

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202390512 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.06.20(51) Int. Cl. C07K 16/46 (2006.01)  
C07K 16/30 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2022.03.10

## (54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМБИНАЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ-PD-1-ПРОТИВ-VEGFA, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202110270652.7

(72) Изобретатель:

(32) 2021.03.12

Ван Чжунминь, Ли Байюн, Ся Юй  
(CN)

(33) CN

(86) PCT/CN2022/080107

(74) Представитель:

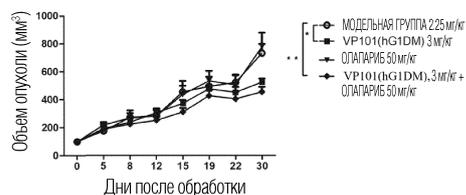
(87) WO 2022/188832 2022.09.15

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

АКЕСО БАЙОФАРМА, ИНК. (CN)

(57) Изобретение относится к области лечения опухолей и к иммунологической биологии. Предложены фармацевтическая комбинация, содержащая биспецифическое антитело против PD-1/против VEGFA, и ее применение. Конкретно, фармацевтическая комбинация содержит по меньшей мере одно биспецифическое антитело и по меньшей мере один ингибитор PARP, где биспецифическое антитело содержит первую функциональную область белка для нацеливания на PD-1 и вторую функциональную область белка для нацеливания на VEGFA; и согласно системе нумерации EU константная область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащаяся в биспецифическом антителе, мутирована в двух сайтах, т.е. в сайте 234 и в сайте 235, и после мутации константа аффинности биспецифического антитела к FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa и/или C1q уменьшается по сравнению с константой аффинности биспецифического антитела к ним до мутации. Комбинированное введение PARPi и биспецифического антитела обладает значительно более сильным терапевтическим эффектом в отношении опухолей, чем индивидуальное применение PARPi или биспецифического антитела; и настоящее изобретение имеет хорошие перспективы применения.



A1

202390512

202390512

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577543EA/085

### **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМБИНАЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ-PD-1-ПРОТИВ-VEGFA, И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области лечения опухолей и иммунобиологии и, в частности, к терапевтической комбинации, содержащей биспецифическое антитело против-PD-1/против-VEGFA, и ее применению. В частности, настоящее изобретение относится к терапевтической комбинации, содержащей биспецифическое антитело против PD-1 человека/против VEGFA человека, и ее применению.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Опухоли, особенно злокачественные, в современном мире представляют собой серьезные заболевания, угрожающие здоровью. Существуют две различные стадии роста опухоли, а именно: от стадии медленного роста без кровеносных сосудов до стадии быстрой пролиферации с наличием кровеносных сосудов. Ангиогенез позволяет опухоли получить достаточно питания для завершения стадии переключения кровеносных сосудов, а без ангиогенеза размер первичной опухоли не превысит 1-2 мм, и, таким образом, метастазирование может не произойти.

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) представляет собой фактор роста, который может способствовать делению и пролиферации эндотелиальных клеток, способствовать образованию новых кровеносных сосудов и улучшать проницаемость кровеносных сосудов. Он связывается с рецепторами фактора роста эндотелия сосудов на клеточной поверхности и играет определенную роль, активируя пути передачи сигнала тирозинкиназы. В опухолевых тканях опухолевые клетки, а также макрофаги и тучные клетки, проникающие в опухоль, могут секретировать на высоком уровне VEGF, стимулировать эндотелиальные клетки сосудов опухоли в паракринной форме, способствовать пролиферации и миграции эндотелиальных клеток, индуцировать ангиогенез, способствовать непрерывному росту опухоли, улучшать сосудистую проницаемость, вызывать отложение фибрина в окружающих тканях и способствовать инфильтрации мононуклеарных клеток, фибробластов и эндотелиальных клеток, что способствует образованию стромы опухоли и проникновению опухолевых клеток в новые кровеносные сосуды, а также способствует метастазированию опухоли. Поэтому ингибирование опухолевого ангиогенеза рассматривается как один из наиболее перспективных методов лечения опухолей в настоящее время. Семейство VEGF включает VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD и PlGF. Рецепторы фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) включают VEGFR1 (также известный как Flt1), VEGFR2 (также известный как KDR или Flk1), VEGFR3 (также известный как Flt4) и нейропилин-1 (NRP-1). Первые три рецептора являются членами суперсемейства тирозинкиназ и имеют сходные структуры, состоящие из экстрамембранной области, трансмембранного сегмента и внутримембранной

области, где экстрамембранная область состоит из иммуноглобулиноподобного домена, а внутримембранная область представляет собой тирозинкиназную область. VEGFR1 и VEGFR2 в основном присутствуют на поверхности эндотелиальных клеток сосудов, а VEGFR3 в основном присутствует на поверхности эндотелиальных клеток лимфатических сосудов.

Молекулы семейства VEGF обладают различными аффинностями к этим рецепторам. VEGFA в основном действует в комбинации с VEGFR1, VEGFR2 и NRP-1. VEGFR1 является первым распознаваемым рецептором и имеет более высокую аффинность к VEGFA, чем VEGFR2, в нормальных физиологических условиях, но более низкую тирозиназную активность во внутриклеточном сегменте, чем VEGFR2 (Ma Li, Chinese Journal of Birth Health and Heredity, 24(5) (2016):146-148).

VEGFR2 является основным регулятором ангиогенеза и сосудистого конструирования и обладает гораздо более высокой тирозинкиназной активностью, чем VEGFR1. VEGFR2 после связывания с лигандом VEGFA опосредует пролиферацию, дифференцировку и другие процессы эндотелиальных клеток сосудов, а также процесс образования сосудов и проницаемость сосудов (Roskoski R Jr. et al., Crit Rev Oncol Hematol, 62(3) (2007):179-213). VEGFA после связывания с VEGFR2 опосредует транскрипцию и экспрессию генов родственных внутриклеточных белков посредством нижестоящего сигнального пути PLC- $\gamma$ -PKC-Raf-MEK-MAPK и, таким образом, способствует пролиферации эндотелиальных клеток сосудов (Takahashi T et al., Oncogene, 18(13) (1999):2221-2230).

VEGFR3 является одним из членов семейства тирозинкиназ и в основном экспрессируется в эмбриональных эндотелиальных клетках сосудов и зрелых лимфатических эндотелиальных клетках, а VEGFC и VEGFD связываются с VEGFR3, чтобы стимулировать пролиферацию и миграцию лимфатических эндотелиальных клеток и способствовать регенерации лимфатических сосудов; NRP-1 представляет собой трансмембранный белок, не являющийся тирозинкиназой, и не способен к независимой передаче биологических сигналов, но способен опосредовать передачу сигналов только после образования комплекса с тирозинкиназным рецептором VEGF. (Ma Li, Chinese Journal of Birth Health and Heredity, 24(5) (2016):146-148).

VEGFA и VEGFR2 в основном участвуют в регуляции ангиогенеза, где до и после связывания VEGFA с VEGFR2 формируется каскадная реакция многочисленных промежуточных сигналов в восходящих и нисходящих путях передачи сигналов, и, наконец, физиологические функции изменяются путем пролиферации, выживания, миграции, увеличение проницаемости, инфильтрация периферических тканей и другие паттерны эндотелиальных клеток (Dong Hongchao et al., Sep. 2014, Journal of Modern Oncology, 22(9): 2231-3).

Рецептор программируемой клеточной смерти-1 (PD-1), также известный как CD279, представляет собой трансмембранный гликопротеиновый мембранный рецептор клеточной поверхности типа I и член суперсемейства иммуноглобулинов CD28 и обычно

экспрессируется в Т-клетках, В-клетках и миелоидных клетках. PD-1 имеет два естественных лиганда, PD-L1 и PD-L2. Как PD-L1, так и PD-L2 являются членами суперсемейства B7 и экспрессируются конститутивно или индуцируемо на поверхности мембран различных клеток, включая клетки, отличные от гематопоэтических, и различные опухолевые клетки. PD-L1 в основном экспрессируется на Т-клетках, В-клетках, DC и эндотелиальных клетках микрососудов, а также на различных опухолевых клетках, в то время как PD-L2 экспрессируется только на антигенпрезентирующих клетках, таких как дендритные клетки и макрофаги. Взаимодействие между PD-1 и его лигандами может ингибировать активацию лимфы, пролиферацию Т-клеток и секрецию цитокинов, таких как IL-2 и IFN- $\gamma$ .

Большое количество исследований продемонстрировало, что микроокружение опухоли может защищать опухолевые клетки от повреждения иммунными клетками, экспрессия PD-1 в лимфоцитах, инфильтрирующих микроокружение опухоли, повышается, а различные первичные опухолевые ткани PD-L1-положительны в иммуногистохимическом анализе, такие как рак легкого, рак печени, рак яичника, рак кожи, рак толстой кишки и глиома. Между тем экспрессия PD-L1 в опухоли достоверно коррелирует с плохим прогнозом у онкологических больных. Блокирование взаимодействия между PD-1 и его лигандами может стимулировать опухолеспецифический Т-клеточный иммунитет и повышать эффективность иммунной элиминации опухолевых клеток. Большое количество клинических испытаний показало, что антитела, нацеленные на PD-1 или PD-L1, могут способствовать инфильтрации CD8<sup>+</sup> Т-клеток в опухолевые ткани и активировать противоопухолевые иммунные эффекторные факторы, такие как IL-2, IFN- $\gamma$ , гранзим В и перфорин, тем самым эффективно ингибируя рост опухолей.

Из-за широких противоопухолевых перспектив и удивительной эффективности антител против PD-1 в отрасли широко признано, что антитела, нацеленные на путь PD-1, обеспечат прорыв в лечении различных опухолей: для лечения немелкоклеточного рака легкого, почечно-клеточного рака, рака яичника и меланомы (Homet M.B., Parisi G., et al, *Anti-PD-1 Therapy in Melanoma. Semin Oncol.*, Jun; 42(3) (2015):466-473), лимфомы и анемии (Held S.A., Heine A., et al, *Advances in Immunology of Biliary Muscle Fabric CML. Curr. Cancer Drug Targets*, Sep; 13(7) (2013):768-74), или опухолей с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR) (несколько лекарственных средств на основе антител против PD-1 были одобрены FDA или другими регулирующими органами для лечения опухолей с характеристиками MSI-H/dMMR).

Современная комбинированная терапия антиангиогенного лечения и ингибиторов иммунных контрольных точек продемонстрировала хорошую эффективность при многих опухолях. Например, комбинации антител против VEGF, таких как бевацизумаб, и антител против PD-1/PD-L1, таких как ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб и т. д., продемонстрировали хорошую эффективность при раке яичника (Joyce F. Liu, et al., *JAMA Oncol.*, 2019; 5(12):1731-1738.), немелкоклеточном раке легкого (включая

немелкоклеточный рак легкого с мутациями, чувствительными к EGFR и/или ALK) (Manegold C, et al., *J Thorac Oncol.*, 2017 Feb; 12(2):194-207), почечно-клеточной карциноме (Dudek AZ, et al., *J Clin Oncol.*, 2018; 36 (suppl; abstr 4558 4558)), гепатоцеллюлярной карциноме (Stein S et al., *J Clin Oncol*, 2018, 36(15\_suppl):4074.; комбинация бевацизумаба и атезолизумаба для лечения гепатоцеллюлярной карциномы была одобрена FDA в 2020 г.), при колоректальном раке (включая MSI-H/dMMR и типы, отличные от MSI-H/dMMR) (Bendell JC, et al., American Society of Clinical Oncology; May 29-June 2, 2015; Chicago, IL. 2015; abstract 704; Hochster HS, et al., American Society of Clinical Oncology Gastrointestinal Cancers Symposium; January 19-21, 2017; San Francisco, CA. 2017; abstract 673.) и раке молочной железы (Yukinori Ozaki, et al., AACR; *Cancer Res*, 2020; 80(4 Suppl): реферат № PD1-03.); комбинация антитела против VEGFR2 и антитела против PD-1 также продемонстрировала хорошую противоопухолевую эффективность при аденокарциноме пищеводно-желудочного перехода (Herbst RS, et al., *Lancet Oncol.*, 2019; 20(8):1109-1123.); Комбинация антитела против PD-1 (пембролизумаб) и ингибитора ангиогенеза (ленватиниб) показала хорошую эффективность при лечении рака эндометрия и одобрена FDA для лечения рака эндометрия в 2019 году. Для таких опухолей, как меланома (антитела против PD-1 ниволумаб и пембролизумаб были одобрены FDA для лечения меланомы), рака шейки матки (Krishnansu S., et al., *N Engl J Med* 2014; 370:734-743.), глиомы, рака предстательной железы (Antonarakis ES., et al., *J Clin Oncol.*, Feb. 10, 2020; 38(5):395-405.), уротелиальной карциномы (Joaquim Bellmunt, et al., *N Engl J Med*, 2017; 376:1015-1026; ниволумаб был одобрен FDA в 2017 г. для лечения рака мочевого пузыря), рака пищевода (Kato K, et al., *Lancet Oncol.* 2019; 20(11):1506-17.) и мезотелиомы (Scherpereel A, et al., *Lancet Oncol.*, 2019; 20(2):239-253.), антитела против PD-1/PDL-1 показали хорошую эффективность. Принимая во внимание синергизм пути PD-1 и пути VEGF в онкогенезе, ожидается более высокая противоопухолевая эффективность у лекарственных средств, которые блокируют как путь PD-1, так и VEGF.

ПолиАДФ-рибозополимеразы (PARP) являются членами семейства ферментов PARP и включают PARP-1, PARP-2, PARP-3 и Vallt-PARP. PARP играет ключевую роль в пути репарации ДНК. Когда ДНК разрывается, активируется PARP. Являясь молекулярным сенсором повреждения ДНК, она участвует в процессе репарации ДНК, распознавая и связываясь с сайтом расщепления ДНК и, таким образом, активируя и катализируя полиАДФ-рибозилирование рецепторного белка.

Ингибиторы PARP могут проявлять противоопухолевую эффективность, опосредуя синтетическую летальность. В дополнение к PARP-опосредованной репарации ДНК могут возникать другие механизмы репарации ДНК. Гомологичная рекомбинация относится к рекомбинации, которая происходит между несестринскими хроматидами или между или внутри молекул ДНК, содержащих гомологичные последовательности на одной и той же хромосоме. Репарация гомологичной рекомбинации ДНК (HRR) является важным паттерном репарации повреждений двухцепочечной ДНК. BRCA1 и BRCA2 являются ключевыми белками в этом процессе, и если мутация гена BRCA приводит к дефициту

белков BRCA1 и BRCA2, может возникнуть дисфункция HRR или HRD (дефицит гомологичной рекомбинации). Аномалии в других связанных с HRR генах, таких как PALB2, ATM, BRCA1/2, CHEK2, BARD1, BRIP1, Mre11, CDK12, RAD50, NBS1, RAD51C, RAD51D и PALB2, метилирование промотора гена BRCA1 и другие неуказанные факторы могут привести к HRD и геномной нестабильности (Lord CJ, Ashworth A, Science, 2017; 355(6330):1152-1158). Атлас генома рака (TCGA) обнаружил HRD (дефицит гомологичной рекомбинации) более чем в 50% случаев высокозлокачественного серозного рака яичника, включая мутации BRCA1/2 зародышевой линии (15%), соматические мутации BRCA1/2 (6%), эпигенетически измененное метилирование промотора BRCA1 (11%), амплификацию EMSY (8%), мутации PTEN (7%), метилирование RAD51C (3%), мутации ATM или ATR (2%) и другие мутации гена HRD (5%) (Turner NC., N Engl J Med., 2017; 377(25):2490-2492).

Синтетическая летальность относится к явлению, при котором одновременная инактивация двух нелетальных генов приводит к гибели клетки. Ингибиторы PARP могут связываться с каталитическим сайтом PARP1 или PARP2, что приводит к невозможности отсоединения белков PARP от места повреждения ДНК и, таким образом, к остановке вилки репликации ДНК и нарушению репликации ДНК; если PARP ингибируется, а белки, связанные с HRR, дефектны, возникает синтетическая летальность.

Для опухолевых клеток, несущих специфический дефицит репарации ДНК (например, мутации генов BRCA1 или BRCA2 зародышевой линии), ингибирование PARP может препятствовать репарации ДНК в опухолевых клетках и способствовать гибели опухолевых клеток посредством синтетической летальности.

Ингибитор PARP (PARPi) продемонстрировал хорошую эффективность в клинических исследованиях рака, такого как рак яичников, рак молочной железы, рак предстательной железы и рак поджелудочной железы, и был одобрен для использования при лечении таких видов рака, как рак яичников, рак маточной трубы, перитонеальный рак и рак молочной железы, несущий дефицитом гомологичной рекомбинации (J. Mateo et al., Ann Oncol., Sep. 1, 2019; 30(9):1437-1447.); PARPi также продемонстрировал хорошую эффективность при раке поджелудочной железы и раке предстательной железы. PARPi все еще демонстрирует определенную противоопухолевую эффективность в опухолях, которые не несут дефицит репарации ДНК (например, мутации гена BRCA1 или BRCA2 зародышевой линии). В клиническом исследовании NOVA, по сравнению с плацебо, PFS пациентов, получавших нирапариб, была значительно продлена, независимо от того, является ли пациент носителем мутации гена с дефицитом гомологичной рекомбинации или нет (Mirza MR, et al., N Engl J Med, 2016; 375). (22):2154-2164.); другие PARPi, такие как олапариб и рукапариб, также продемонстрировали хорошую эффективность у пациентов с опухолями без генных мутаций, дефицитных по гомологичной рекомбинации (J. Mateo, et al., Ann Oncol., Sep. 1, 2019; 30(9):1437-1447.).

В настоящее время одобрено четыре ингибитора PARP: олапариб (AstraZeneca), рукапариб (Clovis Oncology, США), нирапариб (Tasarg) и талазопариб (Pfizer). Флузопариб (Hengrui Pharmaceuticals, Китай) был одобрен в Китае для лечения пациентов с

чувствительным к препаратам платины рецидивирующим раком яичника, раком маточной трубы или первичным перитонеальным раком с мутациями BRCA зародышевой линии, которые ранее прошли две или более линии химиотерапии. Кроме того, велипариб ER, АВТ-472, АВТ-767, стенопариб, АСТ-6828, АG-PD, АNG-2864, АNG-3038, АNG-3186, АZD-5305, АZ-0108, АZD-2461, АМХI-5001, АМХI-2001, АМХI-3001, АМХI-7001, АМХI-9001, памипариб, ZYTP-1, СК-102, ХZ-120312, YHP-743, иобенгуан I 131, рукапариб камсилат, CVL-218, СРН-101, СРН-102, СВХ-11, СВХ-15, миноциклин, DB-207, DPS-102, E-7016, иобенгуан I 131, МК-2512, НСХ-014, НWH-340, IDХ-1197, IDХ-1197, сенапариб, IMP-04100, IMP-04111, IMP-04149, IMP-04249, IMP-04307, IMP-04356, JPI-289, JPI-547, JPI-283, флузопариб, GT-1620, иобенгуан I 131, DR-2313, MP-124, H-10, NT-125, BGP-15, NMSP-293, NMSP-293, NMSP-118, NMSP-648, NMSP-914, DB-207, NUV-1156, NUV-1176, JPI-289, стенопариб, ОХ-401, NU-1025, NU-1085, PLX-376, R-554, RBN-2397, RBN-012759, PJ-34, INO-1001, WW-46, BSI-401, инипариб, SOMCL-9112, SC-10914, НТМС-0435, SRX-3128, TSL-1502, PJ-34, CEP-8983, СК-102, THG-009, талазопариб SR, L-2286, митопариб и WB- 1340 находятся в разработке.

Бифункциональные антитела, также известные как биспецифические антитела, представляют собой специфические терапевтические средства, нацеленные одновременно на два разных антигена, и могут быть получены путем очистки с помощью иммуноселекции. Кроме того, биспецифические антитела также могут быть получены с помощью генной инженерии и имеют определенные преимущества благодаря соответствующей гибкости в таких аспектах, как оптимизация сайтов связывания, рассмотрение синтетической формы и выхода. В настоящее время было показано, что биспецифическое антитело существует более чем в 45 формах (Müller D, Kontermann RE. Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: current perspectives. *BioDrugs*, 2010; 24:89-98). Ряд биспецифических антител был разработан в форме IgG-scFv, а именно в форме Моррисона (Coloma M.J., Morrison S.L. Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies. *Nat Biotechnol.*, 1997; 15:159-163), которая, как было показано, является одной из идеальных форм биспецифических антител из-за ее сходства с существующей в природе формой IgG и преимуществ в конструировании, экспрессии и очистке антител (Miller B.R., Demarest S.J., et al., *Protein Eng Des Sel*, 2010; 23:549-57; Fitzgerald J, Lugovskoy A. *MAbs*, 2011; 3:299-309).

Доклинические исследования показали, что PARPi может запускать распознавание опухолевых клеток иммунной системой на основе как неоантигенов, так и не-неоантигенов, предполагая, что его комбинация с ингибиторами иммунных контрольных точек может привести к большей эффективности (Mateo J, et al., *Ann Oncol.*, 2019; 30(9):1437-1447.) Ингибирование PARP индуцирует повышенную экспрессию PD-L1 в опухолевых клетках, что приводит к иммуносупрессии и, таким образом, к снижению эффективности PARPi. Таким образом, блокирование PD-(L)1 при ингибировании PARP позволяет избежать иммуносупрессии, что приводит к более сильной противоопухолевой активности ингибиторов PARPi и PD-(L)1 (Jiao S, et al., *Clin Cancer Res.*, 2017; 23(14):3711-3720.). С

другой стороны, для опухолевых клеток мутации в родственных генах вызывают специфические недостатки репарации ДНК, накопление повреждений ДНК вызывает увеличение различий между опухолевыми клетками и нормальными клетками и легкость распознавания опухолевых клеток иммунной системой. Большое количество мутаций в опухолях приведет к тому, что выживание опухолевых клеток будет в большей степени зависеть от ингибирования иммунной системы. Таким образом, совместное применение лекарственных средств на основе PARP<sub>i</sub> и PD-1 имеет определенную теоретическую основу. Помимо PD-1, например, биспецифические антитела против-PD-1/VEGFA также блокируют VEGF-A, который имеет высокую корреляцию с экспрессией PD-1 в микроокружении опухоли, и подавляют прогрессирование опухоли с помощью таких механизмов, как ингибирование ангиогенеза.

Поэтому разработка лечения или комбинированной терапии с более высокой эффективностью имеет большое значение.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Благодаря изобретательским усилиям авторы изобретения провели углубленные исследования комбинированной терапии антителами против-PD-1/против-VEGFA и ингибиторами PARP при лечении опухолей и обнаружили, что комбинированное применение этих двух препаратов имеет хорошую эффективность при лечении и/или предотвращение опухолей, особенно злокачественных опухолей. Настоящее изобретение подробно описано ниже.

