевацизумаб-Hv): (123 а.к.)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWIN
TYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYF
DVWGQGTLLVTVSS

SEQ ID NO: 112 аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи бевацизумаба (бевацизумаб-Lv): (107 а.к.)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHS
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 113 аминокислотная последовательность HCDR1 варибельной области тяжелой цепи бевацизумаба

GYTFTNYG

SEQ ID NO: 114 аминокислотная последовательность HCDR2 варибельной области тяжелой цепи бевацизумаба

INTYTGEP

SEQ ID NO: 115 аминокислотная последовательность HCDR3 варибельной области тяжелой цепи бевацизумаба

AKYPHYYGSSHWYFDV

SEQ ID NO: 116 аминокислотная последовательность LCDR1 варибельной области легкой цепи бевацизумаба

QDISNY (SEQ ID NO: 116)

SEQ ID NO: 117 аминокислотная последовательность LCDR2 варибельной области

легкой цепи бевацизумаба

FTS

SEQ ID NO: 118 аминокислотная последовательность LCDR3 переменной области

легкой цепи бевацизумаба

QQYSTVPWT

SEQ ID NO: 119: аминокислотная последовательность линкера 1

GGGSGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 120: аминокислотная последовательность линкера 2

GGGSGGGSGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 129: аминокислотная последовательность переменной области

тяжелой цепи 14C12H1L1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG
GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ
GTLVTVSS

SEQ ID NO: 130: аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи 14C12H1L1

DIQMTQSPSSMSASVGDRVFTFCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV
SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 131: аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи 4G10H1L1

QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQGLEWIGLINP
YNNITNYNQKFMGKATFTVDKSI STAYMEL SRLTSDDSGVYFCARLDYRSYWGQGLV
TVSA

SEQ ID NO: 132: аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи 4G10H1L1

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSN FANWVQEKPGQAFRSLIGGTN
NRASWV PARFSGSLLGGKAAL TISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 133: аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи 4G10H3L3

QVQLVESGAEVKKPGASV KVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWIGLINP
YNNITNYAQKFQGRVFTFTVDTSI STAYMEL SRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGLV
TVSA

SEQ ID NO: 134: аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи 4G10H3L3

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSN FPNWVQQKPGQAPRSLIGGTN
NKASWTPARFSGSLLGGKAAL TISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 135: аминокислотная последовательность 4G10H1V(M)

QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQC LEWIGLINP
YNNITNYNQKFMGKATFTVDKSI STAYMEL SRLTSDDSGVYFCARLDYRSYWGQGLV
TVSA

SEQ ID NO: 136: аминокислотная последовательность 4G10L1V(M)

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFANWVQEKPGQAFRSLIGGTN
NRASWVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWFVGCGTKLTVLR

SEQ ID NO: 137: аминокислотная последовательность 4G10H3V(M)

QVQLVESGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQCLEWIGLINP
YNNITNYAQKFQGRVFTVDTISISTAYMELSRRLSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGLTV
TVSA

SEQ ID NO: 138: аминокислотная последовательность 4G10L3V(M)

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIGGTN
NKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWFVGCGTKLTVLR

SEQ ID NO: 139: аминокислотная последовательность части тяжелой цепи
иммуноглобулина в CP004(hG1TM)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG
GGRYTYYPDSVKGRFTISRDNKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 140 аминокислотная последовательность тяжелой цепи бевацизумаба

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWIN
TYTGEPTYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWYF
DVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 141 аминокислотная последовательность тяжелой цепи VP101(hG1DM)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWIN
TYTGEPTYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWYF
DVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDW
VATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWF

AYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSMSASVGDRTFTCR
ASQDINTYLSWFQKPKGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMA
TYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKR (SEQ ID NO: 141)

SEQ ID NO: 142 последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи
VP101(hG1DM)

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTCT
CTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAACTATGGAATGAATTGG
GTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTTCGGCTGGATCAACACTTACAC
CGGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTACCTTCAGCCTGGATAC
AAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAG
TCTACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTTTGACGT
GTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGCGCAAGCACCAAAGGGCCCAGC
GTGTTTCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACCCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGA
TGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCT
CTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCC
CTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGT
AACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAATC
CTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAAGCTGCTGGAGGCC
TAGCGTCTTCTCTTTCTCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCC
TGAAGTCACCTGTGTCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCA
ACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCAGGGAGGAA
CAGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGG
CTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCAT
TGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACAC
TGCCTCCCTCCAGGGACGAACTACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCA
AGGGCTTTTATCCCAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAG
AATAACTACAAGACCACCCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTAC
AGCAAACCTGACCGTCGATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTTGTTC
GTGATGCATGAAGCACTGCACAACCATTATAACCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCCCC
GGCAAGGGCGGCGGGCTCTGGAGGAGGAGGCAGCGGCGGAGGAGGCTCCGGAG
GCGGCGGCTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGA
GGCTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCAGCAAGCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATG
AGCTGGGTGCGGCAGGCACCTGGCAAGGGTCTGGATTGGGTGGCAACCATCAGCGG
AGGCGGCAGATACATACTATCCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCC
GCGATAACTCTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGAC
ACAGCCCTGTACTATTGCGCCAACCGCTACGGCGAGGCCTGGTTTGCCTATTGGGGC
CAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGGCGGGCGGCGGAGCGGCGGCGGCGGCTC
CGGAGGAGGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCGGAGCGATATCCAGATGACCCAGTCCCCCT
CCTCTATGTCTGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCTTCACATGTAGAGCCTCCAGG
ATATCAACACCTACCTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCTAAGACAC

TGATCTATCGGGCCAATAGACTGGTGAGCGGAGTGCCTTCCCGGTTCTCCGGCTCTG
GCAGCGGACAGGACTATACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGATATGGCC
ACATACTATTGCCTGCAGTATGACGAGTTCCTCCCTGACCTTCGGGGCTGGCACTAAG
CTGGAGCTGAAAAGA (SEQ ID NO: 142)

SEQ ID NO: 143 аминокислотная последовательность легкой цепи VP101(hG1DM)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKVLIIYFTSSLHS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 143)

SEQ ID NO: 144 последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи
VP101(hG1DM)

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAG
GGTCACCATCACATGCAGTGCTTACAGGATATTTCCAACCTGAATTGGTATCA
GCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGCTCCCTGCACT
CAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACTCTGACC
ATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCG
TGCCATGGACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCT
CCCAGTGTCTTCATTTTTCCCCTAGCGACGAACAGCTGAAATCCGGGACAGCCTCT
GTGGTCTGTCTGCTGAACAATTCTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGGAAGGT
CGATAACGCCCTGCAGAGTGGCAATTCACAGGAGAGCGTGACAGAACAGGACTCCA
AAGATTCTACTTATAGTCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCTGACTACGAAA
AGCATAAAGTGTATGCATGTGAGGTCACCCACCAGGGGCTGAGCAGTCCAGTCACC
AAGTCATTCAACAGAGGCGAGTGC (SEQ ID NO: 144)

SEQ ID NO: 145 последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области
тяжелой цепи бевацизумаба: (369 п.н.)

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTCT
CTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAACTATGGAATGAATTGG
GTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTTCGGCTGGATCAACACTTACAC
CGGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTACCTTCAGCCTGGATAC
AAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAG
TCTACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTTTGACGT
GTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGC (SEQ ID NO: 145)

SEQ ID NO: 146 последовательность нуклеиновой кислоты варибельной области
легкой цепи бевацизумаба: (321 п.н.)

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAG
GGTCACCATCACATGCAGTGCTTACAGGATATTTCCAACCTGAATTGGTATCA
GCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGCTCCCTGCACT
CAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACTCTGACC
ATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCG
TGCCATGGACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAG (SEQ ID NO: 146)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, предпочтительно для лечения опухоли, содержащая компонент А и компонент В, где компонент А представляет собой антитело, которое специфически связывается с CD47, или его антигенсвязывающий фрагмент;

компонент В выбран из одного или нескольких из следующих: компонент В1, компонент В2 и компонент В3, где компонент В1 представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, компонент В2 представляет собой противоопухолевое химиотерапевтическое средство, и компонент В3 представляет собой моноклональное антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент;

предпочтительно, композиция дополнительно содержит компонент С, где компонент С представляет собой противоопухолевое терапевтическое средство, и компонент С отличается от компонента В;

например, в соответствии с системой нумерации Kabat, IMGT, Chothia или AbM, антитело, которое специфически связывается с CD47, содержит последовательности CDR, выбранные из последовательностей, содержащихся в следующих переменных областях тяжелой цепи и переменных областях легкой цепи:

(1) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 2, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 4; или

(2) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 12, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 14; или

(3) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 16, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 18; или

(4) HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 20, и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 22

(предпочтительно, в соответствии с системой нумерации IMGT, причем антитело содержит:

HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 5, или ее варианта,

HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 6, или ее варианта, и

HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 7, или ее варианта; и антитело дополнительно содержит:

LCDR1, содержащую или состоящую из аминокислот, указанных под SEQ ID NO: 8, или их варианта,

LCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 9, или ее варианта, и

LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 10, или ее варианта);

биспецифическое антитело представляет собой антитело против PD-1/против CTLA4 или антитело против PD-1/против VEGFA, их комбинацию; биспецифическое антитело содержит функциональную область первого белка и функциональную область второго белка, где функциональная область первого белка нацелена на PD-1, и функциональная область второго белка нацелена на CTLA4 или VEGFA; функциональная область первого белка представляет собой иммуноглобулин, и функциональная область второго белка представляет собой одноцепочечное антитело; или функциональная область первого белка представляет собой одноцепочечное антитело, и функциональная область второго белка представляет собой иммуноглобулин;

предпочтительно, две молекулы одноцепочечных антител (предпочтительно, две идентичных молекулы одноцепочечных антител) связаны с одной молекулой иммуноглобулина; предпочтительно, иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин подтипа IgG1 (предпочтительно, подтипа IgG1 человека); предпочтительно, одноцепочечное антитело связано с N-концом или C-концом тяжелой цепи иммуноглобулина, где количества функциональной области первого белка и функциональной области второго белка в каждом случае независимо составляют 1, 2 или более; предпочтительно, функциональная область первого белка связана с функциональной областью второго белка либо прямо, либо через первый линкерный фрагмент; и/или переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с переменной областью легкой цепи одноцепочечного антитела либо прямо, либо через второй линкерный фрагмент; первый линкерный фрагмент и второй линкерный фрагмент являются идентичными или различаются; предпочтительно, линкерный фрагмент представляет собой $(GGGS)_n$, где n представляет собой положительное целое число, или более предпочтительно, n равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6; предпочтительно, первый линкерный фрагмент и второй линкерный фрагмент содержат аминокислотные последовательности, независимо выбранные из SEQ ID NO: 119 и SEQ ID NO: 120; более предпочтительно, первый линкерный фрагмент и второй линкерный фрагмент содержат аминокислотную последовательность, указанную под SEQ ID NO: 120;

когда биспецифическое антитело представляет собой антитело против PD-1/против CTLA4,

функциональная область первого белка содержит HCDR1-HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 87, и LCDR1-LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 88 (предпочтительно, в соответствии с системой нумерации IMGT, функциональная область

первого белка содержит HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 89, или ее варианта,

HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 90, или ее варианта,

HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 91, или ее варианта,

LCDR1, содержащую или состоящую из аминокислот, указанных под SEQ ID NO: 92, или их варианта,

LCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 93, или их варианта, и

LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 94, или их варианта);

функциональная область второго белка содержит HCDR1-HCDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 95, и LCDR1-LCDR3 в вариабельной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 96 (предпочтительно, в соответствии с системой нумерации IMGT, функциональная область второго белка содержит HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 97, или ее варианта,

HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 98, или ее варианта,

HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 99, или ее варианта,

LCDR1, содержащую или состоящую из аминокислот, указанных под SEQ ID NO: 100, или их варианта,

LCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 101, или ее варианта, и

LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 102, или ее варианта);

или

когда биспецифическое антитело представляет собой антитело против PD-1/против VEGFA,

функциональная область первого белка содержит HCDR1-HCDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 103, и LCDR1-LCDR3, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 104 (предпочтительно, в соответствии с системой нумерации IMGT, функциональная область первого белка содержит HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 105, или ее варианта,

HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 106, или ее варианта,

HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID

NO: 107, или ее варианта,

LCDR1, содержащую или состоящую из аминокислот, указанных под SEQ ID NO: 108, или их варианта,

LCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 109, или ее варианта, и

LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 110, или ее варианта);

функциональная область второго белка содержит HCDR1-HCDR3 в вариабельной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 111, и LCDR1-LCDR3 в вариабельной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 112 (предпочтительно, в соответствии с системой нумерации IMGT, функциональная область второго белка содержит HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 113, или ее варианта,

HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 114, или ее варианта,

HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 115, или ее варианта,

LCDR1 содержащую или состоящую из аминокислот, указанных под SEQ ID NO: 116, или ее варианта,

LCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 117, или ее варианта, и

LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 118, или ее варианта);

где

моноклональное антитело против PD1 содержит HCDR1-HCDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 121, и LCDR1-LCDR3, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 122 (предпочтительно, в соответствии с системой нумерации IMGT, моноклональное антитело против PD1 содержит HCDR1, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 123, или ее варианта,

HCDR2, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 124, или ее варианта,

HCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 125, или ее варианта,

LCDR1, содержащую или состоящую из аминокислот, указанных под SEQ ID NO: 126, или их варианта,

LCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 127, или ее варианта, и

LCDR3, содержащую или состоящую из последовательности, указанной под SEQ ID NO: 128, или ее варианта);