Один аспект настоящего изобретения относится к терапевтической комбинации, содержащей по меньшей мере одно биспецифическое антитело и по меньшей мере один ингибитор PARP,

где биспецифическое антитело содержит:

первую функциональную область белка, нацеленную на PD-1, и

вторую функциональную область белка, нацеленную на VEGFA;

где первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело; или первая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело, а вторая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин;

где,

иммуноглобулин содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28-30, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 31-33, соответственно; одноцепочечное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34-36, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 37-39 соответственно;

или,

иммуноглобулин содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34-36, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 37-39 соответственно; одноцепочечное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28-30, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 31-33, соответственно;

иммуноглобулин относится к подтипу IgG1 человека;

где, в соответствии с системой нумерации EU, иммуноглобулин содержит константную область тяжелой цепи, имеющую мутации в любых 2 или 3 положениях 234, 235 и 237, и константа аффинности биспецифического антитела против FcγR1a и/или C1q снижается после мутации по сравнению с тем, что было до мутации; предпочтительно константу аффинности измеряют с помощью системы Fortebio Octet.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации в соответствии с системой нумерации EU константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет следующие мутации:

L234A и L235A; или

L234A и G237A; или

L235A и G237A;

или

L234A, L235A и G237A.

В настоящем изобретении буквы перед номером положения представляют аминокислоты до мутации, а буквы после номера положения представляют аминокислоты после мутации, если не указано иное.

Настоящее изобретение также относится к терапевтической комбинации, содержащей по меньшей мере одно биспецифическое антитело и по меньшей мере один ингибитор PARP,

где биспецифическое антитело содержит:

первую функциональную область белка, нацеленную на PD-1, и

вторую функциональную область белка, нацеленную на VEGFA;

где первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело; или первая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело, а вторая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин;

где,

иммуноглобулин содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28-30, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 31-33, соответственно;

одноцепочечное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34-36, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 37-39 соответственно;

или,

иммуноглобулин содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34-36, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 37-39 соответственно; одноцепочечное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28-30, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 31-33, соответственно;

иммуноглобулин относится к подтипу IgG1 человека.

Настоящее изобретение также относится к терапевтической комбинации, содержащей по меньшей мере одно биспецифическое антитело и по меньшей мере один ингибитор PARP.

где биспецифическое антитело содержит:

первую функциональную область белка, нацеленную на PD-1, и вторую функциональную область белка, нацеленную на VEGFA;

где первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело; или первая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело, а вторая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин;

где,

иммуноглобулин содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28-30, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 31-33, соответственно; одноцепочечное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34-36, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 37-39 соответственно;

или,

иммуноглобулин содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34-36, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 37-39 соответственно; одноцепочечное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28-30,

соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 31-33, соответственно;

иммуноглобулин относится к подтипу IgG1 человека;

где, в соответствии с системой нумерации EU, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет следующие мутации:

L234A и L235A; или

L234A и G237A; или

L235A и G237A; или

L234A, L235A и G237A.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации в соответствии с системой нумерации EU константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет или дополнительно имеет одну или более мутаций, выбранных из:

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.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации

переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, а переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 9, а переменная область легкой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 17;

или,

переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 9, а переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 17; переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, а переменная область легкой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтическая комбинация выбрана из любой из следующих (1)-(12):

(1)

переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, а переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; переменная область тяжелой





В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации:

иммуноглобулин содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения, для терапевтической комбинации биспецифическое антитело находится в форме IgG-scFv, т. е. в формате Моррисона.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации

константная область тяжелой цепи иммуноглобулина выбрана из константной области тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, и иммуноглобулин содержит константную область легкой цепи, выбранную из константной области легкой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации

константная область тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig человека или С-область цепи гамма-4 Ig человека, а константная область легкой цепи иммуноглобулина представляет собой С-область каппа-цепи Ig человека.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения константные области иммуноглобулина гуманизированы. Например, константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig, № ДОСТУПА: P01857, а константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, № ДОСТУПА: P01834; или

константная область тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой С-область цепи гамма-4 Ig, № ДОСТУПА: P01861.1, а константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, № ДОСТУПА: P01834.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения константная С-область тяжелой цепи гамма-1 Ig (№ ДОСТУПА: P01857) имеет следующую аминокислотную последовательность:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  
ELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

В одном варианте осуществления настоящего изобретения константная С-область тяжелой цепи гамма-4 Ig (№ ДОСТУПА: P01861.1) имеет следующую аминокислотную последовательность:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA

VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFL  
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV  
DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 41)

В одном варианте осуществления настоящего изобретения константная область легкой цепи, С-область каппа-цепи Ig (№ ДОСТУПА: P01834) имеет следующую аминокислотную последовательность:

RTAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
VTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID  
NO: 42)

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации одноцепочечное антитело связано с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина. Поскольку иммуноглобулин имеет две тяжелые цепи, две молекулы одноцепочечного антитела связаны с одной молекулой иммуноглобулина. Предпочтительно две молекулы одноцепочечного антитела идентичны.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации присутствуют два одноцепочечных антитела, и один конец каждого одноцепочечного антитела связан с С-концом или N-концом одной из двух тяжелых цепей иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дисульфидная связь присутствует между VH и VL одноцепочечного антитела. Способы введения дисульфидных связей между VH и VL антитела хорошо известны в данной области, см., например, US 5747654; Rajagopal, et al., Prot. Engine., 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; and Reiter, et al., Cancer Res., 54(1994)2714-2718, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации первая функциональная область белка связана со второй функциональной областью белка либо непосредственно, либо через линкерный фрагмент; и/или переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с переменной областью легкой цепи одноцепочечного антитела либо непосредственно, либо через линкерный фрагмент.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации линкерный фрагмент представляет собой (GGGS)<sub>n</sub>; n представляет собой положительное целое число, и предпочтительно n равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для

терапевтической комбинации количество первой функциональной области белка и второй функциональной области белка, каждое независимо, составляет 1, 2 или более.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации одноцепочечное антитело связано с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина.

Настоящее изобретение также относится к терапевтической комбинации, содержащей по меньшей мере одно биспецифическое антитело и по меньшей мере один ингибитор PARP,

где биспецифическое антитело содержит:

первую функциональную область белка, нацеленную на PD-1, и

вторую функциональную область белка, нацеленную на VEGFA;

количество первой функциональной области белка равно 1, а количество второй функциональной области белка равно 2;

где первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело;

иммуноглобулин содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;

одноцепочечное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; или

одноцепочечное антитело связано с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина;

первая функциональная область белка связана со второй функциональной областью белка через первый линкерный фрагмент; переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с переменной областью легкой цепи одноцепочечного антитела через второй линкерный фрагмент; первый линкерный фрагмент и второй линкерный фрагмент идентичны или различны;

предпочтительно аминокислотные последовательности первого линкерного фрагмента и второго линкерного фрагмента независимо выбраны из SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19;

предпочтительно аминокислотные последовательности первого линкерного фрагмента и второго линкерного фрагмента представлены в SEQ ID NO: 18.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с FcγRI с константой аффинности менее примерно  $10^{-6}$  М, например, менее примерно  $10^{-7}$  М,  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М или менее; предпочтительно константу аффинности измеряют с помощью системы Fortebio Octet.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C1q с константой аффинности менее примерно  $10^{-9}$  М, например,

менее примерно  $10^{-7}$  М,  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М или менее; предпочтительно константу аффинности измеряют с помощью системы ForteBio Octet.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с белком VEGFA и/или белком PD-1 с KD менее  $10^{-5}$  М, например менее  $10^{-6}$  М,  $10^{-7}$  М,  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М или  $10^{-10}$  М или менее; предпочтительно KD измеряют с помощью прибора для молекулярного взаимодействия ForteBio.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации

биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с белком VEGFA с  $EC_{50}$  менее 1 нМ, менее 0,5 нМ, менее 0,2 нМ, менее 0,15 нМ или менее 0,14 нМ; предпочтительно  $EC_{50}$  измеряют с помощью косвенного ИФА;

и/или,

биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с белком PD-1 с  $EC_{50}$  менее 1 нМ, менее 0,5 нМ, менее 0,2 нМ, менее 0,17 нМ, менее 0,16 нМ или менее 0,15 нМ; предпочтительно  $EC_{50}$  измеряют с помощью косвенного ИФА.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело представляет собой моноклональное антитело.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации ингибитор PARP выбирают из одного или более из олапариба, рукапариба, нирапариба, талазопариба, флузопариба, велипариба ER, АВТ-472, АВТ-767, стенопариба, AST-6828, AG-PD, ANG-2864, ANG-3038, ANG-3186, AZD-5305, AZ-0108, AZD-2461, AMXI-5001, AMXI-2001, AMXI-3001, AMXI-7001, AMXI-9001, памипариба, ZYTP-1, СК-102, XZ-120312, YHP-743, иобенгуана I 131, рукапариб камзилата, CVL-218, СРН-101, СРН-102, СВХ-11, СВХ-15, миноциклина, DB-207, DPS - 102, E-7016, иобенгуана I 131, МК-2512, НСХ-014, НВН-340, IDX-1197, IDX-1197, сенапариба, IMP-04100, IMP-04111, IMP-04149, IMP-04249, IMP-04307, IMP-04356, JPI-289, JPI-547, JPI-283, флузопариба, GT-1620, иобенгуана I 131, DR-2313, MP-124, H-10, NT-125, BGP-15, NMSP-293, NMSP-293, NMSP-118, NMSP-648, NMSP-914, DB-207, NUV-1156, NUV-1176, JPI-289, Стенопариба, OX-401, NU-1025, NU-1085, PLX-376, R-554, RBN-2397, RBN-012759, PJ-34, INO-1001, WW-46, BSI-401, инипариба, SOMCL-9112, SC-10914, НТМ С-0435, SRX-3128, TSL-1502, PJ-34, CEP-8983, СК-102, THG-009, талазопариба SR, L-2286, митопариба и WB-1340.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтическая комбинация дополнительно содержит одно или более противоопухолевых химиотерапевтических средств;

предпочтительно противоопухолевое химиотерапевтическое средство выбирают из ингибитора топоизомеразы II (TOP2), и предпочтительно ингибитор топоизомеразы II

(TOP2) представляет собой этопозид;

предпочтительно противоопухолевое химиотерапевтическое средство выбирают из таксана, и предпочтительно таксан выбирают из паклитаксела, паклитаксела, связанного с альбумином, липосомного паклитаксела и доцетаксела;

предпочтительно противоопухолевое химиотерапевтическое средство выбирают из лекарственного средства на основе платины, предпочтительно лекарственное средство на основе платины выбирают из цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина;

предпочтительно противоопухолевое химиотерапевтическое средство выбирают из одного или более из гемцитабина, пеметрекседа и капецитабина.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтическая комбинация представляет собой фиксированную комбинацию, например, в форме твердой фармацевтической композиции или жидкой фармацевтической композиции; или

терапевтическая комбинация представляет собой нефиксированную комбинацию, например, биспецифическое антитело, ингибитор PARP и противоопухолевое химиотерапевтическое средство находятся в форме фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для терапевтической комбинации фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена в виде любой лекарственной формы, известной в области фармацевтики, такой как таблетка, пилюля, суспензия, эмульсия, раствор, гель, капсула, порошок, гранула, эликсир, пастилка, суппозиторий, инъекция (включая раствор для инъекции, стерильный порошок для инъекций и концентрированный раствор для инъекций), ингалянт и спрей. Предпочтительная лекарственная форма зависит от предполагаемого пути введения и терапевтического применения. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению должна быть стерильной и стабильной в условиях изготовления и хранения. Одной предпочтительной лекарственной формой является инъекция. Такие инъекции могут представлять собой стерильные растворы для инъекций. Например, стерильные растворы для инъекций можно приготовить следующим способом: необходимое количество биспецифического антитела по настоящему изобретению добавляют в соответствующий растворитель и, необязательно, другие желаемые ингредиенты (включая, но не ограничиваясь ими, регуляторы pH, одновременно добавляют поверхностно-активные вещества, адъюванты, усилители ионной силы, изотонические агенты, консерванты, разбавители или любую их комбинацию) с последующей фильтрацией и стерилизацией. Кроме того, стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены в виде стерильных лиофилизированных порошков (например, путем вакуумной сушки или лиофилизации) для простоты хранения и использования. Такие стерильные лиофилизированные порошки могут быть диспергированы в подходящем носителе (например, в стерильной апиrogenной воде) перед использованием.

Кроме того, биспецифическое антитело или ингибитор PARP по настоящему

изобретению могут присутствовать в фармацевтической композиции в форме стандартной дозы для простоты введения. В некоторых вариантах осуществления стандартная доза составляет по меньшей мере 1 мг, по меньшей мере 5 мг, по меньшей мере 10 мг, по меньшей мере 15 мг, по меньшей мере 20 мг, по меньшей мере 25 мг, по меньшей мере 30 мг, по меньшей мере 45 мг, по меньшей мере 50 мг, по меньшей мере 75 мг или по меньшей мере 100 мг. Когда фармацевтическая композиция находится в жидкой (например, инъекционной) лекарственной форме, она может содержать биспецифическое антитело по настоящему изобретению в концентрации по меньшей мере 0,1 мг/мл, например по меньшей мере 0,25 мг/мл, по меньшей мере 0,5 мг /мл, по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 2,5 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 8 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 15 мг/мл, по меньшей мере 25 мг/ мл, по меньшей мере 50 мг/мл, по меньшей мере 75 мг/мл или по меньшей мере 100 мг/мл.

Биспецифическое антитело или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить любым подходящим способом, известным в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, пероральный, трансбуккальный, подъязычный, глазной, местный, парентеральный, ректальный, интратекальный, интрацистернальный, паховый, внутрипузырный, местный (например, в виде порошка, мази или капель) или назальный путь. Однако для многих терапевтических применений предпочтительным путем/способом введения является парентеральный (такой как внутривенная инъекция, подкожная инъекция, внутрибрюшинная инъекция и внутримышечная инъекция). Специалистам в данной области будет понятно, что путь и/или способ введения будут варьироваться в зависимости от намеченной цели. В предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению вводят путем внутривенной инфузии или инъекции.

Биспецифическое антитело или фармацевтическую композицию, предложенную в настоящем описании, можно использовать отдельно или в комбинации, или использовать в комбинации с дополнительными фармацевтически активными агентами (например, противоопухолевым химиотерапевтическим средством). Такой дополнительный фармацевтически активный агент можно вводить до, одновременно или после введения биспецифического антитела по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении схема введения может быть скорректирована для достижения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа). Например, схема введения может быть однократной или многократной в течение определенного периода времени, или доза может быть уменьшена или увеличена пропорционально в зависимости от необходимости лечения.

Биспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой биспецифическое антитело в соответствии с любым вариантом осуществления настоящего изобретения, т. е. биспецифическое антитело против-PD-1/против-VEGFA.

Другой аспект настоящего изобретения относится к продукту в виде набора,

включающему терапевтическую комбинацию в соответствии с любым вариантом осуществления настоящего изобретения и листок-вкладыш.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению терапевтической комбинации согласно любому варианту осуществления настоящего изобретения или продукта в виде набора по настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения и/или предотвращения злокачественной опухоли;

предпочтительно злокачественная опухоль выбрана из рака яичника, рака эндометрия, рака молочной железы, рака шейки матки, рака маточной трубы, перитонеального рака, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, рака печени, рака кожи, глиомы, меланомы, лимфомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака головного мозга, рака пищевода, такого как плоскоклеточный рак пищевода, рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или рака с дефицитом системы репарации неспаренных оснований (dMMR), уротелиальной карциномы, мезотелиомы, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода, лейкоза, миеломы, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, рака костей, рака желчных путей и рака яичка;

предпочтительно опухоль представляет собой опухоль с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно опухоль представляет собой опухоль без дефицита функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией;

предпочтительно рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого;

предпочтительно немелкоклеточный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого с EGFR- и/или ALK-чувствительной мутацией;

предпочтительно немелкоклеточный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого без EGFR- и/или ALK-чувствительной мутации;

предпочтительно рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному;

предпочтительно рак почки представляет собой почечно-клеточную карциному;

предпочтительно рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы;

предпочтительно уротелиальная карцинома представляет собой рак мочевого пузыря;

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой первичный перитонеальный рак;

предпочтительно, рак яичника представляет собой рак яичника с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак маточной трубы представляет собой рак маточной трубы с

дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой перитонеальный рак с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2).

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению терапевтической комбинации согласно любому варианту осуществления настоящего изобретения или продукта в виде набора по настоящему изобретению при приготовлении следующего лекарственного средства:

(1)

лекарственное средство или агент для определения уровня VEGFA в образце,  
лекарственное средство или агент для блокирования связывания VEGFA с VEGFR2,  
лекарственное средство или агент для отрицательной регуляции активности или уровня VEGFA,

лекарственное средство или агент для ослабления стимуляции VEGFA пролиферации эндотелиальных клеток сосудов,

лекарственное средство или агент для ингибирования пролиферации эндотелиальных клеток сосудов, или

лекарственное средство или агент для блокирования опухолевого ангиогенеза;

и/или

(2)

лекарственное средство или агент для блокирования связывания PD-1 с PD-L1,  
лекарственное средство или агент для снижения активности или уровня PD-1,  
лекарственное средство или агент для ослабления иммуносупрессии PD-1 в организме,

лекарственное средство или агент для стимуляции секреции IFN- $\gamma$  в Т-лимфоцитах,  
или

лекарственное средство или агент для стимуляции секреции IL-2 в Т-лимфоцитах.

В эксперименте *in vitro* по настоящему изобретению антитело против VEGFA и биспецифическое антитело против-VEGFA/против-PD-1 могут ингибировать пролиферацию клеток HUVEC, и как антитело против PD-1, так и биспецифическое антитело против-VEGFA/против-PD-1 может способствовать секреции IFN- $\gamma$  и/или IL-2 и активировать иммунный ответ.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу лечения и/или предотвращения злокачественной опухоли, включающему: введение пациенту эффективного количества терапевтической комбинации в соответствии с любым вариантом осуществления настоящего изобретения или продукта в виде набора по настоящему

изобретению;

предпочтительно злокачественная опухоль выбрана из рака яичника, рака эндометрия, рака молочной железы, рака шейки матки, рака маточной трубы, перитонеального рака, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, рака печени, рака кожи, глиомы, меланомы, лимфомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака головного мозга, рака пищевода, такого как плоскоклеточный рак пищевода, рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или рака с дефицитом системы репарации неспаренных оснований (dMMR), уротелиальной карциномы, мезотелиомы, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода, лейкоза, миеломы, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, рака костей, рака желчных путей и рака яичка;

предпочтительно опухоль представляет собой опухоль с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно опухоль представляет собой опухоль без дефицита функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией;

предпочтительно рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого;

предпочтительно немелкоклеточный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого с EGFR- и/или ALK-чувствительной мутацией;

предпочтительно немелкоклеточный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого без EGFR- и/или ALK-чувствительной мутации;

предпочтительно рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному;

предпочтительно рак почки представляет собой почечно-клеточную карциному;

предпочтительно рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы;

предпочтительно уротелиальная карцинома представляет собой рак мочевого пузыря;

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой первичный перитонеальный рак;

предпочтительно, рак яичника представляет собой рак яичника с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак маточной трубы представляет собой рак маточной трубы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой перитонеальный рак с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для способа лечения и/или предотвращения злокачественной опухоли введение осуществляют до или после хирургического вмешательства и/или до или после лучевой терапии.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для способа лечения и/или предотвращения злокачественной опухоли биспецифическое антитело вводят в однократной дозе 0,1-100 мг на кг массы тела, предпочтительно 5-50 мг или 5-15 мг на кг массы тела,

которую вводят один раз в 3 дня, в 4 дня, в 5 дней, в 6 дней, в 10 дней, в 1 неделю, в 2 недели или в 3 недели,

и/или

которую вводят путем внутривенной капельной инфузии или внутривенной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для способа лечения и/или предотвращения злокачественной опухоли ингибитор PARP вводят в однократной дозе 0,1-100 мг на кг массы тела, предпочтительно 5-50 мг или 5-15 мг на кг массы тела,

которую вводят один раз в 3 дня, в 4 дня, в 5 дней, в 6 дней, в 10 дней, в 1 неделю, в 2 недели или в 3 недели,

и/или

которую вводят путем внутривенной капельной инфузии или внутривенной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для способа лечения и/или предотвращения злокачественной опухоли биспецифическое антитело и ингибитор PARP вводят одновременно или не одновременно.

Типичный неограничивающий диапазон терапевтически или профилактически эффективного количества биспецифического антитела и/или ингибитора PARP по настоящему изобретению составляет 0,02-100 мг/кг, например, 0,1-50 мг/кг, 0,1-25 мг/кг или 1-10 мг/кг. Следует отметить, что доза может варьироваться в зависимости от типа и тяжести симптома, подлежащего лечению. Кроме того, специалистам в данной области техники будет понятно, что для любого конкретного пациента конкретный режим дозирования может быть скорректирован с течением времени в соответствии с потребностями пациента и профессиональным мнением врача; диапазоны доз, представленные в настоящем описании, приведены только для иллюстративных целей и не ограничивают применение или объем фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении пациентом может быть млекопитающее, такое как человек.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу *in vivo* или *in vitro*, выбранному из:

(1)

способа определения уровня VEGFA в образце,  
 способа блокирования связывания VEGFA с VEGFR2,  
 способа снижения активности или уровня VEGFA,  
 способа ослабления стимуляции VEGFA пролиферации эндотелиальных клеток сосудов,

способа ингибирования пролиферации эндотелиальных клеток сосудов, или

способа блокирования опухолевого ангиогенеза;

и/или

(2)

способа блокирования связывания PD-1 с PD-L1,

способа снижения активности или уровня PD-1,

способа ослабления иммуносупрессии PD-1 в организме,

способа стимуляции секреции IFN- $\gamma$  в Т-лимфоцитах, или

способа стимуляции секреции IL-2 в Т-лимфоцитах.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтическая комбинация или продукт набора предназначены для лечения и/или предотвращения злокачественной опухоли;

предпочтительно злокачественная опухоль выбрана из рака яичника, рака эндометрия, рака молочной железы, рака шейки матки, рака маточной трубы, перитонеального рака, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, рака печени, рака кожи, глиомы, меланомы, лимфомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака головного мозга, рака пищевода, такого как плоскоклеточный рак пищевода, рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или рака с дефицитом системы репарации неспаренных оснований (dMMR), уротелиальной карциномы, мезотелиомы, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода, лейкоза, миеломы, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, рака костей, рака желчных путей и рака яичка;

предпочтительно опухоль представляет собой опухоль с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно опухоль представляет собой опухоль без дефицита функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией;

предпочтительно рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого;

предпочтительно немелкоклеточный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого с EGFR- и/или ALK-чувствительной мутацией;

предпочтительно немелкоклеточный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого без EGFR- и/или ALK-чувствительной мутации;

предпочтительно рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному;

предпочтительно рак почки представляет собой почечно-клеточную карциному;

предпочтительно рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы;

предпочтительно уротелиальная карцинома представляет собой рак мочевого пузыря;

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой первичный перитонеальный рак;

предпочтительно, рак яичника представляет собой рак яичника с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак маточной трубы представляет собой рак маточной трубы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой перитонеальный рак с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2).