где вариант содержит последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% гомологией с соответствующей последовательностью, или вариант содержит последовательность, обладающую одной или несколькими (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативными аминокислотными мутациями (предпочтительно, заменами, инсерциями или делециями) по сравнению с соответствующей последовательностью.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где антитело, которое специфически связывается с CD47, дополнительно содержит каркасные области (FR) в вариабельной области тяжелой цепи и каркасные области (FR) в вариабельной области легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из следующих:

(1) каркасные области (FR) в вариабельной области тяжелой цепи, включающие FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4, где FR-H1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 23, или ее варианта; FR-H2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 24, или ее варианта; FR-H3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 25, или ее варианта; FR-H4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 26, или ее варианта;

каркасные области (FR) в вариабельной области легкой цепи, включающие FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, где FR-L1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 27, или ее варианта; FR-L2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 28, или ее варианта; FR-L3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 29, или ее варианта; FR-L4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 30, или ее варианта;

(2) каркасные области (FR) в вариабельной области тяжелой цепи, включающие FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4, где FR-H1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 31, или ее варианта; FR-H2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 32, или ее варианта; FR-H3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 33, или ее варианта; FR-H4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 34, или ее варианта;

каркасные области (FR) в вариабельной области легкой цепи, включающие FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, где FR-L1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 35, или ее варианта; FR-L2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 36, или ее варианта; FR-L3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 37, или ее варианта; FR-L4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 38, или ее варианта;

(3) каркасные области (FR) в вариабельной области тяжелой цепи, включающие FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4, где FR-H1 содержит или состоит из аминокислотной

последовательности, указанной под SEQ ID NO: 39, или ее варианта; FR-H2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 40, или ее варианта; FR-H3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 41, или ее варианта; FR-H4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 42, или ее варианта;

каркасные области (FR) в вариабельной области легкой цепи, включающие FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, где FR-L1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 43, или ее варианта; FR-L2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 44, или ее варианта; FR-L3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 45, или ее варианта; FR-L4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 46, или ее варианта;

(4) каркасные области (FR) в вариабельной области тяжелой цепи, включающие FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4, где FR-H1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 47, или ее варианта; FR-H2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 48, или ее варианта; FR-H3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 49, или ее варианта; FR-H4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 50, или ее варианта;

каркасные области (FR) в вариабельной области легкой цепи, включающие FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4, где FR-L1 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 51, или ее варианта; FR-L2 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 52, или ее варианта; FR-L3 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 53, или ее варианта; FR-L4 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 54, или ее варианта,

где вариант содержит последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологией с соответствующей последовательностью, или обладающую одной или несколькими (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно, замен, инсерций или делеций) по сравнению с соответствующей последовательностью.

3. Фармацевтическая композиция по п.1 или 2, где антитело, которое специфически связывается с CD47, содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:
аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 2, или ее варианта,

и

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:
аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 4, или ее варианта;

(2) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:

аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 12, или ее варианта, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:

аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 14, или ее варианта;

(3) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:

аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 16, или ее варианта, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:

аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 18, или ее варианта; и

(4) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:

аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 20, или ее варианта, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:

аминокислотной последовательности, указанной под SEQ ID NO: 22, или ее варианта,

функциональная область первого белка антитела против PD-1/против CTLA4 содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:

последовательности, указанной под SEQ ID NO: 87, или ее варианта, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:

последовательности, указанной под SEQ ID NO: 88, или ее варианта; и

(2) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:

последовательности, указанной под SEQ ID NO: 129, или ее варианта, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:

последовательности, указанной под SEQ ID NO: 130, или ее варианта;

функциональная область второго белка антитела против PD-1/против CTLA4 содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:

последовательности, указанной под SEQ ID NO: 95, или ее варианта, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:

последовательности, указанной под SEQ ID NO: 96, или ее варианта;

(2) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:

последовательности, указанной под SEQ ID NO: 133, или ее варианта, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:

последовательности, указанной под SEQ ID NO: 134, или ее варианта;

(3) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:

последовательности, указанной под SEQ ID NO: 135, или ее варианта, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:

последовательности, указанной под SEQ ID NO: 136, или ее варианта;
 (4) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 137, или ее варианта, и вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 138, или ее варианта; и
 (5) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 131, или ее варианта, и вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 132, или ее варианта;
 предпочтительно, иммуноглобулин антитела против PD-1/против CTLA4 содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную под SEQ ID NO: 139, и нацелен на PD-1;

функциональная область первого белка антитела против PD-1/против VEGFA содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 103, или ее варианта, и вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из: последовательности, указанной под SEQ ID NO: 104, или ее варианта;

функциональная область второго белка антитела против PD-1/против VEGFA содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую или состоящую из:

последовательности, указанной под SEQ ID NO: 111 (предпочтительно кодируемой нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 145), или ее варианта, и вариабельную область легкой цепи, содержащую или состоящую из:

последовательности, указанной под SEQ ID NO: 112 (предпочтительно кодируемой нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 146), или ее варианта;

предпочтительно, иммуноглобулин антитела против PD-1/против VEGFA содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, указанную под SEQ ID NO: 140, и нацелен на VEGFA;

моноклональное антитело против PD-1 содержит или состоит из вариабельной области тяжелой цепи, указанной под SEQ ID NO: 121, и вариабельной области легкой цепи, указанной под SEQ ID NO: 122;

где вариант обладает по меньшей мере 85%, предпочтительно 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, или более высокой идентичностью последовательности с соответствующей последовательностью, или содержит аминокислотную последовательность, обладающую одной или несколькими (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30) консервативными аминокислотными мутациями (предпочтительно, заменами, инсерциями или делециями) по сравнению с соответствующей последовательностью.

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-3, где антитело, которое специфически связывается с CD47, дополнительно содержит константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи, и константные области происходят из вида, отличного от мыши, например, из антитела человека, предпочтительно из IgG или IgM человека, и более предпочтительно из IgG1; предпочтительно, константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig, номер доступа № P01857 (SEQ ID NO: 58), или С-область цепи гамма-4 Ig, номер доступа № P01861.1 (SEQ ID NO: 56); константная область легкой цепи представляет собой С-область цепи каппа Ig, номер доступа № P01834 (SEQ ID NO: 57); предпочтительно антитело, которое специфически связывается с CD47, секретируется гибридомной клеточной линией LT012 под ССТСС № 2018135.

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-4, где, в соответствии с системой нумерации EU, антитело, которое специфически связывается с CD47, и иммуноглобулин содержат константную область тяжелой цепи, имеющую мутации в любых 1, 2 или 3 из положений 234, 235 и 237, и константа аффинности биспецифического антитела в отношении FcγRIIIa и/или C1q снижается после внесения мутации по сравнению с константой аффинности до внесения мутации; предпочтительно константу аффинности измеряют с использованием системы Fortebio Octet;

предпочтительно антитело, которое специфически связывается с CD47, содержит мутацию L234A и/или L235A в соответствии с системой нумерации EU;

более предпочтительно константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет одну из следующих комбинаций мутаций:

L234A и L235A; или

L234A и G237A; или

L235A и G237A; или

L234A, L235A и G237A;

еще более предпочтительно,

в соответствии с системой нумерации EU, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина дополнительно имеет одну из комбинаций следующих мутаций:

N297A, D265A, D270A, P238D, L328E, E233D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D, G236R, G236A, L328R, A330S, P331S, H268A, E318A и K320A.

6. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-5, где антитело, которое специфически связывается с CD47 содержит или состоит из тяжелой цепи и легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из следующих:

(1) тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 59, и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 60;

(2) тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 61, и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 62;

(3) тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 63, и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 64;

(4) тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 65, и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 66;

(5) тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 67, и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 68; и

(6) тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 69, и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 70;

антитело против PD-1/против CTLA4 содержит или состоит из тяжелой цепи и легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из следующих:

тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 78 (предпочтительно кодируемая нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 77), и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 80 (предпочтительно кодируемая нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 79);

антитело против PD-1/против VEGFA содержит или состоит из тяжелой цепи и легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из следующих:

тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 141 (предпочтительно кодируемая нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 142) и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 143 (предпочтительно кодируемая нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 144);

моноклональное антитело против PD-1 содержит или состоит из тяжелой цепи и легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из следующих: тяжелая цепь, указанная под SEQ ID NO: 82 (предпочтительно кодируемая нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 81) и легкая цепь, указанная под SEQ ID NO: 84 (предпочтительно кодируемая нуклеотидной последовательностью, указанной под SEQ ID NO: 83).

7. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-6, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, Fab/c, фрагмента в виде определяющей комплементарности области (CDR), одноцепочечного антитела (например, scFv), двухвалентного антитела и доменного антитела.

8. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-7, где антитело, которое специфически связывается с CD47, представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело).

9. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-8, где антитело, которое специфически связывается с CD47, связывается с белком CD47 человека с KD менее чем приблизительно 10⁻⁵ M, например, менее чем приблизительно 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M или 10⁻¹⁰ M, или менее, или антитело, которое специфически связывается с CD47, связывается с белком CD47 человека с EC₅₀ менее чем приблизительно 100 нМ, например, менее чем приблизительно 10 нМ, 1 нМ, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3

нМ, 0,2 нМ, 0,1 нМ или менее.

10. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-9, где антитело, которое специфически связывается с CD47, имеет форму конъюгата антитела, содержащего антитело, которое специфически связывается с CD47, или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9 и конъюгированную с ним конъюгированную часть, где конъюгированная часть представляет собой метку для очистки (например, His-метка), цитотоксическое средство или поддающуюся детекции метку; предпочтительно конъюгированная часть представляет собой радиоактивный изотоп, люминесцентное вещество, окрашенное вещество, фермент или полиэтиленгликоль; или

антитело, которое специфически связывается с CD47, имеет форму мультиспецифического антитела, предпочтительно биспецифического антитела, содержащего антитело, которое специфически связывается с CD47, или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, и антитело против другого антигена и/или другого антигенного эпитопа или его антигенсвязывающий фрагмент; или антитело, которое специфически связывается с CD47 имеет форму слитого белка, содержащего антитело, которое специфически связывается с CD47, или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-10, где противоопухолевое терапевтическое средство выбрано из одного или нескольких из следующих: ингибитор тирозинкиназы, ингибитор ДНК-полимеразы, антитело против CD20 человека, антитело против PDL-1 человека, антитело против PD-1 человека, антитело против CTLA-4 человека, ингибитор BCL-2, антитело против EGFR человека, антитело против HER2 человека, антитело против HER3 человека, ингибитор циклин-зависимой киназы, антитело против VEGFR2 человека, антитело против VEGF человека, ингибитор протеасом, ингибитор ангиогенеза, ингибитор белка быстро ускоряющейся фибросаркомы (RAF), акалабрутиниб, биспецифическое антитело и лекарственное средство на основе слитого белка; предпочтительно, терапевтическое средство представляет собой цетуксимаб, обинутузумаб или ритуксимаб;

предпочтительно противоопухолевое химиотерапевтическое средство выбрано из одного или нескольких из следующих: алкилирующее средство, антрациклин, антиметаболит, антибиотик, растительное и/или гормональное лекарственное средство, лекарственное средство на основе платины (например, цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин), адриамицин, циклофосфамид, таксан (например, связанный с альбумином паклитаксел, липосомальный паклитаксел и доцетаксел), этопозид, гемцитабин, пеметрексед, капецитабин, олапариб, рукапариб, нирапариб, талазопариб, флузопариб, алкалоид барвинка, тамоксифен, магестрол, гозерелин, аспарагиназа, антинеопластическое лекарственное средство на основе фторурацила, азацитидин, цитарабин и циклоцитидин.

12. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-11, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

13. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-12, где, в расчете на массу антитела, компонент А и компонент В1 присутствуют в соотношении масс (1:5)-(5:1), например, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1;

компонент А и компонент В3 присутствуют в соотношении масс (1:5)-(5:1), например, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1;

или

компонент В2 и компонент А присутствуют в соотношении масс 1:(1-1000), предпочтительно 1:(5-500) и более предпочтительно 1:(10-100);

предпочтительно компонент А и компонент В в фармацевтической композиции имеют форму, подходящую для введения посредством внутривенного капельного вливания, подкожной инъекции, внутривокальной инъекции, внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции или внутриочаговой инъекции.

14. Набор, предпочтительно для лечения опухоли, содержащий продукт А и продукт В,

где продукт А содержит антитело, которое специфически связывается с CD47, или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13;

продукт В выбран из одного или нескольких из следующих: продукт В1, продукт В2 и продукт В3, где продукт В1 представляет собой биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13 (предпочтительно, когда биспецифическое антитело представляет собой комбинацию антитела против PD-1/против CTLA4 и антитела против PD-1/против VEGFA, антитело против PD-1/против CTLA4 и антитело против PD-1/против VEGFA упакованы либо по отдельности, либо вместе), продукт В2 представляет собой противоопухолевое химиотерапевтическое средство по любому из пп.1-13, и продукт В3 представляет собой моноклональное антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13, где продукт В1, продукт В2 и продукт В3 упакованы по отдельности или вместе;

предпочтительно набор дополнительно содержит продукт С, где продукт С представляет собой противоопухолевое терапевтическое средство по любому из пп.1-13, и продукт С отличен от продукта В;

предпочтительно набор дополнительно содержит вкладыш в упаковку.

15. Набор по п.14, где, в расчете на массу антитела, продукт А и продукт В1 присутствуют в соотношении масс (1:5)-(5:1), например, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1;

продукт А и продукт В3 находятся в соотношении масс (1:5)-(5:1), например, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1;

или

противоопухолевое химиотерапевтическое средство присутствует в единичной дозе 0,1-100 мг, 0,5-50 мг, 1-20 мг, 2-15 мг, 4-12 мг или 8-12 мг;

предпочтительно, продукт А, продукт В или продукт С в наборе имеет форму, подходящую для введения посредством внутривенного капельного вливания, подкожной

инъекции, внутрикожной инъекции, внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции или внутриочаговой инъекции.