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтическая комбинация или набор продуктов предназначены для применения в:

(1)

определении уровня VEGFA в образце,

блокировании связывания VEGFA с VEGFR2,

снижении активности или уровня VEGFA,

ослаблении стимуляции VEGFA пролиферации эндотелиальных клеток сосудов,

ингибировании пролиферации эндотелиальных клеток сосудов, или

блокировании ангиогенеза опухоли;

и/или

(2)

блокировании связывания PD-1 с PD-L1,

отрицательной регуляции активности или уровня PD-1,

ослаблении иммуносупрессии PD-1 в организме,

стимулировании секреции IFN- $\gamma$  в Т-лимфоцитах, или

стимулировании секреции ИЛ-2 в Т-лимфоцитах.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению биспецифического антитела в терапевтической комбинации согласно любому варианту

осуществления настоящего изобретения для получения лекарственного средства для лечения и/или предотвращения злокачественной опухоли, где злокачественная опухоль выбрана из рака яичника, рака маточной трубы, перитонеального рака и рака молочной железы;

предпочтительно, рак яичника представляет собой рак яичника с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак маточной трубы представляет собой рак маточной трубы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой перитонеальный рак с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2).

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу лечения и/или предотвращения злокачественной опухоли, включающему: введение пациенту эффективного количества биспецифического антитела в терапевтической комбинации в соответствии с любым вариантом осуществления настоящего изобретения, где злокачественная опухоль выбрана из рака яичника, рака маточной трубы, перитонеального рака и рака молочной железы;

предпочтительно, рак яичника представляет собой рак яичника с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак маточной трубы представляет собой рак маточной трубы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой перитонеальный рак с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2).

Еще один аспект настоящего изобретения относится к биспецифическому антителу в терапевтической комбинации согласно любому варианту осуществления настоящего изобретения для применения в лечении и/или предотвращении злокачественной опухоли, где злокачественная опухоль выбрана из рака яичника, рака маточной трубы, перитонеального рака и рака молочной железы;

предпочтительно, рак яичника представляет собой рак яичника с дефицитом

функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак маточной трубы представляет собой рак маточной трубы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой перитонеальный рак с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2).

Лекарственные средства на основе антител, особенно моноклональные антитела, достигли хорошей эффективности при лечении различных заболеваний. Обычные способы получения этих терапевтических антител включают иммунизацию животных антигеном и получение антител, нацеленных на антиген, у иммунизированных животных или модификацию этих антител с более низкой аффинностью к антигену путем созревания аффинности.

Вариабельные области легкой цепи и тяжелой цепи определяют связывание с антигенами; вариабельная область каждой цепи включает три гипервариабельные области, называемые областями, определяющими комплементарность, (CDR), (CDR тяжелой цепи (H-цепи) представляют собой HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а CDR легкой цепи (L-цепи) представляют собой LCDR1, LCDR2, и LCDR3, названные Kabat et al., см. Bethesda M.d., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication, (1-3) 1991: 91-3242).

Предпочтительно, CDR также могут быть определены системой нумерации IMGT; см. Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. «IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF.» Nucleic acids research, 38.suppl\_1 (2009): D301-D307.

Аминокислотные последовательности областей CDR последовательностей моноклонального антитела в пунктах (1)-(13) ниже были проанализированы техническими средствами, хорошо известными специалистам в данной области, например, с помощью базы данных VBASE2 и особенно в соответствии с определением IMGT, и результаты приведены ниже:

(1) Бевацизумаб

Вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, а вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

3 CDR вариабельной области тяжелой цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

HCDR1: GYTFTNYG (SEQ ID NO: 28)

HCDR2: INTYTGEP (SEQ ID NO: 29)

HCDR3: AKYPHYYGSSHWYFDV (SEQ ID NO: 30)

3 CDR вариабельной области легкой цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

LCDR1: QDISNY (SEQ ID NO: 31)

LCDR2: FTS (SEQ ID NO: 32)

LCDR3: QQYSTVPWT (SEQ ID NO: 33)

(2) 14C12, 14C12H1L1 или 14C12H1L1(M)

3 CDR вариабельной области тяжелой цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 34)

HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 35)

HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 36)

3 CDR вариабельной области легкой цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 37)

LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 38)

LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 39)

(3) VP101(hG1WT) или VP101(hG1DM)

9 CDR тяжелой цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

HCDR1: GYTFTNYG (SEQ ID NO: 28)

HCDR2: INTYTGEP (SEQ ID NO: 29)

HCDR3: AKYPHYYGSSHWYFDV (SEQ ID NO: 30)

HCDR4: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 34)

HCDR5: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 35)

HCDR6: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 36)

HCDR7: QDINTY (SEQ ID NO: 37)

HCDR8: RAN (SEQ ID NO: 38)

HCDR9: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 39)

3 CDR вариабельной области легкой цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

LCDR1: QDISNY (SEQ ID NO: 31)

LCDR2: FTS (SEQ ID NO: 32)

LCDR3: QQYSTVPWT (SEQ ID NO: 33).

Для антитела VP101(hG1DM) по настоящему изобретению в невариабельную область VP101(hG1WT) вводят аминокислотные мутации. В соответствии с системой нумерации EU аминокислотные мутации вводят в положения 234 и 235:

VP101 (hG1DM) был получен путем введения точечной мутации лейцин-аланин в положении 234 (L234A) и точечной мутации лейцин-аланин в положении 235 (L235A) в шарнирной области тяжелой цепи.

В настоящем изобретении, если не указано иное, используемые в настоящем описании научные и технические термины имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области. Кроме того, используемые в настоящем описании лабораторные операции клеточных культур, молекулярной генетики, химии нуклеиновых кислот и иммунологии являются рутинными процедурами, широко используемыми в соответствующих областях. Между тем, чтобы лучше понять настоящее изобретение, ниже приведены определения и пояснения соответствующих терминов.

Используемый в настоящем описании термин, относящийся к аминокислотной последовательности белка VEGFA, включает, но не ограничивается этим, полную длину белка VEGFA (GenBank ID: NP\_001165097.1), а также слитый белок VEGFA, такой как в виде фрагмента, слитого с белковым фрагментом Fc мышинового или человеческого IgG (mFc или hFc). Однако специалистам в данной области техники будет понятно, что в аминокислотной последовательности белка VEGFA мутации или вариации (включая, но не ограничиваясь ими, замены, делеции и/или добавления) могут встречаться естественным образом или могут быть введены искусственно, не влияя на биологические функции. Следовательно, в настоящем изобретении термин «белок VEGFA» должен включать все такие последовательности, включая их природные или искусственные варианты. Кроме того, при описании фрагмента последовательности белка VEGFA также включают соответствующие фрагменты последовательности в их природных или искусственных вариантах. В одном варианте осуществления настоящего изобретения белок VEGFA имеет аминокислотную последовательность, указанную в подчеркнутой части SEQ ID NO: 33 (всего 302 аминокислоты, исключая последние 6 His).

Используемый в настоящем описании термин, относящийся к аминокислотной последовательности белка VEGFR2 (также известного как KDR), включает, но не ограничиваясь этим, полную длину белка VEGFR2 (GenBank ID: NP\_002244) или внеклеточный фрагмент VEGFR2- ECD VEGFR2 или фрагмент, содержащий VEGFR2- ECD, и он также включает слитый белок VEGFR2-ECD, такой как фрагмент, слитый с белковым фрагментом Fc мышинового или человеческого IgG (mFc или hFc). Однако специалистам в данной области техники будет понятно, что в аминокислотной последовательности белка VEGFR2 мутации или вариации (включая, но не ограничиваясь ими, замены, делеции и/или добавления) могут встречаться естественным образом или могут быть введены искусственно, не влияя на его биологические функции. Следовательно, в настоящем изобретении термин «белок VEGFR2» должен включать все такие последовательности, включая их природные или искусственные варианты. Кроме того, при описании фрагмента последовательности белка VEGFR2 включаются также соответствующие фрагменты последовательности в их природных или искусственных вариантах. В одном варианте осуществления настоящего изобретения внеклеточный фрагмент VEGFR2-ECD VEGFR2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34 (766 аминокислот).

Используемый в настоящем описании термин, если не указано иное, VEGFR

представляет собой VEGFR1 и/или VEGFR2; его конкретная белковая последовательность представляет собой последовательность, известную в предшествующем уровне техники, и можно сделать ссылку на последовательность, описанную в существующей литературе или в базе данных GenBank. Например, VEGFR1 (VEGFR1, NCBI Gene ID: 2321); VEGFR2 (VEGFR2, NCBI Gene ID: 3791).

Используемый в настоящем описании термин «аминокислотная последовательность белка PD-1» (белок 1 запрограммированной клеточной смерти) включает полную длину белка PD-1 (NCBI GenBank: NP\_005009.2) или внеклеточный фрагмент PD-1ECD PD-1 или фрагмент, содержащий PD-1ECD, и он также включает слитый белок PD-1ECD, такой как фрагмент, слитый с белковым фрагментом Fc мышинового или человеческого IgG (mFc или hFc). Однако специалистам в данной области будет понятно, что в аминокислотной последовательности белка PD-1 мутации или вариации (включая, но не ограничиваясь ими, замены, делеции и/или добавления) могут встречаться естественным образом или могут быть введены искусственно, не влияя на его биологические функции. Следовательно, в настоящем изобретении термин «белок PD-1» должен включать все такие последовательности, включая их природные или искусственные варианты. Кроме того, при описании фрагмента последовательности белка PD-1 включают также соответствующие фрагменты последовательности в их природных или искусственных вариантах.

Используемый в настоящем описании термин  $EC_{50}$  относится к концентрации, обеспечивающей 50% максимального эффекта, то есть к концентрации, которая может вызвать 50% максимального эффекта.

Используемый в настоящем описании термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая обычно состоит из двух пар полипептидных цепей (каждая пара состоит из одной «легкой» (L) цепи и одной «тяжелой» (H) цепи). В общем смысле тяжелая цепь может быть интерпретирована как полипептидная цепь с большей молекулярной массой в антителе, а легкая цепь относится к полипептидной цепи с меньшей молекулярной массой в антителе. Легкие цепи можно разделить на легкие цепи  $\kappa$  и  $\lambda$ . Тяжелые цепи обычно классифицируют на  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  и  $\epsilon$ , а антитела определяют как изотипы IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. В легких цепях и тяжелых цепях переменная область и константная область связаны областью «J», состоящей примерно из 12 или более аминокислот, а тяжелая цепь дополнительно содержит область «D», состоящую примерно из 3 или более аминокислот. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Константная область тяжелой цепи состоит из 3 доменов (CH1, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулинов с тканями или факторами хозяина, включая связывание различных клеток иммунной системы (например, эффекторных клеток) с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на гиперпеременные области

(называемые определяющими комплементарность областями или CDR) и консервативные области, называемые каркасными областями (FR), которые распределяются между CDR. Каждая VH и VL состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от amino-конца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области (VH и VL) каждой пары тяжелой цепи/легкой цепи образуют сайт связывания антитела. Соотнесение аминокислот областям или доменам может быть определено Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 и 1991)), или Chothia & Lesk J. Mol. Biol., 196 (1987): 901-917; Chothia et al., Nature, 342 (1989): 878-883, или системой нумерации IMGT (см. Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. «IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF.» Nucleic acids research, 38.suppl\_1 (2009): D301-D307). В частности, тяжелая цепь может дополнительно содержать более 3 CDR, как например, 6, 9 или 12. Например, в биспецифическом антителе по настоящему изобретению тяжелая цепь может представлять собой scFv, где C-конец тяжелой цепи антитела IgG связан с другим антителом, и в этом случае тяжелая цепь содержит 9 CDR. Термин «антитело» не ограничивается каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, антитело включает, в частности, рекомбинантное антитело, моноклональное антитело и поликлональное антитело. Антитело может представлять собой антитела различных изоформ, таких как IgG (например, подтипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

Используемый в настоящем описании термин «антигенсвязывающий фрагмент», также известный как «антигенсвязывающая часть», относится к полипептиду, содержащему фрагмент полноразмерного антитела, который сохраняет способность специфически связываться с тем же антигеном, с которым полноразмерное антитело связывается и/или конкурирует с полноразмерным антителом за специфическое связывание с антигеном. См. в целом, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, N.Y. (1989)). Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен методом рекомбинантной ДНК или ферментативным или химическим расщеплением интактного антитела. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент включает Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, dAb и фрагмент определяющей комплементарности области (CDR), фрагмент одноцепочечного антитела (например, scFv), химерное антитело, диантитело и полипептид, который содержит по меньшей мере часть антитела, достаточную для придания полипептиду специфической антигенсвязывающей способности.

Используемый в настоящем описании термин «фрагмент Fd» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VH и CH1; термин «фрагмент Fv» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VL и VH одного плеча антитела; термин «фрагмент dAb» относится к фрагменту антитела, состоящему из домена VH (Ward et al., Nature, 341 (1989):544546); термин «Fab-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VL, VH, CL и CH1; термин «фрагмент F(ab')<sub>2</sub>» относится к фрагменту антитела, содержащему два Fab-фрагмента, связанных дисульфидными мостиками в шарнирной

области.

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой одноцепочечное антитело (например, scFv), в котором домены VL и VH объединены в пары для образования моновалентной молекулы через линкер, который обеспечивает продукцию одной полипептидной цепи (см. например, Bird et al., *Science* 242 (1988):423426 и Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 (1988):58795883). Такие молекулы scFv могут иметь общую структуру: NH<sub>2</sub>-VL-линкер-VH-COOH или NH<sub>2</sub>-VH-линкер-VL-COOH. Подходящий линкер предшествующего уровня техники состоит из повторов аминокислотной последовательности GGGGS или их варианта. Например, можно использовать линкер, имеющий аминокислотную последовательность (GGGGS)<sub>4</sub>, а также его варианты (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (1993):6444-6448). Другие линкеры, применимые в настоящем изобретении, описаны Alfthan et al., *Protein Eng.* 8 (1995): 725-731, Choi et al., *Eur. J. Immunol.* 31 (2001): 94-106, Hu et al., *Cancer Res.* 56 (1996): 3055-3061, Kipriyanov et al., *J. Mol. Biol.*, 293 (1999): 41-56, и Roovers et al., *Cancer Immunol.* (2001).

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой диантитело, то есть двухвалентное антитело, в котором домены VH и VL экспрессируются на одной полипептидной цепи. Однако используемый линкер слишком короткий, чтобы можно было соединить два домена в одной цепи. Таким образом, домены вынуждены соединяться с комплементарными доменами на другой цепи, и создаются два сайта связывания антигена (см., например, Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993):64446448, и Poljak R.J. et al., *Structure* 2 (1994):11211123).

Антигенсвязывающие фрагменты (например, упомянутые выше фрагменты антител) антител могут быть получены из данных антител с использованием обычных способов, известных специалистам в данной области (например, рекомбинация ДНК или ферментативное или химическое расщепление), и антигенсвязывающий фрагменты антител проверяют на специфичность так же, как и интактные антитела.

Используемый в настоящем документе термин «антитело», если иное четко не определено в контексте, включает не только интактные антитела, но также и антигенсвязывающие фрагменты антител.

Используемые в настоящем описании термины «mAb» и «моноклональное антитело» относятся к антителу или фрагменту антитела, полученному из группы высоко гомологичных антител, то есть из группы идентичных молекул антител, за исключением естественных мутаций, которые могут происходить спонтанно. Моноклональное антитело обладает высокой специфичностью в отношении одного эпитопа на антигене. Поликлональное антитело по сравнению с моноклональным антителом обычно содержит по меньшей мере 2 или более различных антител, которые, как правило, распознают разные эпитопы на антигене. Моноклональные антитела, как правило, могут быть получены методом гибридом, впервые описанным Kohler et al. (*Nature*, 256:495, 1975), а также могут быть получены методом рекомбинантной ДНК (например, см. Патент США No. 4816567).

Используемый в настоящем описании термин «химерное антитело» относится к антителу, часть легкой и/или тяжелой цепи которого получена из антитела (которое может происходить из определенного вида или принадлежать к определенному изотипу или подтипу антитела), а другая часть легкой и/или тяжелой цепи происходит от другого антитела (которое может происходить от того же или другого вида или принадлежать к тому же или другому изотипу или подтипу антитела). Но в любом случае он сохраняет связывающую активность в отношении антигена-мишени (Патент США 4816567 Cabilly et al.; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (1984):6851-6855).

Используемый в настоящем описании термин «гуманизованное антитело» относится к антителу или фрагменту антитела, полученному при замене всех или части областей CDR человеческого иммуноглобулина (рецепторного антитела) на области CDR антитела, не являющегося человеческим, (донорное антитело), где донорное антитело может представлять собой антитело, не являющееся человеческим, (например, мышинное, крысиное или кроличье), обладающее ожидаемой специфичностью, аффинностью или реактивностью. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки в каркасных областях (FR) рецепторного антитела также могут быть заменены аминокислотными остатками соответствующих антител, не являющихся человеческими, или аминокислотными остатками других антител для дальнейшего улучшения или оптимизации характеристик антитела. Более подробно о гуманизованных антителах см., например, Jones et al., Nature, 321 (1986): 522-525; Reichmann et al., Nature, (1988) 332:323-329; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2 (1992): 593-596, и Clark, Immunol. Today 21 (2000): 397-402.

Используемый в настоящем описании 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 состоит из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты, углеводы или боковые цепи сахаров, и обычно имеет специфические трехмерные структурные характеристики и специфические характеристики заряда. Например, эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 последовательных или непоследовательных аминокислот в уникальной пространственной конформации, которая может быть «линейной» или «конформационной». См., например, «Epitope Mapping Protocols» в «Methods in Molecular Biology», Vol. 66, GE Morris, Ed. (1996). В линейном эпитопе все сайты взаимодействия между белком и взаимодействующей молекулой (например, антителом) расположены линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе сайты взаимодействия расположены у аминокислотных остатков белка, которые отделены друг от друга.

Используемый в настоящем описании термин «выделенный» относится к получению искусственным путем из естественного состояния. Если определенное «выделенное» вещество или компонент присутствует в природе, это может быть случай, когда изменение происходит в его естественной среде, или что оно выделено из природной

среды, или и то, и другое. Например, определенный невыделенный полинуклеотид или полипептид встречается в природе у определенного живого животного, и тот же самый полинуклеотид или полипептид высокой чистоты, выделенный из такого природного состояния, называется выделенным полинуклеотидом или полипептидом. Термин «выделенный» не исключает наличия искусственных или синтетических веществ или других примесей, не влияющих на активность вещества.

Используемый в настоящем описании термин «вектор» относится к носителю нуклеиновой кислоты, в который может быть вставлен полинуклеотид. Когда вектор допускает экспрессию белка, кодируемого вставленным полинуклеотидом, такой вектор называют экспрессирующим вектором. Вектор может быть введен в клетку-хозяин путем трансформации, трансдукции или трансфекции, так что элементы генетического вещества, переносимые вектором, могут быть экспрессированы в клетке-хозяине. Векторы хорошо известны специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь ими: плазмиды; фагмиды; космиды; искусственные хромосомы, такие как искусственная дрожжевая хромосома (YAC), искусственная хромосома бактерий (BAC) или искусственная хромосома, полученная из P1 (PAC); фаги, такие как фаги лямбда или фаги M13; и вирусы животных. Вирусы животных, которые можно использовать в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ими, ретровирусы (включая лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса (такие как вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, папилломавирусы и паповавирусы (такие как SV40). Вектор может содержать множество элементов, которые контролируют экспрессию, включая, но не ограничиваясь ими, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, элементы селекции и репортерные гены. Кроме того, вектор может дополнительно содержать сайт инициации репликации.

Используемый в настоящем описании термин «клетка-хозяин» относится к клеткам, в которые могут быть введены векторы, включая, но не ограничиваясь ими, прокариотические клетки, такие как *Escherichia coli* или *Bacillus subtilis*, грибковые клетки, такие как клетки дрожжей или *Aspergillus*, клетки насекомых, такие как клетки дрозофилы S2 или Sf9, или клетки животных, такие как фибробласты, клетки CHO, клетки COS, клетки NSO, клетки HeLa, клетки ВНК, клетки НЕК 293 или клетки человека.

Используемый в настоящем описании термин «специфически связываться» относится к реакции неслучайного 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 специфически связывается с антигеном), означает, что антитело связывается с антигеном с аффинностью (KD) менее примерно  $10^{-5}$  M, например, менее примерно  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M или  $10^{-10}$  M или менее. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения термин «мишень» относится к специфическому связыванию.

Используемый в настоящем описании термин «KD» относится к константе равновесия диссоциации для специфического взаимодействия антитело-антиген, которая

используется для описания аффинности связывания между антителом и антигеном. Меньшая константа равновесия диссоциации указывает на более сильное связывание антитела с антигеном и более высокую аффинность между антителом и антигеном. Как правило, антитело связывается с антигеном с константой равновесия диссоциации (KD) менее примерно  $10^{-5}$  M, например, менее примерно  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M или  $10^{-10}$  M или менее, например, при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в системе BIACORE или в системе Fortebio.

Используемые в настоящем описании термины «моноклональное антитело» и «mAb» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины «поликлональное антитело» и «pAb» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины «полипептид» и «белок» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо. Кроме того, в настоящем описании аминокислоты обычно представлены однобуквенными и трехбуквенными сокращениями, известными в данной области техники. Например, аланин может быть представлен A или Ala.

Используемый в настоящем описании термин «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» относится к носителю и/или наполнителю, который фармакологически и/или физиологически совместим с пациентом и активным ингредиентом, который хорошо известен в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), и включает, но не ограничивается 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 неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Tween-80; усилители ионной силы включают, но не ограничиваются ими, хлорид натрия.

Используемый в настоящем описании термин «адъювант» относится к неспецифическому иммунному энхансеру, который может усиливать иммунный ответ организма на антигены или изменять тип иммунного ответа при доставке в организм вместе с антигенами или заранее. Существуют различные адъюванты, включая, помимо прочего, алюминиевый адъювант (например, гидроксид алюминия), адъювант Фрейнда (например, полный адъювант Фрейнда и неполный адъювант Фрейнда), *Corynebacterium parvum*, липополисахарид, цитокин и т. д. Адъювант Фрейнда является наиболее часто используемым адъювантом в экспериментах на животных. Адъювант гидроксида алюминия чаще используется в клинических испытаниях.

Используемый в настоящем описании термин «эффективное количество» относится к количеству, достаточному для получения или, по меньшей мере, частичного получения желаемого эффекта. Например, профилактически эффективное количество (например, для заболевания, связанного со связыванием PD-1 с PD-L1 или избыточной экспрессией VEGF, такого как опухоль) представляет собой количество, достаточное для предотвращения, остановки или задержки начала заболевания (например, заболевание, связанное со

связыванием PD-L1 с PD-L1 или сверхэкспрессией VEGF, такое как опухоль); терапевтически эффективное количество представляет собой количество, достаточное для излечения или, по меньшей мере, частичного прекращения заболевания и его осложнений у пациента, страдающего этим заболеванием. Несомненно, специалисты в данной области техники могут определить такое эффективное количество. Например, количество, эффективное для терапевтических целей, будет зависеть от тяжести заболевания, подлежащего лечению, общего состояния собственной иммунной системы пациента, общего состояния пациента, такого как возраст, масса тела и пол, пути введения, и другие виды лечения, назначаемые одновременно, и т. д.

#### Благоприятные эффекты

Настоящее изобретение позволяет достичь любого одного или более из следующих технических эффектов (1)-(6):

(1) В настоящем изобретении модификации Fc-фрагмента антитела полностью устраняют связывающую активность VP101(hG1WT) с FC-рецепторами FcγRI и FcγRIIIa\_F158, тем самым полностью устраняя активность ADCC.

(2) В настоящем изобретении модификации Fc-фрагмента антитела полностью устраняют активность связывания VP101(hG1WT) с комплементом C1q, тем самым устраняя активность CDC.

(3) Биспецифическое антитело по настоящему изобретению может специфически связываться с VEGFA, эффективно блокировать связывание VEGFA с VEGFR2 и специфически ослаблять стимулирующее действие VEGFA на подавление иммунитета и ангиогенез.

(4) Биспецифическое антитело по настоящему изобретению может специфически связываться с PD-1, эффективно блокировать связывание PD-1 с PD-L1 и специфически ослаблять иммуносупрессию PD-1 в организме и активировать иммунные ответы.

(5) Совместное применение PARPi и биспецифического антитела по настоящему изобретению имеет значительно более высокую эффективность при опухолях, особенно раке молочной железы или яичников, по сравнению с PARPi или биспецифическим антителом по отдельности.

(6) PARPi и биспецифическое антитело по настоящему изобретению обладают синергетическим действием при лечении или предотвращении опухолей.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

ФИГ. 1: Анализ константы аффинности VP101(hG1DM) к FcγRI. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,12 нМ, соответственно.

ФИГ. 2: Анализ константы аффинности бевацизумаба к FcγRI. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,12 нМ, соответственно.

ФИГ. 3: Анализ константы аффинности ниволумаба к FcγRI. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,12 нМ,

соответственно.

ФИГ. 4: Анализ константы аффинности VP101(hG1WT) к FcγRI. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,12 нМ, соответственно.

ФИГ. 5: Анализ константы аффинности VP101(hG4WT) к FcγRI. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,12 нМ, соответственно.

ФИГ. 6: Анализ константы аффинности VP101(hG1DM) к FcγRIIa\_H131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 7: Анализ константы аффинности бевацизумаба к FcγRIIa\_H131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 8: Анализ константы аффинности ниволумаба к FcγRIIa\_H131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 9: Анализ константы аффинности VP101(hG1WT) к FcγRIIa\_H131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 10: Анализ константы аффинности VP101(hG4WT) к FcγRIIa\_H131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 11: Анализ константы аффинности VP101(hG1DM) к FcγRIIa\_R131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 12: Анализ константы аффинности бевацизумаба к FcγRIIa\_R131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 13: Анализ константы аффинности ниволумаба к FcγRIIa\_R131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 14: Анализ константы аффинности VP101(hG1WT) к FcγRIIa\_R131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 15: Анализ константы аффинности VP101(hG4WT) к FcγRIIa\_R131. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ и 12,5 нМ, соответственно.

ФИГ. 16: Анализ константы аффинности VP101(hG1DM) к FcγRIIa\_V158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 17: Анализ константы аффинности бевацизумаба к FcγRIIIa\_V158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 18: Анализ константы аффинности ниволумаба к FcγRIIIa\_V158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 19: Анализ константы аффинности VP101(hG1WT) к FcγRIIIa\_V158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 20: Анализ константы аффинности VP101(hG4WT) к FcγRIIIa\_V158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 21: Анализ константы аффинности VP101(hG1DM) к FcγRIIIa\_V158. Концентрации антигена для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 22: Анализ константы аффинности бевацизумаба к FcγRIIIa\_F158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 23: Анализ константы аффинности ниволумаба к FcγRIIIa\_V158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 24: Анализ константы аффинности VP101(hG1WT) к FcγRIIIa\_F158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 25: Анализ константы аффинности VP101(hG4WT) к FcγRIIIa\_F158. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 500 нМ, 250 нМ, 125 нМ, 62,5 нМ и 31,25 нМ, соответственно.

ФИГ. 26: Анализ константы аффинности VP101(hG1DM) к C1q. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ и 0,625 нМ, соответственно.

ФИГ. 27: Анализ константы аффинности бевацизумаба к C1q. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ и 0,625 нМ, соответственно.

ФИГ. 28: Анализ константы аффинности ниволумаба к C1q. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ и 0,625 нМ, соответственно.

ФИГ. 29: Анализ константы аффинности VP101(hG1WT) к C1q. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ и 0,625 нМ, соответственно.

ФИГ. 30: Анализ константы аффинности VP101(hG4WT) к C1q. Концентрации

антигена для пар кривых сверху вниз составляют 10 нМ, 5 нМ, 2,5 нМ, 1,25 нМ и 0,625 нМ, соответственно.

ФИГ. 31: анализ активности ADCC VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в системе клеток-мишеней CHO-K1-PD1, экспрессирующих антиген PD-1.

ФИГ. 32: анализ активности CDC VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в системе клеток-мишеней CHO-K1-PD1, экспрессирующих антиген PD-1.

ФИГ. 33: Влияние антитела VP101(hG1DM) на секрецию цитокина IFN- $\gamma$ , индуцированную реакцией смешанных лимфоцитов PBMC и клеток Raji-PDL1, с помощью ИФА.

ФИГ. 34: Влияние антитела VP101(hG1DM) на секрецию цитокина IL-2, индуцированную реакцией смешанных лимфоцитов PBMC и клеток Raji-PDL1, с помощью ИФА.

ФИГ. 35: Анализ активности ADCP VP101(hG1DM) в системе клеток-мишеней CHO-K1-PD1, экспрессирующих антиген PD-1.

ФИГ. 36: Ингибирование пролиферативной активности опухолевых клеток рака молочной железы в модели ксенотрансплантата опухоли молочной железы с помощью VP101(hG1DM).

ФИГ. 37: Ингибирование миграции клеток рака яичника при комбинированном применении PARPi и VP101(hG1DM).

ФИГ. 38: Влияние комбинации PARPi и VP101(hG1DM) на объем опухоли в мышинной модели подкожного ксенотрансплантата рака молочной железы.

ФИГ. 39: Влияние комбинации PARPi и VP101(hG1DM) на массу тела в мышинной модели подкожного ксенотрансплантата рака молочной железы.

ФИГ. 40: Влияние комбинации PARPi и VP101(hG1DM) на объем опухоли в мышинной модели подкожного ксенотрансплантата рака яичника.

ФИГ. 41: Влияние комбинации PARPi и VP101(hG1DM) на массу тела в мышинной модели подкожного ксенотрансплантата рака яичника.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Варианты осуществления настоящего изобретения будут подробно описаны ниже со ссылкой на примеры. Специалисты в данной области поймут, что следующие примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничения объема настоящего изобретения. Примеры, в которых конкретные технологии или условия не указаны, выполняются в соответствии с технологиями или условиями, описанными в публикациях в данной области техники (например, см. Guide to Molecular Cloning Experiments, authored by J. Sambrook et al., and translated by Huang Peitang et al., third edition, Science Press) или в соответствии с инструкцией к продукту. Используемые реагенты или инструменты являются обычными коммерчески доступными продуктами, если их производители не указаны.

В следующих примерах настоящего изобретения одобренное антитело бевацизумаб (торговое название Avastin®) для той же мишени было приобретено у компании Roche в

качестве эталонного антитела или было приготовлено в соответствии с примером получения 1.

В следующих примерах настоящего изобретения одобренное антитело ниволумаб для той же мишени (торговое название Opdivo®) было приобретено у BMS в качестве эталонного антитела.

В следующих примерах настоящего изобретения используемый ингибитор PARP олапариб был приобретен у Selleckchem.

Последовательность вариабельной области изотипического контрольного антитела в примерах настоящего изобретения, человеческого IgG против лизоцима куриного яйца (анти-HEL или человеческий IgG, сокращенно hIgG), получена из Acierno et al., «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). hIgG1DM и hIgG4WT, используемые в примерах, представляют собой контрольные изотипические антитела с анти-HEL, имеющие последовательность константной области hG1DM и hG4WT, соответственно, полученные в Akeso Biopharma, Inc.

В следующих примерах настоящего изобретения клетки рака молочной железы MDA-MB-231, клетки рака яичника SNU-251 и клетки SK-OV-3 содержат мутацию BRCA1 и мутацию BRCA2.

Пример получения 1: Получение антитела против VEGFA, бевацизумаба

Аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи коммерчески доступного моноклонального антитела против VEGFA Авастин (бевацизумаб) см. в публикации китайского патента № CN1259962A. Genscript было поручено синтезировать последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи.

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи бевацизумаба (Bevacizumab-Hv): (123 а.о.)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGVIN  
TYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWYF  
DVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:1)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи бевацизумаба:

(369 п.н.)

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTCT  
CTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAACTATGGAATGAATTGG  
GTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTTCGGCTGGATCAACACTTACAC  
CGGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTACCTTCAGCCTGGATAC  
AAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAG  
TCTACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTTTGACGT  
GTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGC (SEQ ID NO: 2)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи бевацизумаба (Бевацизумаб-Lv): (107 а.о.)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHS  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPTWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:  
3)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область легкой цепи бевацизумаба: (321 п.н.)

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAG  
GGTCACCATCACATGCAGTGCTTACAGGATATTTCCAACCTGAATTGGTATCA  
GCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGCTCCCTGCACT  
CAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACTCTGACC  
ATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTTCGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCG  
TGCCATGGACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAG (SEQ ID NO: 4)

Все константные области тяжелой цепи представляли собой С-область цепи гамма-1 Ig, № ДОСТУПА: P01857; все константные области легкой цепи представляли собой С-область каппа-цепи Ig, № ДОСТУПА: P01834.

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи бевацизумаба клонировали в вектор pсDNA3.1 и получали рекомбинантную экспрессирующую плазмиду антитела бевацизумаба. Рекомбинантную плазмиду использовали для трансфекции клеток 293F. Культуру клеток 293F очищали и затем детектировали.

Таким образом было получено моноклональное антитело против VEGFA Авастин (бевацизумаб).

Пример получения 2: Дизайн последовательности антитела 14C12 к PD-1, его гуманизированного антитела 14C12H1L1 и мутанта 14C12H1L1(M)

Аминокислотные последовательности и кодирующие последовательности нуклеиновых кислот тяжелой и легкой цепей антитела против PD-1 14C12 и его гуманизированного антитела 14C12H1L1 идентичны таковым 14C12 и 14C12H1L1 в публикации китайского патента № CN106967172A, соответственно.

(1) Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепи 14C12

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 14C12:  
(118 а.о.)

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFASFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISGG  
GRYTYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYCANRYGEAWFAYWGQG  
TLVTVSA (SEQ ID NO: 5)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи 14C12: (354 п.н.)

GAGGTCAAACCTGGTGGAGAGCGGCGGGCTGGTGAAGCCC GGCGGGTCA  
CTGAAACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCATGG  
GTGAGGCAGACCCTGAGAAGCGCCTGGAATGGGTGCTACTATCAGCGGAGGCGG  
GCGATACACCTACTATCCTGACTCTGTCAAAGGGAGATTCACAATTAGTCGGGATAA

CGCCAGAAATACTCTGTATCTGCAGATGTCTAGTCTGCGGTCCGAGGATACAGCTCT  
GTA CTATTGTGCAAACCGGTACGGCGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGACAGGGCA  
CCCTGGTGACAGTCTCTGCC (SEQ ID NO: 6)

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи 14C12:  
(107 а.о.)

DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV  
DGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:  
7)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая варибельную область  
легкой цепи 14C12: (321 п.н.)

GACATTAAGATGACACAGTCCCCTTCCTCAATGTACGCTAGCCTGGGCGAGC  
GAGTGACCTTCACATGCAAAGCATCCCAGGACATCAACACATACCTGTCTTGGTTTC  
AGCAGAAGCCAGGCAAAAGCCCCAAGACCCTGATCTACCGGGCCAATAGACTGGTG  
GACGGGGTCCCCAGCAGATTCTCCGGATCTGGCAGTGGGCAGGATTACTCCCTGACC  
ATCAGCTCCCTGGAGTATGAAGACATGGGCATCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAG  
TTCCCTCTGACCTTTGGAGCAGGCACAAAAGTGGAACTGAAG (SEQ ID NO: 8)

(2) Варибельная область тяжелой и легкой цепи и последовательности тяжелой и  
легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 14C12H1L1

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи  
14C12H1L1: (118 а.о.)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG  
GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ  
GTLVTVSS (SEQ ID NO: 9)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая варибельную область  
тяжелой цепи 14C12H1L1: (354 п.н.)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCA  
CTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGG  
GTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGGCGG  
GAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATA  
ACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCA  
CTGTA CTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGA  
ACCCTGGTGACAGTCTCTAGT (SEQ ID NO: 10)

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи  
14C12H1L1: (107 а.о.)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV  
SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID  
NO: 11)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая варибельную область  
легкой цепи 14C12H1L1: (321 п.н.)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACA

GGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTC  
 AGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTG  
 TCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGAC  
 CATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGA  
 GTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAACCTGGAGCTGAAG (SEQ ID NO: 12)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 14C12H1L1 (14C12H1): (448  
 а.о.)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG  
 GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ  
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT  
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC  
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ  
 VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY  
 SKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 13)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь 14C12H1L1  
 (14C12H1): (1344 п.н.)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCA  
 CTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGG  
 GTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGGCGG  
 GAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATA  
 ACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCA  
 CTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGA  
 ACCCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGACCTAGCGTGTTTCCTCTCGCC  
 CCCTCCTCCAAAAGCACCCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGA  
 CTA CTCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGT  
 CCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCTGTCCAGCGTCGT  
 CACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACA  
 AGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACA  
 CACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAACTCCTCGGAGGCCCTAGCGTCTTCCTCT  
 TTCCTCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTG  
 TCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATG  
 GCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACA ACTCCACC  
 TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGA  
 GTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATGAGAAGACCATCA  
 GCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACTGCCTCCCTCCAGG  
 GACGAACTACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC  
 AGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCAGAGAATAACTACAAGAC  
 CACCCCTCCTGTCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG  
 GACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGC

CCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA (SEQ ID NO: 14)

Аминокислотная последовательность легкой цепи 14C12H1L1 (14C12L1): (214 а.о.)  
 DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV  
 SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRVAAPSV  
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS  
 LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 15)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь 14C12H1L1 (14C12L1): (642 п.н.)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACA  
 GGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTC  
 AGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTG  
 TCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGAC  
 CATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGA  
 GTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAAGTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCG  
 CTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCA  
 GCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAAGTGCAGTGGAAAG  
 GTCGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTC  
 AAAAGATAGCACCTATTCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGA  
 GAAGCACAAAAGTGTATGCATGCGAAGTGACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGTGA  
 СТАAGTCTTTTAACCGGGCGAATGT (SEQ ID NO: 16)

(3) Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи 14C12H1L1(M)

14C12H1L1(M) было получено путем мутации аминокислоты в каркасной области (легкой цепи) 14C12H1L1.

Переменная область тяжелой цепи 14C12H1(M) 14C12H1L1(M):

Последовательность идентична переменной области тяжелой цепи 14C12H1 14C12H1L1. То есть аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 9.

Переменная область легкой цепи 14C12L1(M) 14C12H1L1(M): (108 а.о.; мутантное положение на основе 14C12H1L1 подчеркнуто в аминокислотной последовательности)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV  
 SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKR (SEQ ID NO: 17)

Пример получения 3: Дизайн последовательности биспецифических антител

#### 1. Дизайн последовательности

Структура биспецифического антитела, описанного в настоящем документе, представляет собой форму Моррисона (IgG-scFv), т. е. каждый из C-концов двух тяжелых цепей одного IgG связан с фрагментами scFv другого антитела, а конструкция тяжелой и легкой цепи показана в Таблице 1 ниже.

На основе бевацизумаба, описанного выше, антитело VP101 содержит

аминокислотные последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи 14C12H1L1(M) в виде фрагментов scFv и обозначается как VP101(M). По сравнению с 14C12H1L1, 14C12H1L1(M) продемонстрировало эффективно оптимизированную структуру биспецифического антитела и улучшенную эффективность.

Таблица 1: Конструкция тяжелых и легких цепей VP101(M) и VP101(G4M)

Биспецифическое антитело No.	Фрагмент иммуноглобулина		Линкерный фрагмент	scFv фрагмент
	Тяжелая цепь	Легкая цепь		
VP101(M)	Бевацизумаб-Н	Бевацизумаб-Л	Линкер1	14C12H1(M) <sub>V</sub> - Линкер1-14C12L1(M) <sub>V</sub>
VP101(G4M)	Бевацизумаб-G4H	Бевацизумаб-Л	Линкер1	14C12H1(M) <sub>V</sub> - Линкер1-14C12L1(M) <sub>V</sub>

В таблице 1 выше:

(1) Метка «V» в правом нижнем углу относится к вариабельной области соответствующей тяжелой цепи или вариабельной области соответствующей легкой цепи. Для тех, у кого нет метки «V», соответствующая тяжелая или легкая цепь представляет собой полную длину, содержащую константную область. Соответствующие последовательности, описанные в приведенных выше примерах получения, относятся к аминокислотным последовательностям этих вариабельных областей или полной длины и кодирующим их последовательностям нуклеиновых кислот.

(2) Аминокислотная последовательность Линкера1 представляет собой GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 18)

Необязательно аминокислотная последовательность GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 19) может быть использована в качестве Линкера2 для замены вышеупомянутого Линкера1.

(3) Бевацизумаб-Н содержит С-область цепи гамма-1 Ig (№ ДОСТУПА: P01857) в качестве константной области тяжелой цепи.

(4) Бевацизумаб-G4H содержит С-область цепи гамма-4 Ig (№ ДОСТУПА: P01861.1) в качестве константной области тяжелой цепи.

## 2. Экспрессия и очистка антитела VP101(M)

Последовательность кДНК тяжелой цепи и последовательность кДНК легкой цепи VP101(M) клонировали в вектор pUC57simple (предоставленный Genscript) с получением плазмид pUC57simple-VP101H и pUC57simple-VP101L, соответственно.

Плазмиды pUC57simple-VP101H и pUC57simple-VP101L подвергали ферментативному расщеплению (HindIII и EcoRI). Тяжелые и легкие цепи, выделенные с помощью электрофореза, субклонировали в вектор pcDNA3.1, а рекомбинантные плазмиды экстрагировали для совместной трансфекции клеток 293F. Через 7 дней культивирования культуральную среду центрифугировали на высокой скорости, супернатант концентрировали и загружали в колонку HiTrap MabSelect SuRe. Затем белок подвергали одностадийной элюции с использованием буфера для элюции, и антитело целевого образца

VP101 выделяли и переносили в PBS путем замены буфера.

### 3. Детектирование антитела VP101(M)

Очищенный образец добавляли как к загрузочному буферу для электрофореза белка в восстанавливающих условиях, так и к загрузочному буферу для электрофореза белка в невосстанавливающих условиях, кипятили и подвергали анализу электрофореза в SDS-PAGE.

Для дифференциации от мутантного антитела в примере получения 4 VP101(M) также упоминается как VP101(hG1WT) в настоящем изобретении. VP101(M), описанное выше, представляет собой «дикий тип», содержащий С-область цепи гамма-1 Ig (ДОС: P01857) в качестве константной области тяжелой цепи и С-область каппа-цепи Ig (№ ДОСТУПА: P01834) в качестве константной области легкой цепи.

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи фрагмента иммуноглобулина в VP101(hG1WT): (453 а.о.)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGVIN  
 TYTGEPTYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWYF  
 DVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL  
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  
 HTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD  
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 20)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь фрагмента иммуноглобулина в VP101(hG1WT): (1359 п.н.)

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTCT  
 CTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAACTATGGAATGAATTGG  
 GTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTTCGGCTGGATCAACACTTACAC  
 CGGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTACCTTCAGCCTGGATAC  
 AAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAG  
 TCTACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTTTGACGT  
 GTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGCGCAAGCACCAAAGGGCCCAGC  
 GTGTTTCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACCCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGA  
 TGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCT  
 CTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCC  
 CTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGT  
 AACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAATC  
 CTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAACTCCTCGGAGGCCC  
 TAGCGTCTTCTCTTTTCTCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCC  
 TGAAGTCACCTGTGTCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCA  
 ACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAA  
 CAGTACAACCTCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGG

CTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCAT  
 TGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACAC  
 TGCCTCCCTCCAGGGACGAACTACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCA  
 AGGGCTTTTATCCCAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAG  
 AATAACTACAAGACCACCCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTAC  
 AGCAAACCTGACCGTCGATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTTGTTC  
 GTGATGCATGAAGCACTGCACAACCATTATACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCCCC  
 GGCAAG (SEQ ID NO: 21)

Для дифференциации от мутантного антитела в примере получения 4 VP101(G4M) также упоминается как VP101(hG4WT) в настоящем изобретении. VP101(G4M), описанное выше, представляет собой «дикий тип», содержащий С-область цепи гамма-4 Ig (№ ДОСТУПА: P01861.1) в качестве константной области тяжелой цепи и С-область каппа-цепи Ig (№ ДОСТУПА: P01834) в качестве константной области легкой цепи.

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи фрагмента иммуноглобулина в VP101(hG4WT): (450 а.о.)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGVIN  
 TYTGEPTYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWYF  
 DVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL  
 TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPP  
 CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV  
 HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP  
 REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG  
 SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO: 22)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь фрагмента иммуноглобулина в VP101(hG4WT): (1350 п.н.)

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTCT  
 CTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAACTATGGAATGAATTGG  
 GTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTTCGGCTGGATCAACACTTACAC  
 CGGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTACCTTCAGCCTGGATAC  
 AAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAG  
 TCTACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTTTGACGT  
 GTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGCGCAAGCACCAAAGGGCCCTCG  
 GTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGC  
 TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCC  
 CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC  
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTG  
 CAACGTTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAAT  
 ATGGTCCCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCT  
 TCCTGTTCCCCCAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA  
 CGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC



TAGCGTCTTCCTCTTTCTCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCC  
 TGAAGTCACCTGTGTCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCA  
 ACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAA  
 CAGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGG  
 CTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCAT  
 TGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCAGGGAGCCCCAGGTCTATACAC  
 TGCCTCCCTCCAGGGACGAACTACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCA  
 AGGGCTTTTATCCCAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAG  
 AATAACTACAAGACCACCCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTAC  
 AGCAAACCTGACCGTCGATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTTGTTC  
 GTGATGCATGAAGCACTGCACAACCATTATACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCCCC  
 GGCAAG (SEQ ID NO: 25)

Аминокислотные последовательности легких цепей фрагментов иммуноглобулина VP101(hG1DM), VP101(hG1WT) и VP101(hG4WT) идентичны, и последовательности кодирующих нуклеиновых кислот также идентичны.

Аминокислотная последовательность легкой цепи фрагмента иммуноглобулина в VP101(hG1DM): (214 а.о.)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHS  
 GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI  
 FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS  
 STLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 26)

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь фрагмента иммуноглобулина в VP101(hG1DM): (642 п.н.)