16. Способ лечения или предупреждения опухоли, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества компонента А и компонента В по любому из пп.1-13, где предпочтительно способ дополнительно включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества компонента С по любому из пп.1-13;

предпочтительно, компонент А, компонент В и компонент С вводят одновременно или последовательно; более предпочтительно, компонент А, компонент В и компонент С вводят до или после хирургического лечения и/или до или после лучевой терапии;

предпочтительно, когда компонент В представляет собой компонент В1 и/или компонент В3, компонент А или компонент В вводят в единичной дозе 0,1-100 мг, предпочтительно 1-10 мг на кг массы тела индивидуума; или компонент А или компонент В вводят в единичной дозе 10-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг или 200 мг каждому индивидууму;

предпочтительно, компонент В2 присутствует в единичной дозе 0,1-100 мг, 0,5-50 мг, 1-20 мг, 2-15 мг, 4-12 мг или 8-12 мг;

предпочтительно, дозу вводят от двух раз в сутки до приблизительно одного раза в двое суток, или один раз в 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 10 суток, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель или 6 недель;

предпочтительно, путь введения представляет собой внутривенное капельное вливание, подкожную инъекцию, внутрикожную инъекцию, внутривенную инъекцию, внутримышечную инъекцию или внутриочаговую инъекцию.

17. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-13, набор по п.14 или 15, или способ по п.16, где опухоль предпочтительно представляет собой опухоль, экспрессирующую CD47, и предпочтительно злокачественную опухоль; злокачественная опухоль включает солидную опухоль, гематологическую опухоль, лимфому, бластому, саркому, лейкоз или лимфоидную злокачественную опухоль, и более предпочтительно включает плоскоклеточную карциному, миелому, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточную карциному головы и шеи, глиому (например, нейроглиома и рецидивирующая глиома), острый миелоцитарный лейкоз, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелобластный лейкоз, первичную медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны, мелколимфоцитарную лимфому, богатую Т-клетками/гистиоцитами крупноклеточную В-клеточную лимфому, множественную миелому, лейкоз с белком 1 миелоидного лейкоза, рецидивирующую и рефрактерную периферическую Т-клеточную лимфому, миелодиспластический синдром, анапластическую крупноклеточную лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны,

лимфому из клеток маргинальной зоны, миелофиброз, истинную полицитемию, злокачественную опухоль костного мозга, миелопролиферативное заболевание, агрессивный системный мастоцитоз, эозинофилию, взрывающую дерматофибросаркому, хронический эозинофильный лейкоз, желудочно-кишечную злокачественную опухоль, аденокарциному желудка или аденокарциному пищеводно-желудочного перехода, рак яичника, рак печени, лимфоцитарный лейкоз, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, меланому, хондросаркому, нейробластому, аденокарциному, рак поджелудочной железы, аденокарциному панкреатических протоков, мультиформную глиобластому, рак кости, саркому Юинга, рак шейки матки, рак носоглотки, злокачественную опухоль головного мозга, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы, злокачественную опухоль кишечника, рак прямой кишки, рак ободочной и прямой кишки, рак ободочной кишки, печеночно-клеточную карциному, почечноклеточный рак, светлоклеточный почечноклеточный рак, рак головы и шеи, рак горла, гепатобилиарный рак, злокачественную опухоль центральной нервной системы, карциному пищевода, плоскоклеточную карциному пищевода, злокачественную плевральную мезотелиому, системный амилоидоз легких цепей, лимфоцитарную лимфому, миелопролиферативное новообразование, нейроэндокринную опухоль, карциному из клеток Меркеля, рак яичка и рак кожи, рак брюшины, рак фаллопиевых труб, рак уротелия, злокачественную опухоль с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или с дефектом репарации ошибочно спаренных оснований (dMMR) и мезотелиому.

18. Единичный состав, предпочтительно для лечения опухоли, содержащий 1-10000 мг (предпочтительно 10-1000 мг, и предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг или 200 мг) компонента А и компонента В по любому из пп.1-13,

где, когда компонент В представляет собой компонент В1 и/или компонент В3, единичный состав содержит 1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, и предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг) компонента В по любому из пп.1-13;

когда компонент В представляет собой компонент В2, единичный состав содержит 0,1-100 мг, 0,5-50 мг, 1-20 мг, 2-15 мг, 4-12 мг или 8-12 мг компонента В;

предпочтительно, единичный состав дополнительно содержит один или несколько из компонентов С по любому из пп.1-13;

где компонент А, компонент В и компонент С упакованы по отдельности.

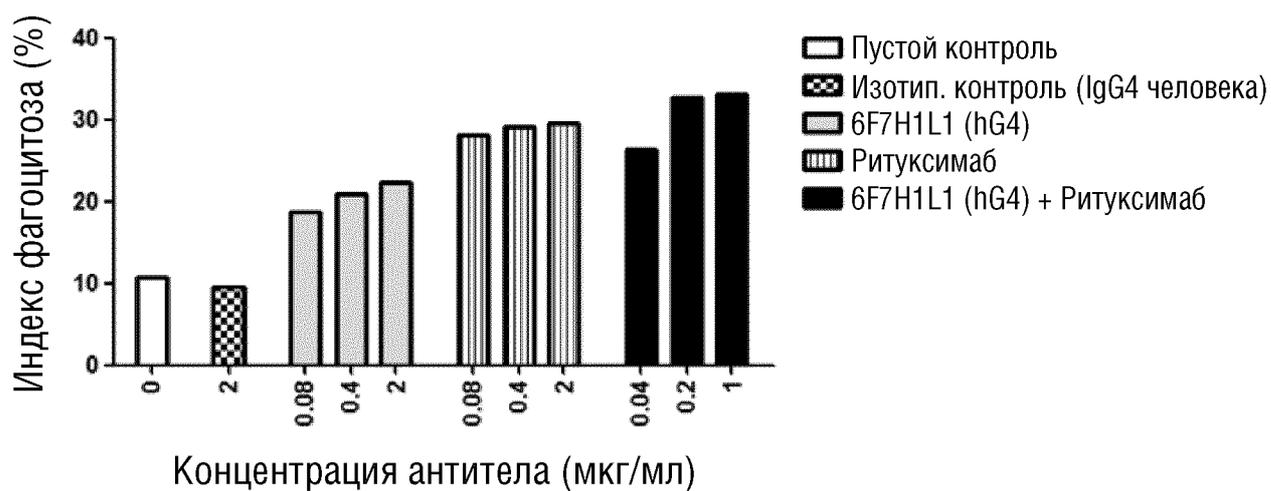
19. Единичная дозированная единица, предпочтительно для лечения опухоли, содержащая 0,1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, и предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг) компонента А и компонента В по любому из пп.1-13,

где, когда компонент В представляет собой компонент В1 и/или компонент В3, единичная дозированная единица содержит 0,1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, и предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг)