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAG  
 GGTCACCATCACATGCAGTGCTTACAGGATATTTCCAACCTGAATTGGTATCA  
 GCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGCTCCCTGCACT  
 CAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACTCTGACC  
 ATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTCTGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCG  
 TGCCATGGACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCT  
 CCCAGTGTCTTCATTTTTCCCCTAGCGACGAACAGCTGAAATCCGGGACAGCCTCT  
 GTGGTCTGTCTGCTGAACAACCTTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGGAAGGT  
 CGATAACGCCCTGCAGAGTGGCAATTCACAGGAGAGCGTGACAGAACAGGACTCCA  
 AAGATTCTACTTATAGTCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCTGACTACGAAA  
 AGCATAAAGTGTATGCATGTGAGGTCACCCACCAGGGGCTGAGCAGTCCAGTCACC  
 AAGTCATTCAACAGAGGCGAGTGC (SEQ ID NO: 27)

Пример 1: Анализ константы аффинности FcγRI к VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM)

Fc-рецептор FcγRI, также известный как CD64, может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и участвует в антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Связывающая способность терапевтического моноклонального антитела с Fc-рецепторами будет влиять на безопасность и эффективность антитела.

Константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) к FcγRI измеряли с использованием системы Fortebio Octet для оценки ADCC-активности антител.

Методика определения константы аффинности антител к FcγRI с помощью системы Fortebio Octet кратко описана следующим образом: Буфером для разведения образца был раствор 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4. 1 мкг/мл FcγRIa иммобилизовали на сенсоре HIS1K в течение 50 с. Сенсор уравнивали в буфере в течение 60 с и в течение 120 с определяли связывание иммобилизованного CD64 на сенсоре с антителами в концентрациях 3,12-50 нМ (двукратное разведение). Антитело диссоциировали в буфере в течение 120 с. Сенсор обновляли 4 раза в 10 мМ глицина, pH 1,5, каждый раз по 5 с. Температура детектирования составляла 30 °С, а частота - 0,3 Гц. Данные анализировали с помощью модели подбора 1:1 для получения констант аффинности.

Результаты анализа константы аффинности FcγRI к VP101(hG1WT), VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM) и эталонным антителам ниволумаб и бевацизумаб показаны в Таблице 1 и на ФИГ. 1-5.

Таблица 1: Кинетика связывания VP101(hG1WT), VP101(hG1DM) и их подтипов с FcγRI

Антитело	K <sub>D</sub> (M)	kon(1/Мс)	SE (kon)	kdis(1/с)	SE(kdis)	Rmax(нм)
VP101(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Бевацизумаб	3,68E-09	6,61E+05	2,07E+04	2,44E-03	9,02E-05	0,46-0,49
Ниволумаб	6,20E-09	6,98E+05	2,22E+04	4,32E-03	9,88E-05	0,48-0,53
VP101(hG1WT)	3,95E-09	5,67E+05	1,82E+04	2,24E-03	9,02E-05	0,68-0,80
VP101(hG4WT)	8,52E-09	6,28E+05	2,12E+04	5,35E-03	1,07E-04	0,61-0,65

N/A означает, что антитело не имело связывания или имело очень слабый сигнал связывания с антигеном. Таким образом, результаты не анализировали, и соответствующие данные не были получены.

**Результаты показали, что VP101(hG1WT) связывался с FcγRI с константой аффинности 3,95E-09M; VP101(hG4WT) связывался с FcγRI с константой аффинности 8,52E-09M; бевацизумаб связывался с FcγRI с константой аффинности 3,68E-09M; ниволумаб связывался с FcγRI с константой аффинности 6,20E-09M; VP101(hG1DM) не имел связывания или имел чрезвычайно слабый сигнал связывания с FcγRI, поэтому результаты не анализировали и не получали соответствующих данных.**

Результаты показали, что антитела, отличные от VP101(hG1DM), которые не связываются с FcγRI, имеют аналогичное связывание с FcγRI. Связывающая активность VP101(hG1DM) была эффективно устранена.

Пример 2: Анализ константы аффинности FcγRIa\_H131 к VP101(hG1WT) и

## VP101(hG1DM)

Fc-рецептор FcγRIIIa\_H131 (также известный как CD32a\_H131) может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и опосредовать эффекты ADCC.

Константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) к FcγRIIIa\_H131 измеряли с использованием системы Fortebio Octet для оценки ADCC-активности антител.

Метод определения константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) к FcγRIIIa\_H131 с помощью системы Fortebio Octet кратко описан следующим образом: буфер для иммобилизационного разведения представлял собой раствор 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4, буфер для разбавления аналита представлял собой раствор 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4. 5 мкг/мл FcγRIIIa\_H131 иммобилизовали на сенсоре NTA в течение времени иммобилизации около 60 нм. Сенсор уравнивали в буфере 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA в PBS pH 7,4 в течение 600 с для блокирования, и связывание иммобилизованного FcγRIIIa\_H131 на сенсоре с антителами в концентрациях 12,5-200 нМ (серийное двукратное разведение) определяли в течение 60 с. Антитело диссоциировало в буфере в течение 60 с. Сенсор обновляли в 10 мМ глицина, pH 1,7, и 10 нМ сульфата никеля. Температура детектирования составляла 30 °С, а частота - 0,6 Гц. Данные анализировали с помощью модели подбора 1:1 для получения констант аффинности.

Результаты анализа констант аффинности FcγRIIIa\_H131 к VP101(hG1WT), VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM) и эталонным антителам ниволумаб и бевацизумаб показаны в Таблице 2 и на ФИГ. 6-10.

Таблица 2: Кинетика связывания VP101(hG1WT), VP101(hG1DM) и их подтипов с FcγRIIIa\_H131

Антитело	K <sub>D</sub> (M)	kon(1/Mc)	SE (kon)	kdis(1/c)	SE(kdis)	Rmax(нм)
VP101(hG1DM)	3,57E-08	1,15E+05	1,01E+04	4,11E-03	3,27E-04	0,41-0,53
Бевацизумаб	6,44E-08	2,10E+05	1,78E+04	1,36E-02	5,14E-04	0,49-0,68
Ниволумаб	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VP101(hG1WT)	2,28E-08	2,41E+05	1,48E+04	5,50E-03	3,49E-04	1,40-1,52
VP101(hG4WT)	3,68E-08	2,13E+05	2,43E+04	7,83E-03	6,65E-04	0,41-0,57

N/A означает, что антитело не имело связывания или имело очень слабый сигнал связывания с антигеном. Таким образом, результаты не анализировали, и соответствующие данные не были получены.

**Результаты показали, что VP101(hG1WT) связывался с FcγRIIIa\_H131 с константой аффинности 2,28E-08M; VP101(hG4WT) связывался с FcγRIIIa\_H131 с константой аффинности 3,68E-08M; бевацизумаб связывался с FcγRIIIa\_H131 с**

константой аффинности  $6,44E-08M$ ; VP101(hG1DM) связывался с Fc $\gamma$ RIIa\_H131 с константой аффинности  $3,57E-08M$ ; ниволумаб не связывался или имел чрезвычайно слабый сигнал связывания с Fc $\gamma$ RIIa\_H131, поэтому результаты не анализировались и не были получены соответствующие данные.

Результаты показали, что кроме ниволумаба, который не связывается с Fc $\gamma$ RIIa\_H131, антитела проявляют аффинность связывания с Fc $\gamma$ RIIa\_H131 в порядке убывания: VP101(hG1WT), VP101(hG1DM), VP101(hG4WT), бевацизумаб.

Пример 3: Анализ константы аффинности Fc $\gamma$ RIIa\_R131 к VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM)

Fc-рецептор Fc $\gamma$ RIIa\_R131 (также известный как CD32a\_R131) может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и опосредовать эффекты ADCC.

Константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) к Fc $\gamma$ RIIa\_R131 измеряли с использованием системы Fortebio Octet для оценки ADCC-активности антител.

Ниже приводится краткое описание метода определения константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) с помощью системы Fortebio Octet. Буфер для разведения для иммобилизации представлял собой раствор 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4, а буфер для разведения аналита представлял собой раствор 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4. 5 мкг/мл Fc $\gamma$ RIIa\_R131 иммобилизовали на сенсоре NTA в течение времени иммобилизации примерно 60 нм. Сенсор уравнивали в буфере 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA в PBS pH 7,4 в течение 600 с для блокирования и связывание иммобилизованного Fc $\gamma$ RIIa\_R131 на сенсоре с антителами в концентрациях 12,5-200 нМ (серийное двукратное разведение) определяли в течение 60 с. Антитело диссоциировало в буфере в течение 60 с. Сенсор обновляли в 10 мМ глицина, pH 1,7, и 10 нМ сульфата никеля. Температура детектирования составляла 30 °С, а частота - 0,6 Гц. Данные анализировали с помощью модели подбора 1:1 для получения констант аффинности.

Результаты анализа константы аффинности Fc $\gamma$ RIIa\_R131 к VP101(hG1WT), VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM) и эталонным антителам ниволумаб и бевацизумаб показаны в Таблице 3 и на ФИГ. 11-15.

Таблица 3: Кинетика связывания VP101(hG1WT), VP101(hG1DM) и их подтипов с Fc $\gamma$ RIIa\_R131

Антитело	K <sub>D</sub> (M)	kon(1/Mc)	SE (kon)	kdis(1/c)	SE(kdis)	Rmax(нм)
VP101(hG1DM)	3,35E-08	1,20E+05	9,72E+03	4,03E-03	3,08E-04	0,57-0,69
Бевацизумаб	5,16E-08	2,59E+05	1,72E+04	1,33E-02	4,52E-04	0,42-0,69
Ниволумаб	6,93E-08	4,78E+05	1,09E+05	3,31E-02	2,54E-03	0,08-0,16

VP101(hG1WT)	2,42E-08	2,14E+05	1,30E+04	5,17E-03	3,28E-04	1,75-1,92
VP101(hG4WT)	3,57E-08	1,99E+05	1,23E+04	7,09E-03	3,40E-04	0,81-1,05

N/A означает, что антитело не имело связывания или имело очень слабый сигнал связывания с антигеном. Таким образом, результаты не анализировали, и соответствующие данные не были получены.

**Результаты показали, что VP101(hG1WT) связывался с FcγRIIa\_R131 с константой аффинности 2,42E-08M; VP101(hG4WT) связывался с FcγRIIa\_R131 с константой аффинности 3,57E-08M; бевацизумаб связывался с FcγRIIa\_R131 с константой аффинности 5,16E-08M; ниволумаб связывался с FcγRIIa\_R131 с константой аффинности 6,93E-08M; VP101(hG1DM) связывался с FcγRIIa\_R131 с константой аффинности 3,35E-08M.**

Результаты показали, что антитела проявляют аффинность связывания с FcγRIIa\_R131 в порядке убывания: VP101(hG1WT), VP101(hG1DM), VP101(hG4WT), бевацизумаб, ниволумаб.

Пример 4: Анализ констант аффинности FcγRIIb к VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) Fc-рецептор FcγRIIb (также известный как CD32b) может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и участвует в регуляции функций иммунных клеток.

Константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) к FcγRIIb измеряли с использованием системы Fortebio Octet для оценки связывающей способности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) с Fc-рецепторами.

Метод определения константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) к FcγRIIb с помощью системы Fortebio Octet кратко описан следующим образом: буфер для разведения для иммобилизации представлял собой раствор 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4, буфер для разбавления аналита представлял собой раствор 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4. 5 мкг/мл hFCGR2B-his иммобилизовали на сенсоре NTA в течение времени иммобилизации примерно 60 нм. Сенсор уравнивали в буфере 0,02% Tween-20, 0,02% казеина и 0,1% BSA в PBS pH 7,4 в течение 600 с для блокирования и связывание иммобилизованного hFCGR2B-his на сенсоре с антителами в концентрациях 12,5 -200 нМ (серийное двукратное разведение) определяли в течение 60 с. Антитело диссоциировало в буфере в течение 60 с. Сенсор обновляли в 10 мМ глицина, pH 1,7, и 10 нМ сульфата никеля. Температура детектирования составляла 30 °C, а частота - 0,6 Гц. Данные анализировали с помощью модели подбора 1:1 для получения констант аффинности.

Пример 5: Анализ константы аффинности FcγRIIIa\_V158 к VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM)

Fc-рецептор FcγRIIIa\_V158 (также известный как CD16a\_V158) может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и опосредовать эффекты ADCC.

Константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) к FcγRIIIa\_V158 измеряли с использованием системы Fortebio Octet для оценки ADCC-активности антител.

Методика определения константы аффинности антител к FcγRIIIa\_V158 с помощью системы Fortebio Octet кратко описана следующим образом. Буфером для разведения образца служил раствор 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4. 5 мкг/мл FcγRIIIa\_V158 иммобилизовали на сенсоре HIS1K в течение 120 с. Сенсор уравнивали в буфере в течение 60 с и в течение 60 с определяли связывание иммобилизованного hFcGR3A(V158)-his на сенсоре с антителами в концентрациях 31,25-500 нМ (серийное двукратное разведение). Антитело диссоциировало в буфере в течение 60 с. Сенсор обновляли 4 раза в 10 мМ глицина, pH 1,5, каждый раз по 5 с. Температура детектирования составляла 30 °С, а частота - 0,3 Гц. Данные анализировали с помощью модели подбора 1:1 для получения констант аффинности.

Результаты анализа константы аффинности FcγRIIIa\_V158 к VP101(hG1WT), VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM) и эталонным антителам ниволумаб и бевацизумаб показаны в Таблице 4 и на ФИГ. 16-20.

Таблица 4: Кинетика связывания VP101(hG1WT), VP101(hG1DM) и их подтипов с FcγRIIIa\_V158

Антитело	K <sub>D</sub> (M)	kon(1/Мс)	SE (kon)	kdis(1/с)	SE(kdis)	Rmax(нм)
VP101(hG1DM)	1,34E-07	6,05E+05	2,36E+05	8,11E-02	7,42E-03	0,07-0,21
Бевацизумаб	2,76E-08	5,06E+05	1,14E+05	1,39E-02	1,41E-03	0,13-0,51
Ниволумаб	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VP101(hG1WT)	4,35E-08	2,39E+05	3,14E+04	1,04E-02	8,73E-04	0,80-1,22
VP101(hG4WT)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A означает, что антитело не имело связывания или имело очень слабый сигнал связывания с антигеном. Таким образом, результаты не анализировали, и соответствующие данные не были получены.

**Результаты показали, что VP101(hG1WT) связывалось с FcγRIIIa\_V158 с константой аффинности 4,35E-08M; VP101(hG1DM) связывался с FcγRIIIa\_V158 с константой аффинности 1,34E-07M; бевацизумаб связывался с FcγRIIIa\_V158 с константой аффинности 2,76E-08M; ниволумаб и VP101(hG4WT) не имели связывания или имели чрезвычайно слабый сигнал связывания с FcγRIIIa\_V158, поэтому результаты не анализировались, и соответствующие данные не были получены.**

Результаты показали, что кроме ниволумаба и VP101(hG4WT), которые не связываются с FcγRIIIa\_V158, антитела проявляют аффинность связывания с FcγRIIIa\_V158 в порядке убывания: бевацизумаб, VP101(hG1WT), VP101(hG1DM).

Пример 6: Анализ константы аффинности FcγRIIIa\_V158 к VP101(hG1WT) и

## VP101(hG1DM)

Fc-рецептор FcγRIIIa\_F158 (также известный как CD16a\_F158) может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и опосредовать эффекты ADCC.

Константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) к FcγRIIIa\_F158 измеряли с использованием системы ForteBio Octet для оценки ADCC-активности антител.

Метод определения константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) к FcγRIIIa\_F158 с помощью системы ForteBio Octet кратко описан следующим образом: Буфер для разведения образца представлял собой раствор 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA в PBS, pH 7,4. 5 мкг/мл FcγRIIIa\_F158 иммобилизовали на сенсоре HIS1K в течение 120 с. Сенсор уравнивали в буфере в течение 60 с и в течение 60 с определяли связывание иммобилизованного hFcGR3A(F158)-his на сенсоре с антителами в концентрациях 31,25-500 нМ (серийное двукратное разведение). Антитело диссоциировало в буфере в течение 60 с. Сенсор обновляли 4 раза в 10 мМ глицина, pH 1,5, каждый раз по 5 с. Температура детектирования составляла 30 °С, а частота - 0,3 Гц. Данные анализировали с помощью модели подбора 1:1 для получения констант аффинности.

Результаты анализа константы аффинности FcγRIIIa\_F158 к VP101(hG1WT), VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM) и эталонным антителам ниволумаб и бевацизумаб показаны в Таблице 5 и на ФИГ. 21-25.

Таблица 5: Кинетика связывания VP101(hG1WT), VP101(hG1DM) и их подтипов с FcγRIIIa\_F158

Антитело	K <sub>D</sub> (M)	kon(1/Mc)	SE (kon)	kdis(1/c)	SE(kdis)	Rmax(нм)
VP101(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Бевацизумаб	9,32E-08	2,64E+05	7,16E+04	2,46E-02	2,09E-03	0,08-0,20
Ниволумаб	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VP101(hG1WT)	7,41E-08	2,47E+05	5,20E+04	1,83E-02	1,55E-03	0,15-0,48
VP101(hG4WT)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A означает, что антитело не имело связывания или имело очень слабый сигнал связывания с антигеном. Таким образом, результаты не анализировали, и соответствующие данные не были получены.

Результаты показали, что VP101(hG1WT) связывалось с FcγRIIIa\_F158 с константой аффинности 7,41E-08M; бевацизумаб связывался с FcγRIIIa\_F158 с константой аффинности 9,32E-08M; ниволумаб, VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM) не имели связывания или имели чрезвычайно слабый сигнал связывания с FcγRIIIa\_F158, поэтому результаты не анализировались и не были получены соответствующие данные.

Результаты показали, что кроме ниволумаба, VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM), которые не связываются с Fc $\gamma$ R3a\_F158, антитела проявляют аффинность связывания с Fc $\gamma$ R3a\_F158 в порядке убывания: VP101(hG1WT), бевацизумаб.

Пример 7: Анализ константы аффинности C1q к VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM)

Сывороточный компонент комплемента C1q может связываться с Fc-фрагментом антител IgG и опосредовать эффекты CDC. Связывающая способность терапевтического моноклонального антитела против C1q влияет на безопасность и эффективность антитела.

Константы аффинности VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) к C1q измеряли с использованием системы Fortebio Octet для оценки CDC-активности антител.

Методика определения константы аффинности антител к C1q с помощью системы Fortebio Octet кратко описана следующим образом: в качестве буфера для разведения образца использовали раствор PBS, 0,02% Tween-20 и 0,1% BSA, pH 7,4. 50 мкг/мл антитела иммобилизовали на сенсоре FAB2G при высоте иммобилизации примерно 2,0 нм. Сенсор уравнивали в буфере в течение 60 с для блокирования и в течение 60 с определяли связывание иммобилизованного на сенсоре антитела с C1q в концентрациях 0,625-10 нМ (двукратное разведение). Антиген и антитело диссоциировали в буфере в течение 60 с. Сенсор обновляли 4 раза в 10 мМ глицина, pH 1,7, каждый раз по 5 с. Скорость встряхивания планшета для образцов составляла 1000 об/мин, температура составляла 30°C, а частота составляла 0,6 Гц. Данные анализировали с помощью модели подбора 1:1 для получения констант аффинности. Для сбора данных использовали программное обеспечение Fortebio Data Acquisition 7.0, а для анализа данных программное обеспечение Fortebio Data Analysis 7.0.

Результаты анализа константы аффинности C1q к VP101(hG1WT), VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM) и эталонным антителам ниволумаб и бевацизумаб показаны в Таблице 6 и на ФИГ. 26-30.

Таблица 6: Кинетика связывания VP101(hG1WT), VP101(hG1DM) и их подтипов с C1q

Антитело	$K_D$ (М)	$K_{on}(1/Мс)$	SE (kon)	kdis(1/c)	SE(kdis)	Rmax(нм)
VP101(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Бевацизумаб	1,14E-09	6,52E+06	5,64E+05	7,40E-03	5,58E-04	0,51-0,63
Ниволумаб	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VP101(hG1WT)	9,76E-10	5,73E+06	5,49E+05	5,59E-03	6,12E-04	0,32-0,51
VP101(hG4WT)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A означает, что антитело не имело связывания или имело очень слабый сигнал связывания с антигеном. Таким образом, результаты не анализировали, и соответствующие

данные не были получены.

**Результаты показали, что VP101(hG1WT) связывалось с C1q с константой аффинности 9,76E-10M; бевацизумаб связывался с C1q с константой аффинности 1,14E-09M; ниволумаб, VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM) не имели связывания или имели чрезвычайно слабый сигнал связывания с C1q, поэтому результаты не анализировали, и соответствующие данные не были получены.**

Результаты показали, что за исключением ниволумаба, VP101(hG4WT) и VP101(hG1DM), которые не связываются с FcγRIIIa\_F158, антитела проявляют аффинность связывания с C1q, а VP101(hG1WT) и бевацизумаб имеют аналогичную аффинность.

Пример 8: Анализ активности ADCC VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в клетках CHO-K1-PD1, экспрессирующих антиген PD-1

Чтобы протестировать ADCC-эффект антител VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) на цитологическом уровне, авторы изобретения сконструировали клетку CHO-K1-PD1, экспрессирующую PD-1, и систему реакции смешанных лимфоцитов нормальных PBMC человека и клеток-мишеней.

Метод анализа активности ADCC VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) на клетках CHO-K1-PD1, экспрессирующих антиген PD-1, следующий:

Сначала был сконструирован вектор, сверхэкспрессирующий PD-1 человека pCDH-CMV-PD1FL-Puro (pCDH-CMV-Puro был приобретен у Youbio), и экспрессирующий вектор был упакован вирусом до инфицирования клеток CHO-K1. Для скрининга добавляли пурамицин (2 мкг/мл) и получали стабильную клеточную линию CHO-K1-PD1 с лекарственной устойчивостью, стабильно экспрессирующую мембранный белок PD-1. Нормальные PBMC человека получали в соответствии с руководством Ficoll для среды для разделения мононуклеарных клеток периферической крови. Выделенные PBMC ресуспендировали в полной культуральной среде 1640. После окрашивания трипановым синим клетки подсчитывали, анализировали на жизнеспособность и инкубировали в течение ночи в инкубаторе при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> и насыщенной влажности. На следующий день клетки CHO-K1-PD1 и PBMC собирали отдельно и центрифугировали для удаления супернатанта. Осадок клеток ресуспендировали в среде RPMI-1640 (содержащей 1% BSA) (далее - аналитическая среда), центрифугировали и дважды промывали. Клетки подсчитывали, анализировали на жизнеспособность и устанавливали надлежащий диапазон плотности клеток с использованием аналитической среды. В соответствии с планом исследования суспензию клеток CHO-K1-PD1 вносили в 96-луночный планшет (30000/лунку) и добавляли 50 мкл антитела. Смесь равномерно перемешивали и предварительно инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После предварительной инкубации добавляли PBMC в концентрации 900000 клеток/50 мкл/лунку. Смесь хорошо перемешивали и инкубировали в течение 4 ч в инкубаторе при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>. Через 4 ч 96-луночный планшет извлекали и центрифугировали при 250×g в течение 5 мин. 100 мкл супернатанта осторожно переносили в новый 96-луночный плоскодонный микропланшет (осадок клеток не пипетировать). В каждую лунку добавляли по 100 мкл

свежеприготовленного реакционного раствора в соответствии с инструкцией к набору для определения цитотоксичности. Клетки инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. Значения оптической плотности измеряли при 490 нм и 650 нм и рассчитывали по формуле: оптическая плотность = оптическая плотность 490 нм - оптическая плотность 650 нм. Активность ADCC рассчитывали для каждой группы по формуле: ADCC (%) = (группа обработки - группа отрицательного контроля) / (максимальное высвобождение LDH в клетке-мишени - спонтанное высвобождение LDH в клетке-мишени) × 100%.

Результаты анализа активности ADCC VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в клетках CHO-K1-PD1, экспрессирующих антиген PD-1, выражены как ADCC% и показаны на ФИГ. 31.

Результаты показали, что положительный контроль 14C12H1L1(G1WT) обладает значительной активностью ADCC в реакции смешанных лимфоцитов PBMC и клеток CHO-K1-PD1, что указывает на то, что система ADCC является нормальной. По сравнению с изотипическим контрольным антителом hIgG1DM VP101(hG1WT) продемонстрировало значительную активность ADCC с дозозависимостью, в то время как VP101(G1DM) не проявило активности ADCC. Результаты показали, что VP101(hG1DM), полученное мутацией на основе VP101(hG1WT), не имеет активности ADCC на цитологическом уровне, и эффект ADCC устранен.

Пример 9: Анализ активности CDC VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в клетках CHO-K1-PD1, экспрессирующих антиген PD-1

Для проверки CDC-эффекта антител VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) на цитологическом уровне авторы изобретения сконструировали клетку CHO-K1-PD1, экспрессирующую PD-1 (метод конструирования см. в Примере 8), и систему реакции смешанных лимфоцитов клеток-мишеней и нормальной сыворотки комплемента человека.

Метод анализа активности CDC VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) на клетках CHO-K1-PD1, экспрессирующих антиген PD-1, следующий:

В день детектирования клетки CHO-K1-PD1 собирали путем расщепления трипсином, центрифугировали при 170×g в течение 5 мин, затем ресуспендировали в RPMI-1640 (содержащем 1% BSA) (далее - аналитическая среда), центрифугировали и промывали 2 раза. Клетки подсчитывали, анализировали на жизнеспособность и устанавливали надлежащий диапазон плотности клеток с использованием аналитической среды. В соответствии с планом исследования суспензию клеток CHO-K1-PD1 вносили в 96-луночный планшет (30000/лунку) и добавляли 50 мкл антитела. Смесь равномерно перемешивали и предварительно инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. После предварительной инкубации добавляли нормальную человеческую сыворотку с компонентами комплемента (конечная концентрация: 2%) в количестве 50 мкл/лунку. Смесь хорошо перемешивали и инкубировали в течение 4 ч в инкубаторе при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>. Через 4 ч смесь центрифугировали при 250×g в течение 5 мин. 100 мкл супернатанта осторожно пипетировали и перенесли в новый плоскодонный 96-луночный планшет (не пипетировать клеточный осадок). В каждую лунку добавляли по 100 мкл

свежеприготовленного реакционного раствора в соответствии с инструкцией к набору для определения цитотоксичности. Клетки инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. Значения оптической плотности измеряли при 490 нм и 650 нм и рассчитывали по формуле: оптическая плотность = оптическая плотность 490 нм - оптическая плотность 650 нм. Активность CDC рассчитывали для каждой группы по формуле:  $CDC (\%) = \frac{\text{группа обработки} - \text{группа отрицательного контроля}}{\text{максимальное высвобождение LDH в клетке-мишени} - \text{спонтанное высвобождение LDH в клетке-мишени}} \times 100\%$ .

Результаты анализа активности CDC VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) в клетках CHO-K1-PD1, экспрессирующих антиген PD-1, выражены в процентах CDC и показаны на ФИГ. 32.

Результаты показали, что по сравнению с изотипическим контрольным антителом hIgG1DM положительное контрольное антитело 14C12H1L1(G1WT) имеет значительную разницу в CDC% в реакции смешанных лимфоцитов нормальной сыворотки с компонентами комплемента человека и клеток CHO-K1-PD1, что указывает на то, что система CDC является нормальной. При эквивалентных уровнях доз VP101(hG1WT) и VP101(hG1DM) не имеют существенной разницы в CDC% по сравнению с изотипическим контролем.

Пример 10: Фармакодинамическая активность VP101(hG1DM), измеренная с помощью реакции смешанных лимфоцитов (MLR) мононуклеарных клеток периферической крови и клеток Raji-PDL1

Сначала конструировали вектор, сверхэкспрессирующий PD-L1 человека, plenti6.3-PD-L1-BSD (plenti6.3-BSD был приобретен у Invitrogen), и экспрессирующий вектор был упакован вирусом до инфицирования клеток Raji. Для скрининга добавляли BSD (10 мкг/мл) и получали стабильную клеточную линию Raji-PDL1, стабильно экспрессирующую мембранный белок PD-L1. Нормальные PBMC человека выделяли в соответствии с инструкцией Ficoll по выделению мононуклеарных клеток периферической крови. Выделенные PBMC ресуспендировали в полной среде 1640, подсчитывали и замораживали. PBMC оттаивали и совместно инкубировали с энтеротоксином B *Staphylococcus aureus* (SEB) в течение двух дней. Через два дня собирали клетки Raji-PDL1 в логарифмической фазе и добавляли митомицин C (Sigma, рабочая концентрация: 25 мкг/мл). Клетки Raji-PDL1 инкубировали в инкубаторе в течение 60 мин, центрифугировали и промывали. PBMC после двух дней стимуляции SEB собирали и промывали. Реакцию смешанных лимфоцитов проводили в соотношении числа клеток 1:1 с антителами или без них. Через 3 дня супернатант собирали центрифугированием и определяли концентрации IL-2 и IFN- $\gamma$  в супернатанте с помощью ИФА.

Результаты секреции IFN- $\gamma$  показаны на ФИГ. 33. Результаты показали, что VP101(hG1DM) может эффективно стимулировать секрецию IFN- $\gamma$  со значительно более высокой активностью, чем ниволумаб.

Результаты секреции IL-2 показаны на ФИГ. 34. Результаты показали, что VP101(hG1DM) может эффективно стимулировать секрецию IL-2 дозозависимым образом

со значительно более высокой активностью, чем ниволумаб.

Пример 11: Отсутствие активности антителозависимого клеточного фагоцитоза VP101(hG1DM) в отношении PD-1-положительных клеток

Антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) относится к связыванию Fc-фрагмента антитела, связанного с антигеном клеточной поверхности, с Fc-рецептором фагоцитарно активной клетки, такой как макрофаг, что, в свою очередь, опосредует фагоцитоз связанной с антителом клетки. Для антител-ингибиторов иммунных контрольных точек, таких как антитела против PD-1, присутствие ADCP-активности будет вызывать повреждение иммунных клеток, экспрессирующих PD-1, которые проявляют противоопухолевый эффект уничтожения, тем самым влияя на их противоопухолевую активность.

В этом эксперименте мышинные макрофаги использовали в качестве эффекторных клеток, а клетки CHO-K1-PD1, сверхэкспрессирующие PD-1 (метод конструирования см. в Примере 8), использовали в качестве клеток-мишеней для тестирования опосредованного ADCP-эффекта. ADCP-активность VP101(hG1DM) на клетках, экспрессирующих PD-1, определяли с помощью проточной цитометрии, и результаты показали, что антитело не обладает ADCP-активностью, в то время как одобренное антитело против PD-1 ниволумаб с той же мишенью обладает значительной ADCP-активностью. Метод заключается в следующем:

Бедренный костный мозг мышей C57 (приобретенный в Центре животных медицинской лаборатории Гуандуна) сначала собирали в асептических условиях и лизировали буфером для лизиса эритроцитов на льду в течение 5 минут. Лизис завершали полной средой DMEM (содержащей 10% FBS), лизат центрифугировали при 1000 об/мин и дважды промывали. Осадок клеток ресуспендировали в 10 мл полной среды DMEM и добавляли M-CSF в рабочей концентрации 100 нг/мл. Клетки культивировали в течение 7 дней при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в камере для культивирования клеток для индукции. Половину среды заменяли и добавляли M-CSF на 3-й и 5-й день. Индукция клеток завершалась на 7-й день. Клетки расщепляли 0,25% трипсином. Собирали макрофаги и центрифугировали при 750×g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, клетки суспендировали в полной среде DMEM (содержащей 10% FBS) и подсчитывали. Клетки доводили до нужной плотности и помещали в 96-луночный планшет для дальнейшего использования.

Клетки CHO-K1-PD1 собирали обычными методами, центрифугировали при 170×g в течение 5 мин, ресуспендировали, подсчитывали, анализировали на жизнеспособность и один раз промывали PBS. Сукцинимидиловый эфир диацетата карбоксифлуоресцеина (CFSE) разбавляли до 2,5 мкМ PBS для ресуспендирования клеток (плотность окрашивания: 10 миллионов клеток/мл). Необходимое количество клеток инкубировали в клеточном инкубаторе в течение 20 мин. 6 мл полной среды DMEM (содержащей 10% FBS), чтобы остановить окрашивание. Клетки центрифугировали при 170×g в течение 5 мин, супернатант отбрасывали. Добавляли 1 мл полной среды DMEM и инкубировали клетки в термостате в течение 10 мин. Антитела разбавляли полной средой DMEM до 20 мкг/мл, 2

мкг/мл и 0,2 мкг/мл (с рабочими концентрациями 10 мкг/мл, 1 мкг/мл и 0,1 мкг/мл) и конструировали изотипические контрольные антитела hIgG1DM и hIgG4. Свежие индуцированные зрелые макрофаги собирали и центрифугировали при 750×g в течение 5 минут, а супернатант отбрасывали. Клетки подсчитывали, переносили в 96-луночный планшет и центрифугировали при 1000×g в течение 5 мин, супернатант отбрасывали. Плотность клеток CHO-K1-PD1-CFSE регулировали. Согласно схеме разведенные антитела и клетки-мишени вносили в лунки 96-луночного планшета с макрофагами в соотношении 50 мкл:50 мкл, ресуспендировали, хорошо перемешивали и инкубировали в термостате при 37 °C в течение 2 час В каждую лунку добавляли по 150 мкл 1% PBSA при комнатной температуре. Смесь центрифугировали в течение 5 мин при 1000×g и отбрасывали супернатант. Клетки однократно промывали 200 мкл PBSA. APC-меченное человеческое антитело против мышинового CD11b (500-кратно разведенное PBSA) добавляли к соответствующим образцам в количестве 100 мкл/образец, смесь хорошо перемешивали и инкубировали на льду в течение 40 минут. В каждую лунку добавляли по 150 мкл 1% PBSA, центрифугировали при 1000×g в течение 5 мин и супернатант отбрасывали. Каждую лунку промывали один раз 200 мкл PBSA. В каждую лунку добавляли 200 мкл 1% PBSA для ресуспендирования и загружали в проточный цитометр Beckman.

Макрофаги в системе были APC+ положительными, а макрофаги, участвующие в фагоцитозе, были дважды положительными по APC и CFSE. Скорость фагоцитоза определяли как отношение количества двойных положительных клеток к количеству APC-положительных клеток и оценивали опосредованную антителами активность ADCP. ADCP-активность каждой группы, представленная P%, рассчитывалась по следующей формуле:

$$P\% = \left( \frac{\text{Количество макрофагов, вовлеченных в фагоцитоз}}{\text{общее количество макрофагов}} \right) \times 100$$

Результаты представлены в ФИГ. 35.

Результаты показали, что ниволумаб обладает значительным ADCP-эффектом в системе макрофаг+CHO-K1-PD1; скорость фагоцитоза VP101(hG1DM) была сравнима с контрольным изотипическим антителом, что указывает на то, что VP101(hG1DM) не оказывает ADCP-эффекта. Результаты показали, что VP101(hG1DM), вероятно, обладает превосходной противоопухолевой эффективностью.

Пример 12: Исследование на животных монотерапии VP101(hG1DM) для лечения рака молочной железы

В этом исследовании изучали противоопухолевую активность VP101(hG1DM) в отношении пролиферации клеток ксенотрансплантата рака молочной железы *in vivo*. Протокол показан в Таблице 7 ниже.

В исследовании использовали самок мышей NCG с серьезным иммунодефицитом в возрасте 5 недель, приобретенных у GemPharmatech. Контрольное антитело изотипа hIgG4 было сконструировано компанией Akeso Biopharma, Inc. с использованием метода, описанного выше. РВМС были выделены и активированы компанией Akeso Biopharma, Inc. с помощью метода, описанного выше.

Собранные клетки рака молочной железы MDA-MB-231 инокулировали в подушечки молочной железы у 12 мышей в количестве 2 миллионов клеток/50 мкл/мышь. Через 30 дней после инокуляции мышей разделили по объему опухоли на 2 группы: группу отрицательного контроля и группу VP101(hG1DM). РВМС вводили в дозе 1 миллион клеток/50 мкл/мышь подкожно в тот же день, и день введения РВМС регистрировали как день 0. Обработку проводили в день 0, день 7, день 14 и день 21. Объем опухоли измеряли штангенциркулем. Размеры опухоли измеряли два раза в неделю после группировки с помощью штангенциркуля, а объем опухоли рассчитывали по формуле  $TV=0,5 \times ab^2$ , где  $a$  - наибольший диаметр опухоли,  $b$  - наименьший диаметр опухоли,  $TV$  - объем опухоли.

Таблица 7: Протокол исследования монотерапии VP101(hG1DM), эффективно ингибирующей пролиферацию клеток рака молочной железы

Группа	Количество животных	Протокол для ксенотрансплантации опухоли	Схема введения
Изотипическое контрольное Антитело	6	клетки рака молочной железы MDA-MB-231, 2 миллиона клеток/50 мкл/мышь, инокулировали в подушечки молочных желез	hIgG4, 5 мг/кг, вводили внутривенно, Один раз в неделю по 4 дозы
VP101 (hG1DM)	6	РВМС, 1 миллион клеток/50 мкл/мышь, инокулировали подкожно	VP101(hG1DM), 5 мг/кг, вводили внутривенно, Один раз в неделю по 4 дозы

Результаты показаны на ФИГ. 36. Результаты показали, что VP101(hG1DM) может эффективно ингибировать увеличение объема клеток MDA-MB-231 рака молочной железы, проявляя хорошую противоопухолевую эффективность, особенно эффективность против рака молочной железы, по сравнению с контрольным изотипическим антителом.

Пример 13: Изучение комбинированной терапии PARPi и VP101(hG1DM) для ингибирования клеток рака яичника

Клетки рака яичника SNU-251 (Otwo Biotech, Cat. №: НТХ2700С) в логарифмической фазе роста готовили в виде суспензии одиночных клеток путем расщепления трипсином. Клетки подсчитывали, доводили до надлежащей плотности клеток, высевали в 6-луночные планшеты по  $2 \times 10^5$  на лунку и инкубировали в среде RPMI 1640 (Gibco, Cat. №: 22400-089) при 37°C в течение 24 часов.

После роста клеток до 60-70% клетки делили для введения на группы, включая группы контроля и обработки, и инкубировали в течение 24 ч в инкубаторе при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>.

Камеры Transwell помещали в 24-луночный планшет, в верхнюю камеру добавляли 100 мкл среды RPMI 1640 и смесь уравнивали в течение 1 ч в инкубаторе. Клетки в 6-

луночных планшетах расщепляли с использованием трипсина и получали суспензию одиночных клеток с использованием бессывороточной культуральной среды. Клетки подсчитывали и плотность клеток доводили до  $4 \times 10^4$  клеток/100 мкл. Клетки высевали в верхнюю камеру, а в нижнюю добавляли 600 мкл культуральной среды RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки. Планшеты инкубировали в инкубаторе при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов.

После инкубации камеры Transwell извлекали и удаляли культуральную среду. Клетки нижней камеры иммобилизовали в PBS в течение 2 мин и иммобилизовали в 4% параформальдегиде в течение 20 мин. Камеры дважды промывали PBS.

Клетки в нижней камере окрашивали 500 мкл 0,1%-ного красителя кристаллического фиолетового в течение 15 мин. Остаточный краситель смывали PBS. Клетки в верхней камере осторожно стирали ватным тампоном. Камеры помещали на предметное стекло и под микроскопом выбирали 3 поля зрения для наблюдения за перемещением клеток в нижнюю камеру и их фотографированием. Количество клеток рассчитывали с использованием программного обеспечения ImgeJ, а миграцию клеток рассчитывали по формуле.

Результаты показаны на ФИГ. 37. Результаты показали, что по сравнению с монотерапией олапарибом или монотерапией VP101(hG1DM) в той же концентрации комбинированная терапия ингибитором PARP олапарибом и VP101(hG1DM) значительно повышает эффективность ингибирования миграции клеток рака яичника.

Пример 14: Исследование на животных комбинированной терапии PARPi и VP101(hG1DM) для лечения рака молочной железы

Для тестирования противоопухолевой активности *in vivo* ингибитора PARP олапариба и бифункционального антитела против PD-1/против VEGFA VP101(hG1DM) в комбинированной терапии клетки MDA-MB-231 (клетки рака молочной железы человека, приобретенные в ATCC) подкожно трансплантировали мышам NCG в возрасте 5-7 недель (приобретены у GemPharmatech). Через 23 дня после трансплантации мышей случайным образом разделили на 4 группы по 6 животных в зависимости от объема опухоли. День распределения по группам был определен как D0, и введение дозы олапариба начинали в день D0. На D2 внутрибрюшинно вводили 4 миллиона активированных PBMC и начинали обработку VP101(hG1DM). Схема обработки группы комбинированной терапии следующая: лекарственные средства изготавливались отдельно и вводились последовательно (не требовалось определенного порядка или временного интервала, одну обработку следовало проводить после завершения введения другой). Моделирование и конкретная схема показаны в Таблице 8. После введения измеряли длину и ширину опухолей в каждой группе и рассчитывали объем опухоли.

Таблица 8. Схема дозирования ингибитора PARP олапариба и бифункционального антитела против PD-1/против VEGFA для лечения ксенотрансплантатной опухоли MDA-MB-231 на модели мышей NCG

Порядковый номер	Группа	Количество животных	Моделирование	Схема
1	Модельная Группа	6	Каждой мыши подкожно трансплантировал и 8 миллионов	hIgG1DM, 2.25 мг/кг, вводили в хвостовую вену, раз в неделю по 4 дозы 10% гидроксипропил-β-циклодекстрин, вводили внутривенно каждый день в течение 23 дней
2	VP101(hG1DM)	6	клеток MDA-MB-231 и	VP101(hG1DM), 3 мг/кг, Вводили в хвостовую вену, один раз в неделю по 4 дозы
3	Олапариб	6	вводили 4 миллиона CD3-активированных	Олапариб, 50 мг/кг, вводили внутривенно каждый день в течение 23 дней
4	VP101(hG1DM) + Олапариб	6	PBMC через 25 дней после трансплантации.	VP101(hG1DM), 3 мг/кг, Вводили в хвостовую вену, один раз в неделю по 4 дозы Олапариб, 50 мг/кг, вводили внутривенно каждый день в течение 23 дней

Результаты показаны на ФИГ. 38. Результаты показали, что комбинированная терапия VP101(hG1DM) и ингибитором PARP олапарибом проявляет синергетический противоопухолевый эффект в модели рака молочной железы у мышей по сравнению с группой монотерапии олапарибом и группой монотерапии VP101(hG1DM), а комбинация обладает превосходным ингибированием опухоли в группе монотерапии.

Кроме того, как показано на ФИГ. 39, как VP101(hG1DM), так и ингибитор PARP олапариб хорошо переносились мышами с опухолями, отдельно или в комбинации, и в группах не было обнаружено никакого влияния на массу тела мышей с опухолями.

Пример 15: Исследование на животных комбинированной терапии PARPi и VP101(hG1DM) для лечения рака яичника

Для тестирования противоопухолевой активности *in vivo* ингибитора PARP олапариба и бифункционального антитела против PD-1/против VEGFA VP101(hG1DM) комбинированной терапии клетки рака яичника человека SK-OV-3 (приобретенные у ATCC) были трансплантированы подкожно мышам NCG в возрасте 5-7 недель

(приобретенным у GemPharmatech). Через 39 дней после трансплантации мышам внутрибрюшинно вводили 3 млн активированных РВМС и случайным образом разделяли на 4 группы по 6 животных в зависимости от объема опухоли. День распределения по группам определяли как D0, и введение дозы начинали в день D0. Схема обработки группы комбинированной терапии следующая: лекарственные средства изготавливались отдельно и вводились последовательно (не требовалось определенного порядка или временного интервала, одну обработку следовало проводить после завершения введения другой). Моделирование и конкретная схема показаны в Таблице 9. После введения измеряли длину и ширину опухолей в каждой группе и рассчитывали объем опухоли.

Таблица 9. Схема дозирования ингибитора PARP олапариба и бифункционального антитела против PD-1/против VEGFA для лечения ксенотрансплантатной опухоли SK-OV-3 на модели мышей NCG

Порядковый номер	Группа	Количество животных	Моделирование	Схема
1	Изотипический контроль	6	Каждой мышке подкожно	hIgG1DM, 10 мг/кг, Вводили в хвостовую вену, один раз в неделю по 3 дозы (первую дозу давали одновременно с РВМС внутрибрюшинно)
2	VP101(hG1DM)	6	трансплантировал и 5 миллионов клеток SK-OV-3, и внутрибрюшинно инъецировали с	VP101(hG1DM), 14 мг/кг, Вводили в хвостовую вену, один раз в неделю по 3 дозы (первую дозу вводили одновременно с РВМС внутрибрюшинно)
3	Олапариб	6	использованием 3 миллионов CD3-активированных РВМС через 39 дней после	Олапариб, 100 мг/кг, внутривенно вводили каждый день по 20 доз (первую дозу вводили только внутрибрюшинно)
4	VP101(hG1DM) + Олапариб	6	трансплантации	VP101(hG1DM), 14 мг/кг, Вводили в хвостовую вену, один раз в неделю по 3 дозы (первую дозу вводили

				одновременно с РВМС внутрибрюшинно) Олапариб, 100 мг/кг, внутривенно вводили каждый день по 20 доз
--	--	--	--	--

Результаты показаны на ФИГ. 40. Результаты показали, что комбинированная терапия VP101(hG1DM) и ингибитором PARP олапарибом проявляет синергетический противоопухолевый эффект в модели рака яичника у мышей по сравнению с группой монотерапии олапарибом и группой монотерапии VP101(hG1DM), а комбинация обладает превосходным ингибированием опухоли в отношении групп монотерапии.

Кроме того, как показано на ФИГ. 41, как VP101(hG1DM), так и ингибитор PARP олапариб хорошо переносится мышами с опухолями, отдельно или в комбинации, и в группах не было обнаружено никакого влияния на массу тела мышей с опухолями.