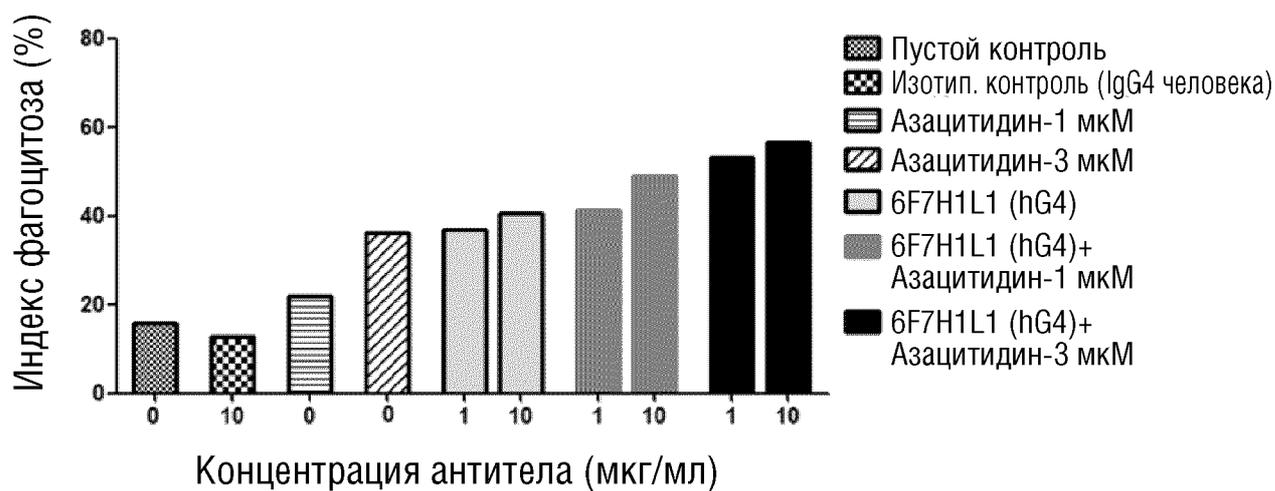
компонента В по любому из пп.1-13;

когда компонент В представляет собой компонент В2, единичная дозированная единица содержит 0,1-100 мг, 0,5-50 мг, 1-20 мг, 2-15 мг, 4-12 мг или 8-12 мг компонента В.

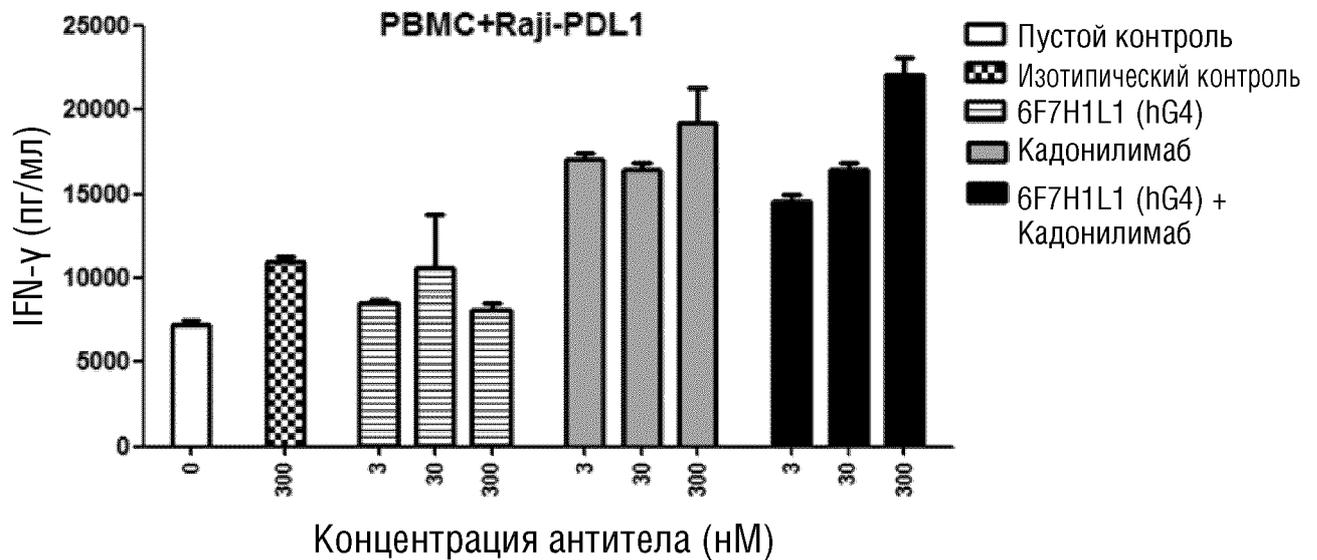
ФИГ.1



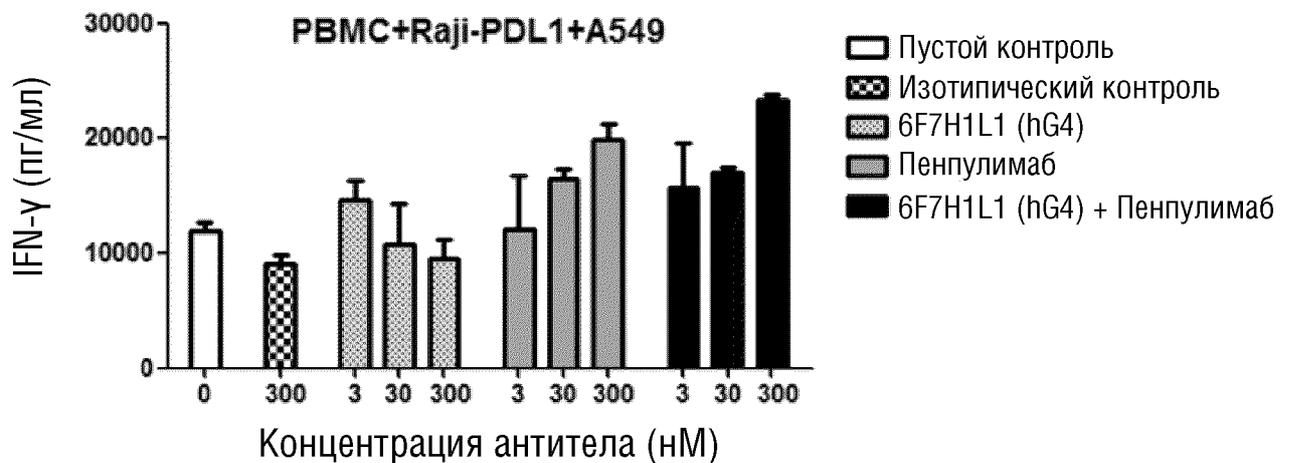
ФИГ.2



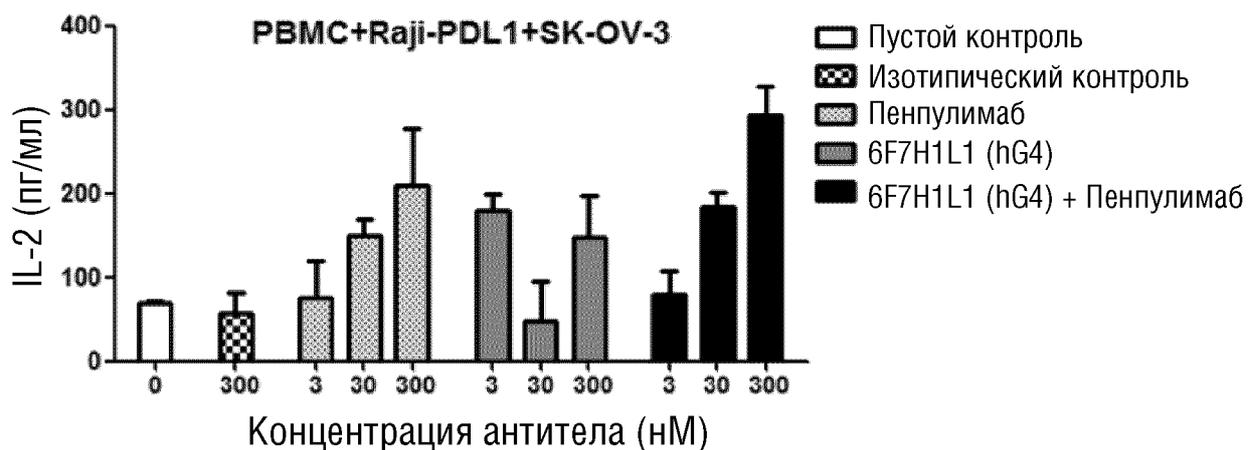
ФИГ.3



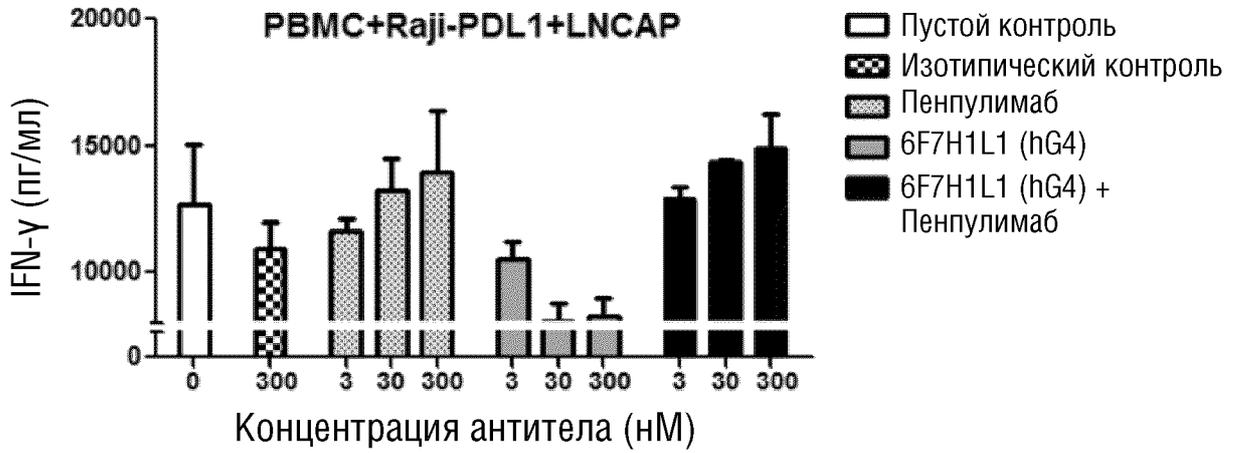
ФИГ.4



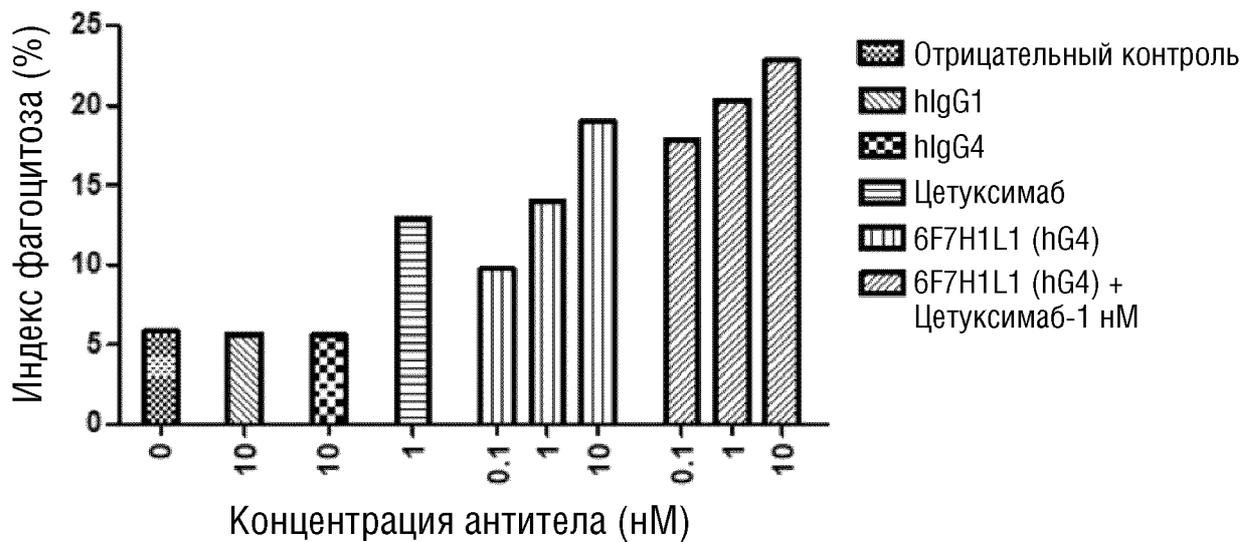