Хотя были подробно описаны конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, специалисты в данной области техники должны понимать, что в эти детали могут быть внесены различные модификации и замены в соответствии со всеми раскрытыми идеями, и все эти изменения должны попадать в объем правовой охраны настоящего изобретения. Полный объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения и любым ее эквивалентом.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Терапевтическая комбинация, содержащая по меньшей мере одно биспецифическое антитело и по меньшей мере один ингибитор PARP,

где биспецифическое антитело содержит:

первую функциональную область белка, нацеленную на PD-1, и

вторую функциональную область белка, нацеленную на VEGFA;

где:

первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело; где иммуноглобулин содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34-36, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 37-39, соответственно; одноцепочечное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28-30, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 31-33, соответственно;

или,

первая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело, а вторая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин; где иммуноглобулин содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28-30, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 31-33, соответственно; одноцепочечное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34-36, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 37-39, соответственно;

иммуноглобулин относится к подтипу IgG1 человека;

в соответствии с системой нумерации EU иммуноглобулин содержит константную область тяжелой цепи, имеющую мутации в любых 2 или 3 из положений 234, 235 и 237, а константа аффинности биспецифического антитела для FcγRIIIa и/или C1q снижается после мутации по сравнению с тем, что было до мутации; предпочтительно константу аффинности измеряют с помощью системы Fortebio Octet.

2. Терапевтическая комбинация по п. 1, где в соответствии с системой нумерации EU константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет следующие мутации:

L234A и L235A; или

L234A и G237A; или

L235A и G237A;

или

L234A, L235A и G237A.

3. Терапевтическая комбинация, содержащая по меньшей мере одно биспецифическое антитело и по меньшей мере один ингибитор PARP,

где биспецифическое антитело содержит:

первую функциональную область белка, нацеленную на PD-1, и

вторую функциональную область белка, нацеленную на VEGFA;

где:

первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело; где иммуноглобулин содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34-36, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 37-39, соответственно; одноцепочечное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28-30, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 31-33, соответственно;

или,

первая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело, а вторая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин; где иммуноглобулин содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28-30, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 31-33, соответственно; одноцепочечное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34-36, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 37-39, соответственно;

иммуноглобулин относится к подтипу IgG1 человека;

в соответствии с системой нумерации EU иммуноглобулин содержит константную область тяжелой цепи, имеющую следующие мутации:

L234A и L235A; или

L234A и G237A; или

L235A и G237A; или

L234A, L235A и G237A.

4. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-3, где в соответствии с системой нумерации EU константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет одну или более мутаций, выбранных из:

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.

5. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-4, где

вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, а вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 9, а вариабельная область легкой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 17;

или,

вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 9, а вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 17; вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, а вариабельная область легкой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

6. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-5, где терапевтическая комбинация выбрана из любого из следующих (1)-(12):

(1)

вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, а вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, а вариабельная область легкой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7;

(2)

вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, а вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, а вариабельная область легкой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11;

(3)

вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, а вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, а вариабельная область легкой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную



цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, а переменная область легкой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;

(10)

переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, а переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, а переменная область легкой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;

(11)

переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, а переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, а переменная область легкой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

(12)

переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, а переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, а переменная область легкой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

7. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-6, где

иммуноглобулин содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

8. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-7, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с FcγRI с константой аффинности менее примерно  $10^{-6}$  М, например менее примерно  $10^{-7}$  М,  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М или менее; предпочтительно константу аффинности измеряют с помощью системы Fortebio Octet.

9. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-8, где биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с C1q с константой аффинности менее примерно  $10^{-9}$  М, например менее примерно  $10^{-7}$  М,  $10^{-8}$  М,  $10^{-9}$  М или менее; предпочтительно константу аффинности измеряют с помощью системы Fortebio Octet.

10. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-9, где первая функциональная область белка связана со второй функциональной областью белка либо непосредственно,

либо через линкерный фрагмент; и/или переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с переменной областью легкой цепи одноцепочечного антитела либо непосредственно, либо через линкерный фрагмент.

11. Терапевтическая комбинация по п. 10, где линкерный фрагмент представляет собой (GGGS)<sub>n</sub>; n представляет собой положительное целое число, и предпочтительно n равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

12. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-11, где количество первой функциональной области белка и второй функциональной области белка, каждое независимо, составляет 1, 2 или более.

13. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-12, где одноцепочечное антитело связано с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где константная область тяжелой цепи иммуноглобулина выбрана из константной области тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, и иммуноглобулин содержит константную область легкой цепи, выбранную из константной области легкой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека;

предпочтительно константная область тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig человека или С-область цепи гамма-4 Ig человека, а константная область легкой цепи иммуноглобулина представляет собой С-область каппа-цепи Ig человека;

предпочтительно константная область тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig человека, № ДОСТУПА: P01857; константная область легкой цепи иммуноглобулина представляет собой С-область каппа-цепи Ig человека, № ДОСТУПА: P01834; или

предпочтительно константная область тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой С-область цепи гамма-4 Ig человека, № ДОСТУПА: P01861.1; константная область легкой цепи иммуноглобулина представляет собой С-область каппа-цепи Ig человека, № ДОСТУПА: P01834.

15. Терапевтическая комбинация, содержащая по меньшей мере одно биспецифическое антитело и по меньшей мере один ингибитор PARP,

где биспецифическое антитело содержит:

первую функциональную область белка, нацеленную на PD-1, и

вторую функциональную область белка, нацеленную на VEGFA;

количество первой функциональной области белка равно 1, а количество второй функциональной области белка равно 2;

где первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело;

иммуноглобулин содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;

одноцепочечное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; или

одноцепочечное антитело связано с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина;

первая функциональная область белка связана со второй функциональной областью белка через первый линкерный фрагмент; переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с переменной областью легкой цепи одноцепочечного антитела через второй линкерный фрагмент; первый линкерный фрагмент и второй линкерный фрагмент идентичны или различны;

предпочтительно аминокислотные последовательности первого линкерного фрагмента и второго линкерного фрагмента независимо выбраны из SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19;

предпочтительно аминокислотные последовательности первого линкерного фрагмента и второго линкерного фрагмента представлены в SEQ ID NO: 18.

16. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-15, где ингибитор PARP выбран из одного или более из олапариба, рупариба, нирапариба, талазопариба, флузопариба, велипариба ER, АВТ-472, АВТ-767, стенопариба, АСТ-6828, АГ-РД, АНГ-2864, АНГ-3038, АНГ-3186, АЗД-5305, АЗ-0108, АЗД-2461, АМХИ-5001, АМХИ-2001, АМХИ-3001, АМХИ-7001, АМХИ-9001, памипариба, ЗУТР-1, СК-102, ХЗ-120312, УНР-743, иобенгуана I 131, рупариб камзилата, СVЛ-218, СРН-101, СРН-102, СВХ-11, СВХ-15, миноциклина, DB-207, DPS -102, Е-7016, иобенгуана I 131, МК-2512, НСХ-014, НВН-340, IХХ-1197, IХХ-1197, сенепариба, IМР-04100, IМР-04111, IМР-04149, IМР-04249, IМР-04307, IМР-04356, JPI-289, JPI-547, JPI-283, флузопариба, GT-1620, иобенгуана I 131, DR-2313, MP-124, H-10, NT-125, BGP-15, NMSP-293, NMSP-293, NMSP-118, NMSP-648, NMSP-914, DB-207, NUV-1156, NUV-1176, JPI-289, Стенопариба, ОХ-401, NU-1025, NU-1085, PLX-376, R-554, RBN-2397, RBN-012759, PJ-34, INO-1001, WW-46, BSI-401, инипариба, SOMCL-9112, SC-10914, НТМ С-0435, SRX-3128, TSL-1502, PJ-34, CEP-8983, СК-102, THG-009, талазопариба SR, L-2286, митопариба и WB-1340.

17. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-16, дополнительно содержащая одно или более противоопухолевых химиотерапевтических средств, где,

предпочтительно противоопухолевое химиотерапевтическое средство выбирают из ингибитора топоизомеразы II (TOP2), и предпочтительно ингибитор топоизомеразы II (TOP2) представляет собой этопозид;

предпочтительно противоопухолевое химиотерапевтическое средство выбирают из таксана, и предпочтительно таксан выбирают из паклитаксела, паклитаксела, связанного с альбумином, липосомного паклитаксела и доцетаксела;

предпочтительно противоопухолевое химиотерапевтическое средство выбирают из лекарственного средства на основе платины, предпочтительно лекарственное средство на основе платины выбирают из цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина;

предпочтительно противоопухолевое химиотерапевтическое средство выбирают из одного или более из гемцитабина, пеметрекседа и капецитабина.

18. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-17, где терапевтическая комбинация представляет собой фиксированную комбинацию, например, в форме твердой фармацевтической композиции или жидкой фармацевтической композиции; или

терапевтическая комбинация представляет собой нефиксированную комбинацию, например, биспецифическое антитело и ингибитор PARP находятся в форме фармацевтической композиции.

19. Терапевтическая комбинация по п. 18, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.

20. Продукт в виде набора, содержащий: терапевтическую комбинацию по любому из пп. 1-19 и листок-вкладыш.

21. Применение терапевтической комбинации по любому из пп. 1-19 или продукта в виде набора по п. 20 для приготовления лекарственного средства для лечения и/или предотвращения злокачественной опухоли, где,

предпочтительно злокачественная опухоль выбрана из рака яичника, рака эндометрия, рака молочной железы, рака шейки матки, рака маточной трубы, перитонеального рака, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, рака печени, рака кожи, глиомы, меланомы, лимфомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака головного мозга, рака пищевода, такого как плоскоклеточный рак пищевода, рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или рака с дефицитом системы репарации неспаренных оснований (dMMR), уротелиальной карциномы, мезотелиомы, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода, лейкоза, миеломы, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, рака костей, рака желчных путей и рака яичка;

предпочтительно опухоль представляет собой опухоль с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно опухоль представляет собой опухоль без дефицита функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией;

предпочтительно рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого;

предпочтительно немелкоклеточный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого с EGFR- и/или ALK-чувствительной мутацией;

предпочтительно немелкоклеточный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого без EGFR- и/или ALK-чувствительной мутации;

предпочтительно рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному;

предпочтительно рак почки представляет собой почечно-клеточную карциному;

предпочтительно рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак

молочной железы;

предпочтительно уротелиальная карцинома представляет собой рак мочевого пузыря;

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой первичный перитонеальный рак;

предпочтительно, рак яичника представляет собой рак яичника с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак маточной трубы представляет собой рак маточной трубы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой перитонеальный рак с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2).

22. Терапевтическая комбинация по любому из пп. 1-19 или продукт в виде набора по п. 20 для применения в лечении и/или предотвращении злокачественной опухоли, где,

предпочтительно злокачественная опухоль выбрана из рака яичника, рака эндометрия, рака молочной железы, рака шейки матки, рака маточной трубы, перитонеального рака, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, рака печени, рака кожи, глиомы, меланомы, лимфомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака головного мозга, рака пищевода, такого как плоскоклеточный рак пищевода, рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или рака с дефицитом системы репарации неспаренных оснований (dMMR), уротелиальной карциномы, мезотелиомы, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода, лейкоза, миеломы, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, рака костей, рака желчных путей и рака яичка;

предпочтительно опухоль представляет собой опухоль с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно опухоль представляет собой опухоль без дефицита функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией;

предпочтительно рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого;

предпочтительно немелкоклеточный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого с EGFR- и/или ALK-чувствительной мутацией;

предпочтительно немелкоклеточный рак легкого представляет собой

немелкоклеточный рак легкого без EGFR- и/или ALK-чувствительной мутации;

предпочтительно рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному;

предпочтительно рак почки представляет собой почечно-клеточную карциному;

предпочтительно рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы;

предпочтительно уротелиальная карцинома представляет собой рак мочевого пузыря;

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой первичный перитонеальный рак;

предпочтительно, рак яичника представляет собой рак яичника с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак маточной трубы представляет собой рак маточной трубы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой перитонеальный рак с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2).

23. Способ лечения и/или предотвращения злокачественной опухоли, включающий: введение пациенту эффективного количества терапевтической комбинации по любому из пп. 1-19 или продукта в виде набора по п. 20, где,

предпочтительно злокачественная опухоль выбрана из рака яичника, рака эндометрия, рака молочной железы, рака шейки матки, рака маточной трубы, перитонеального рака, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легкого, рака печени, рака кожи, глиомы, меланомы, лимфомы, опухоли почки, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака головного мозга, рака пищевода, такого как плоскоклеточный рак пищевода, рака с высокой микросателлитной нестабильностью (MSI-H) или рака с дефицитом системы репарации неспаренных оснований (dMMR), уротелиальной карциномы, мезотелиомы, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода, лейкоза, миеломы, рака щитовидной железы, рака головы и шеи, рака костей, рака желчных путей и рака яичка;

предпочтительно опухоль представляет собой опухоль с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно опухоль представляет собой опухоль без дефицита функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией;

предпочтительно рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого;

предпочтительно немелкоклеточный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого с EGFR- и/или ALK-чувствительной мутацией;

предпочтительно немелкоклеточный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого без EGFR- и/или ALK-чувствительной мутации;

предпочтительно рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному;

предпочтительно рак почки представляет собой почечно-клеточную карциному;

предпочтительно рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы;

предпочтительно уротелиальная карцинома представляет собой рак мочевого пузыря;

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой первичный перитонеальный рак;

предпочтительно, рак яичника представляет собой рак яичника с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак маточной трубы представляет собой рак маточной трубы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой перитонеальный рак с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2).

24. Способ по п. 23, где введение осуществляют до или после хирургической операции и/или до или после лучевой терапии.

25. Способ по любому из пп. 23-24, где

биспецифическое антитело вводят в однократной дозе 0,1-100 мг на кг массы тела, предпочтительно 5-50 мг или 5-15 мг на кг массы тела,

которую вводят один раз в 3 дня, в 4 дня, в 5 дней, в 6 дней, в 10 дней, в 1 неделю, в 2 недели или в 3 недели,

и/или

которую вводят путем внутривенной капельной инфузии или внутривенной инъекции.

26. Способ по любому из пп. 23-25, где

ингибитор PARP вводят в однократной дозе 0,1-100 мг на кг массы тела, предпочтительно 5-50 мг или 5-15 мг на кг массы тела,

которую вводят один раз в 3 дня, в 4 дня, в 5 дней, в 6 дней, в 10 дней, в 1 неделю, в

2 недели или в 3 недели,

и/или

которую вводят путем внутривенной капельной инфузии или внутривенной инъекции.

27. Применение биспецифического антитела в терапевтической комбинации по любому из пп. 1-19 для получения лекарственного средства для лечения и/или предотвращения злокачественной опухоли, где злокачественная опухоль выбрана из рака яичника, рака маточной трубы, перитонеального рака и рака молочной железы;

предпочтительно, рак яичника представляет собой рак яичника с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак маточной трубы представляет собой рак маточной трубы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой перитонеальный рак с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2).

28. Способ лечения и/или предотвращения злокачественной опухоли, включающий: введение пациенту эффективного количества биспецифического антитела в терапевтической комбинации по любому из пп. 1-19, где злокачественная опухоль выбрана из рака яичника, рака маточной трубы, перитонеального рака и рака молочной железы;

предпочтительно, рак яичника представляет собой рак яичника с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак маточной трубы представляет собой рак маточной трубы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой перитонеальный рак с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2).

29. Биспецифическое антитело в терапевтической комбинации по любому из пп. 1-19 для применения при лечении и/или предотвращении злокачественной опухоли, где злокачественная опухоль выбрана из рака яичника, рака маточной трубы, перитонеального рака и рака молочной железы;

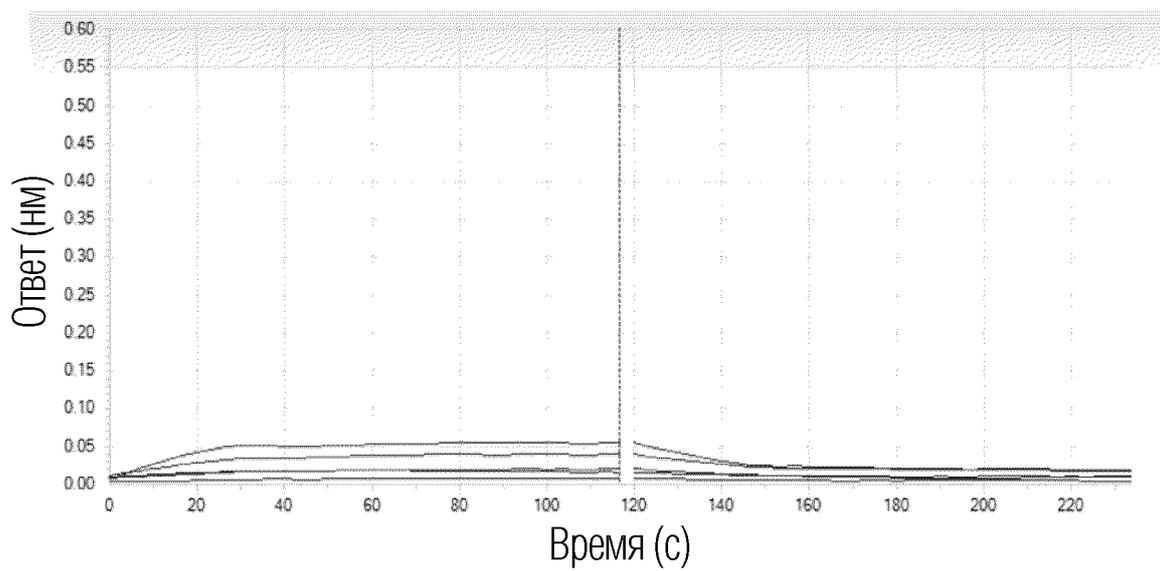
предпочтительно, рак яичника представляет собой рак яичника с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак маточной трубы представляет собой рак маточной трубы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

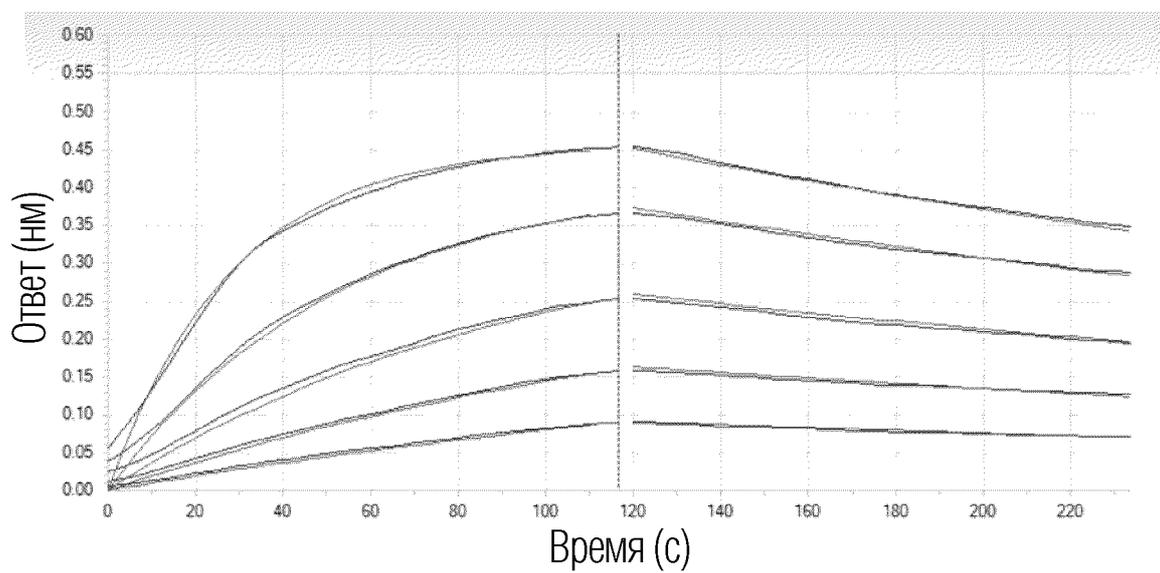
предпочтительно, перитонеальный рак представляет собой перитонеальный рак с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2);

предпочтительно, рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с дефицитом функции репарации, опосредованной гомологичной рекомбинацией (например, мутация BRCA1 и/или мутация BRCA2).