ФИГ.5



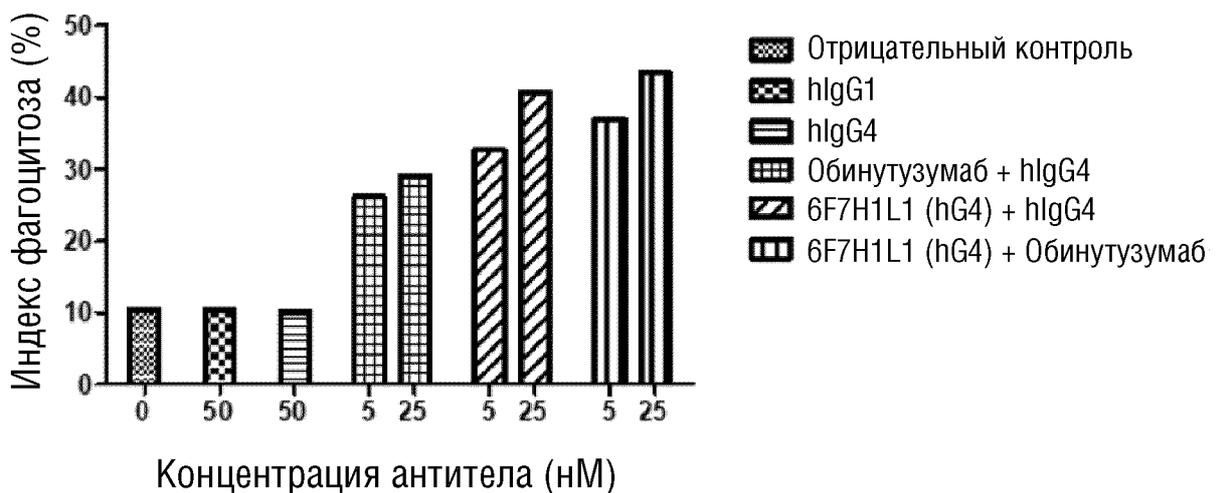
ФИГ.6



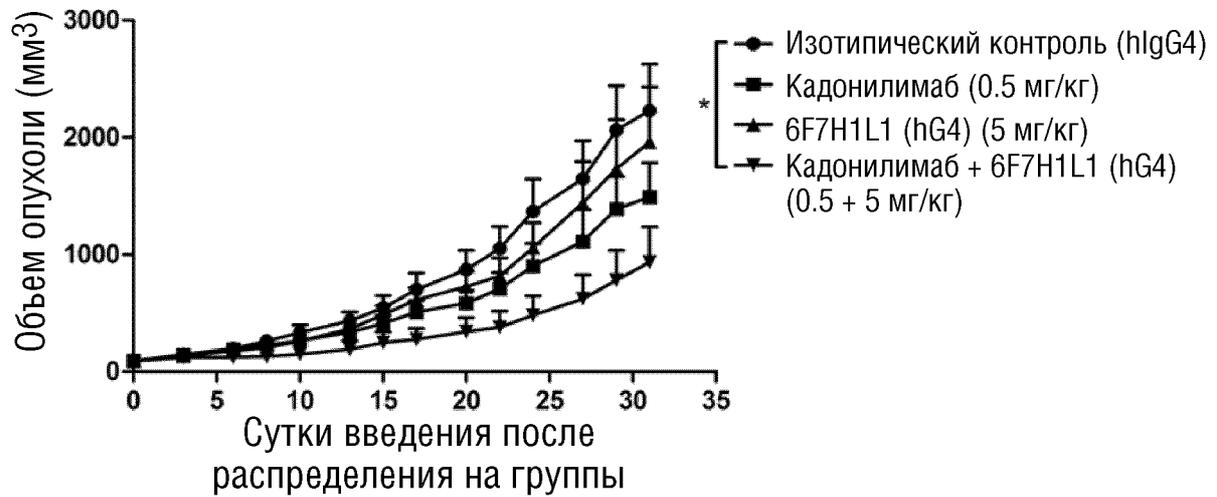
ФИГ.7



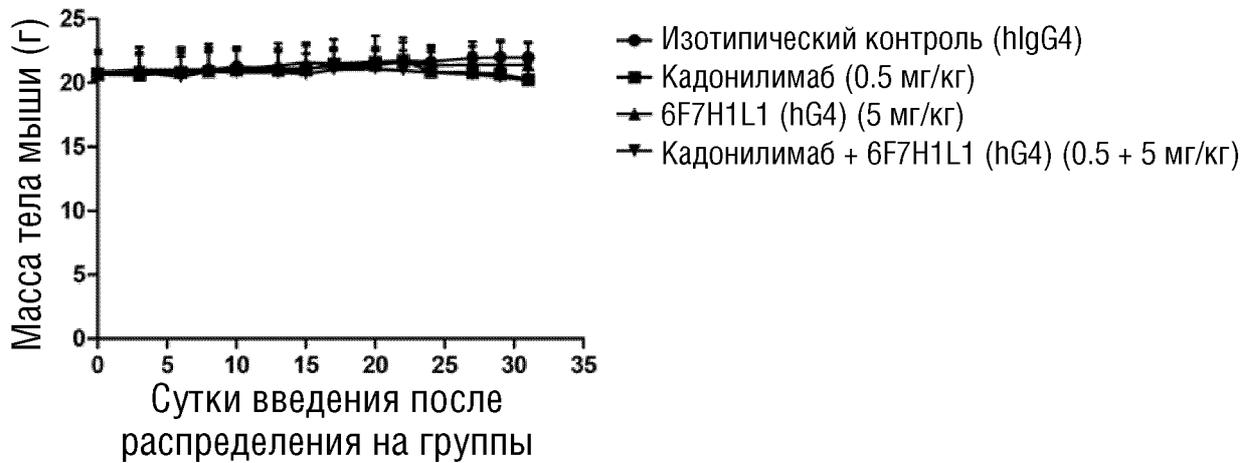
ФИГ.8



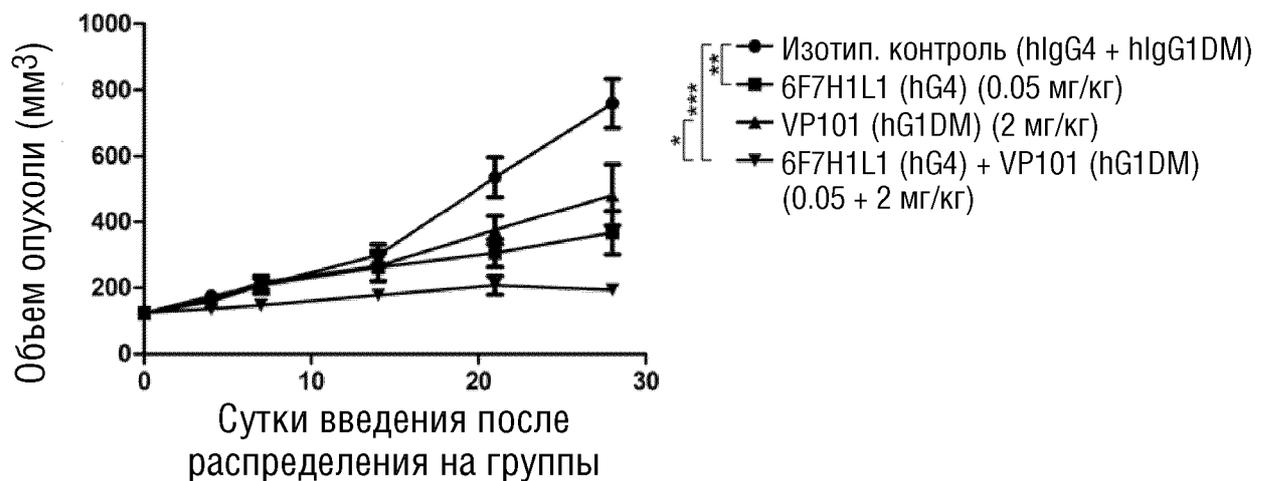
ФИГ.9



ФИГ.10



ФИГ.11



ФИГ.12