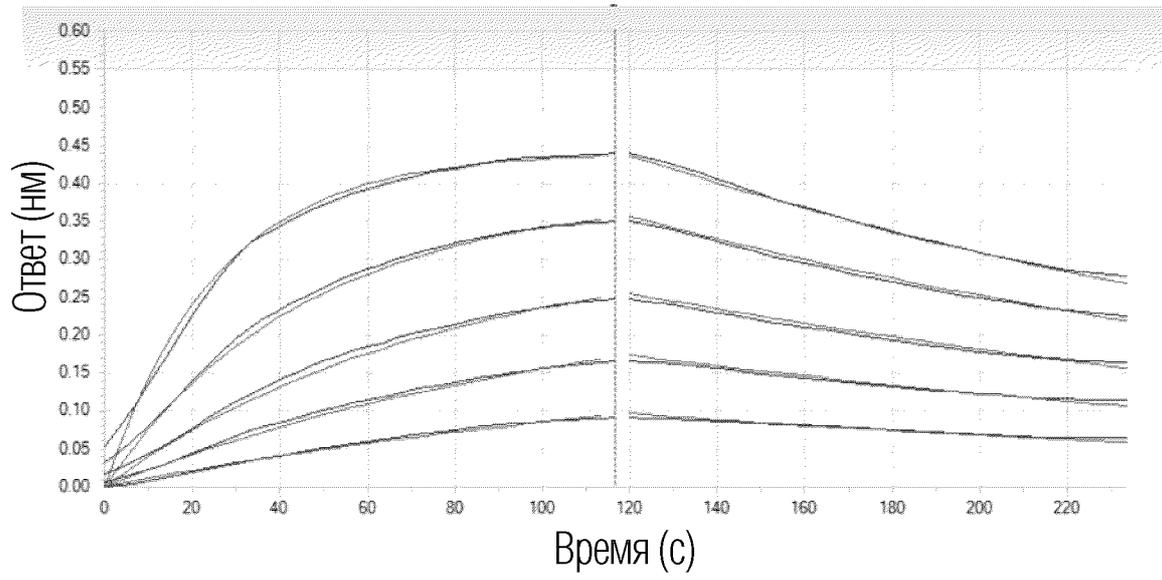
По доверенности



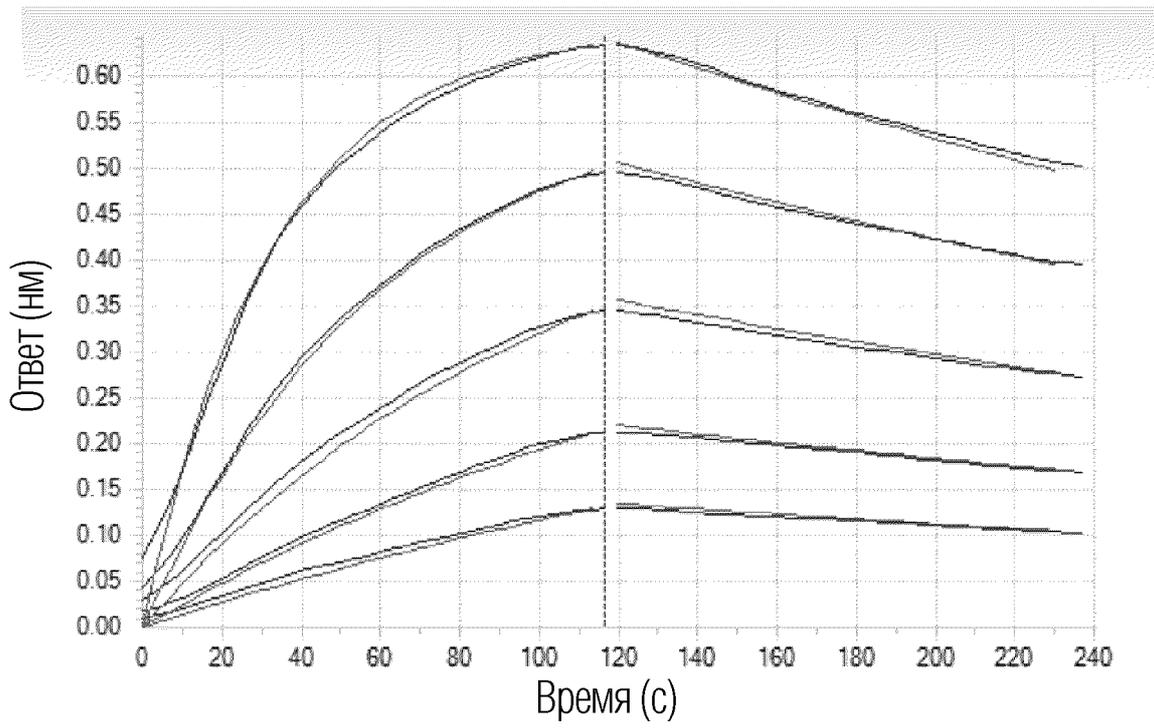
ФИГ. 1



ФИГ. 2

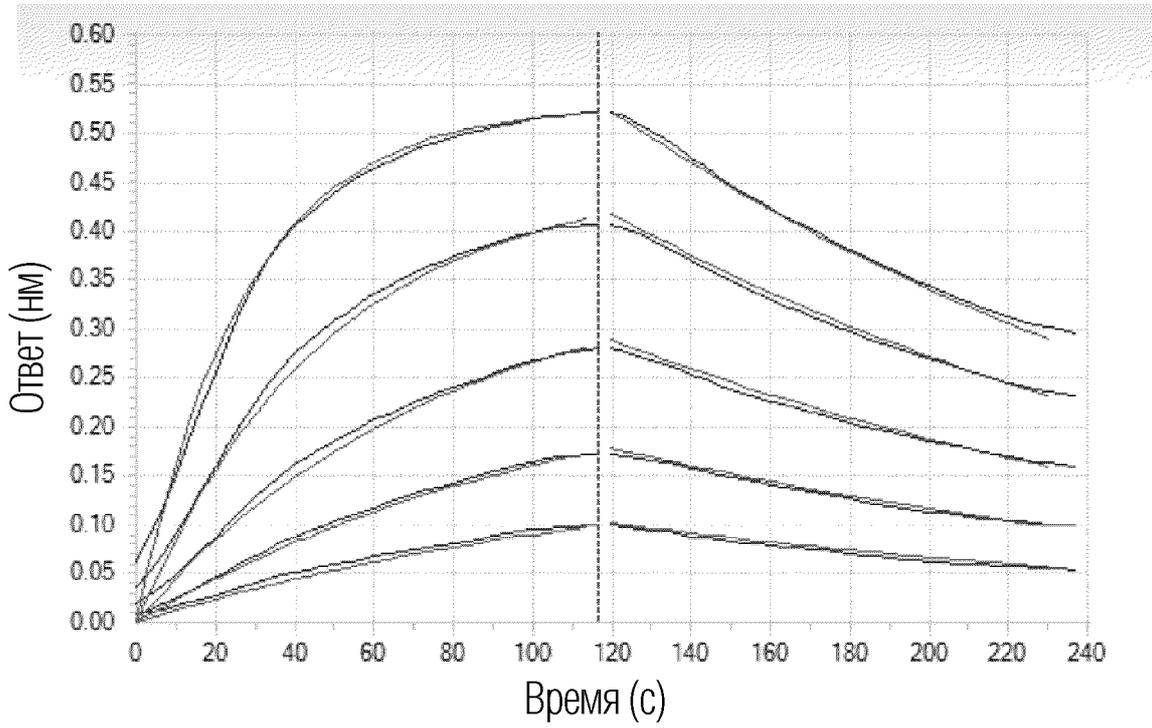


ФИГ. 3

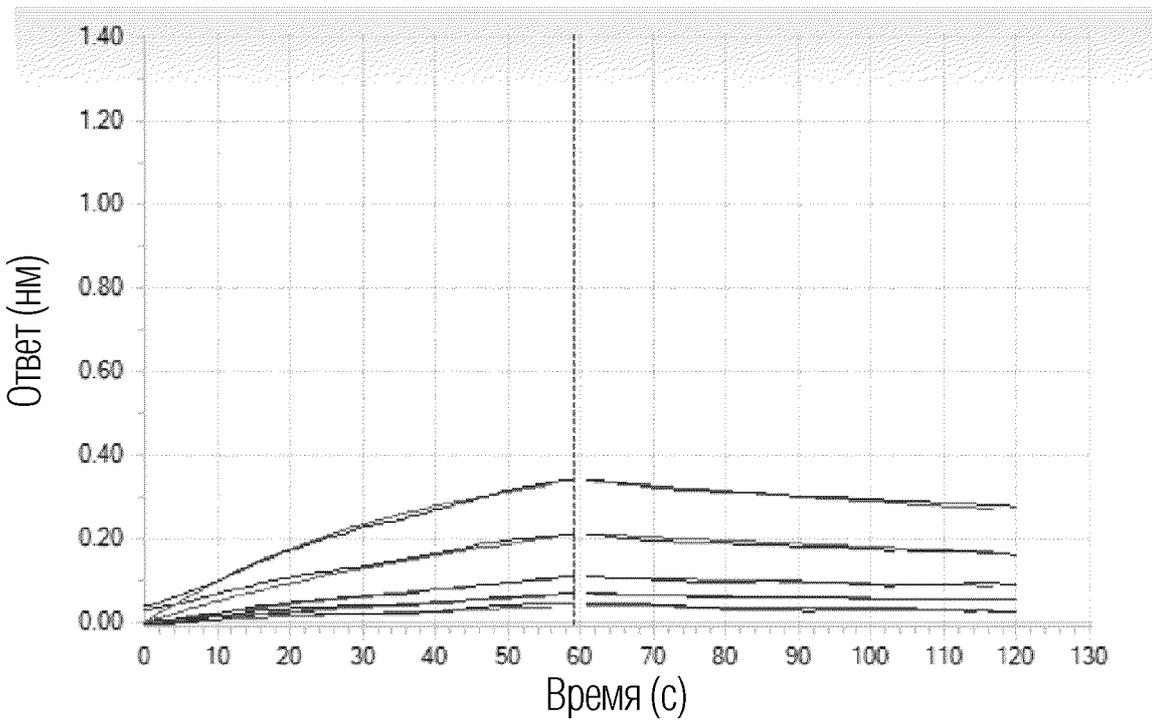


ФИГ. 4

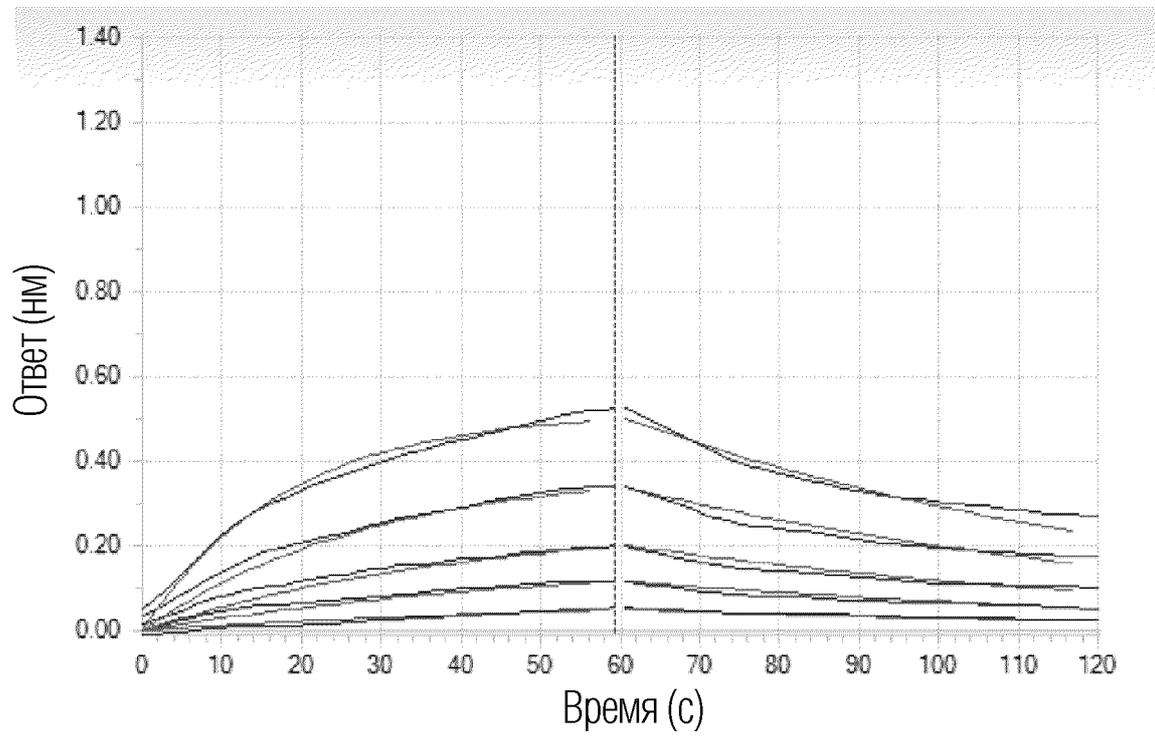
3/21



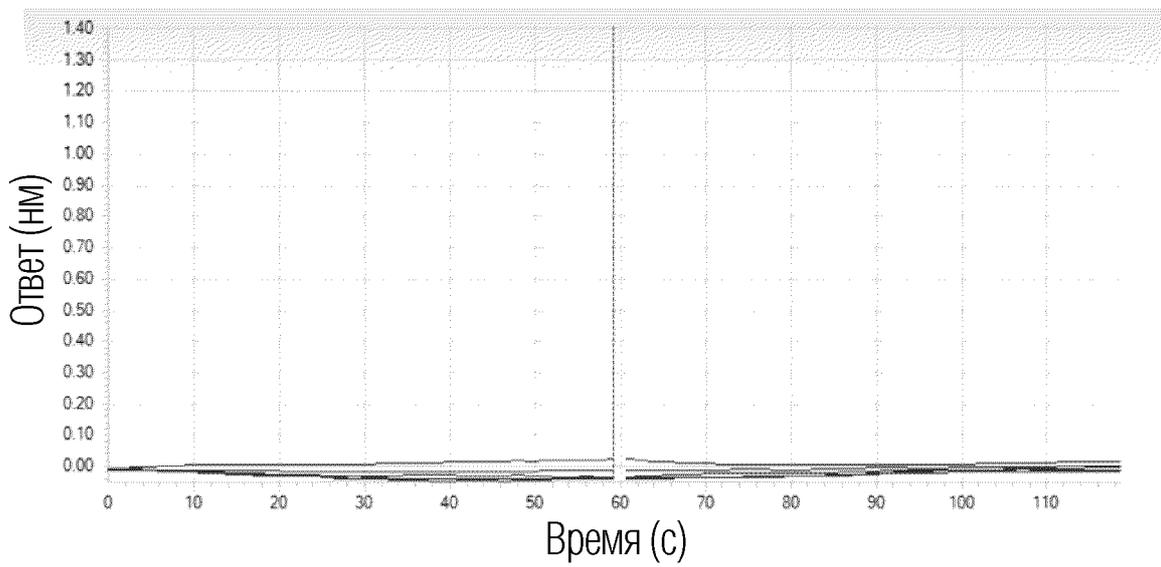
ФИГ. 5



ФИГ. 6

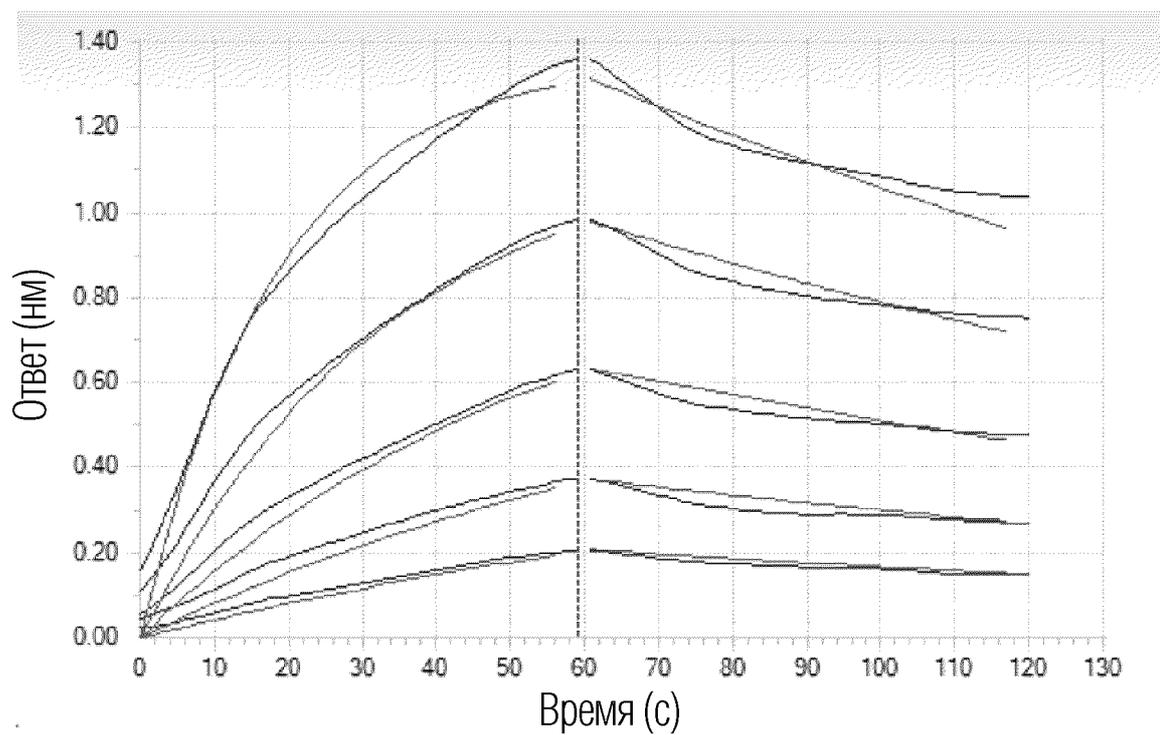


ФИГ. 7

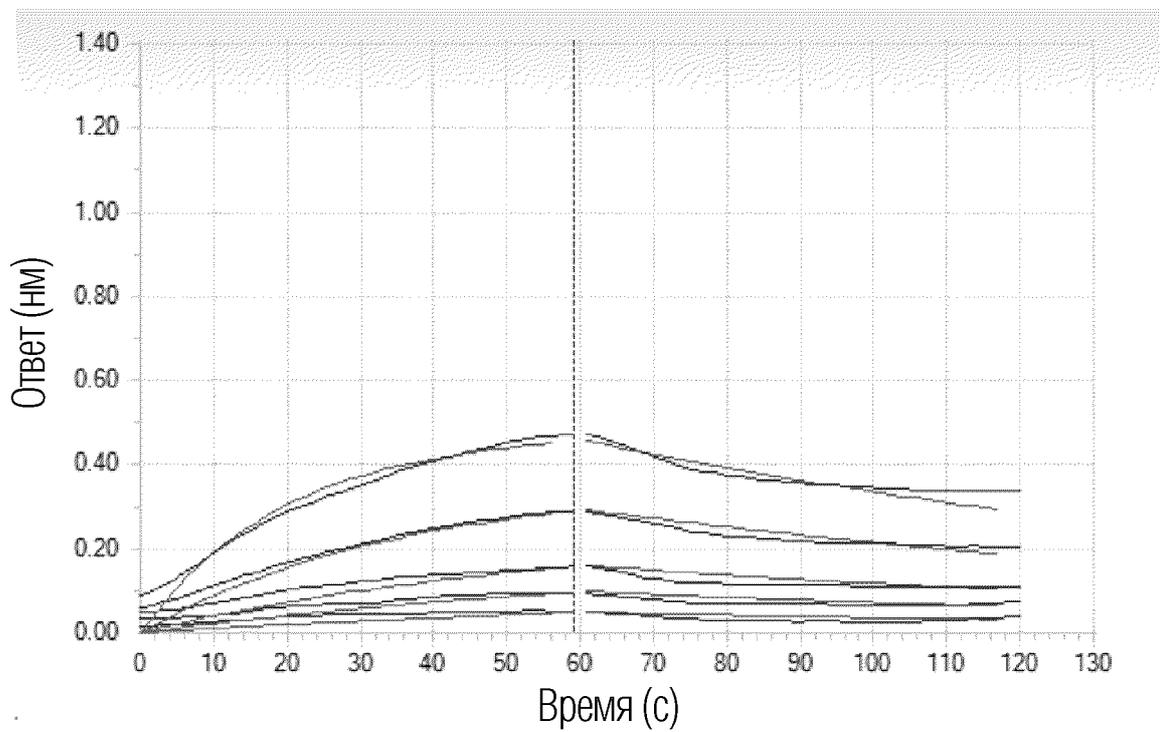


ФИГ. 8

5/21

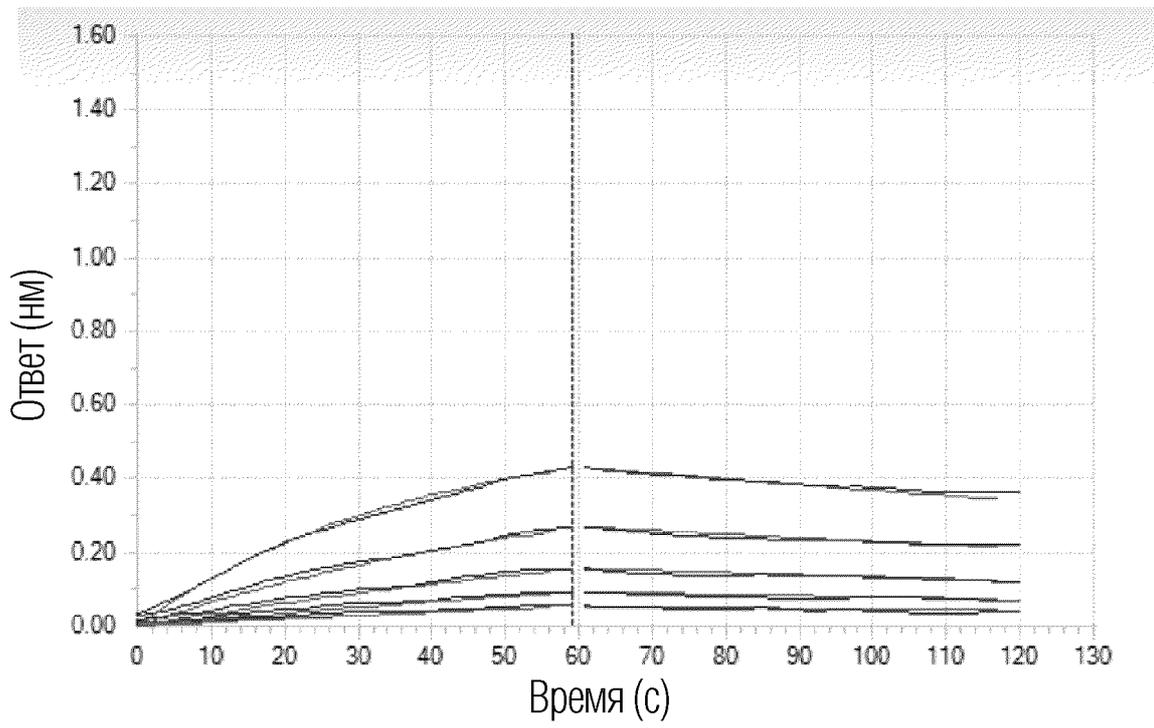


ФИГ. 9

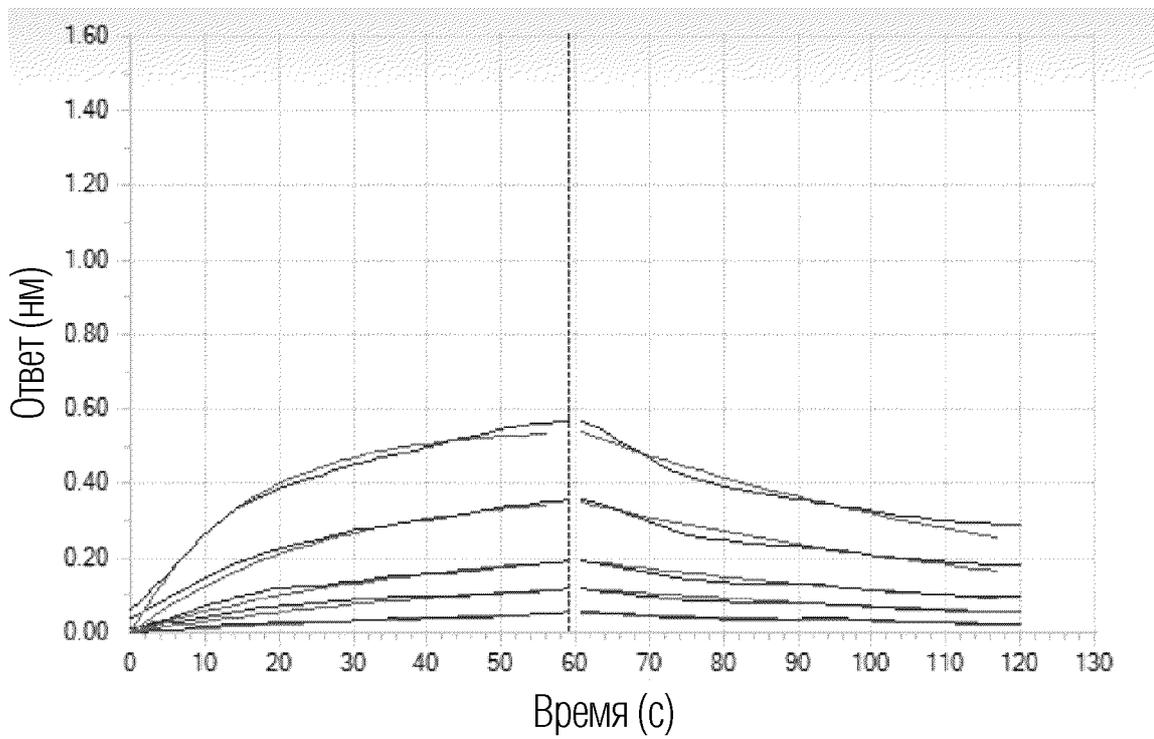


ФИГ. 10

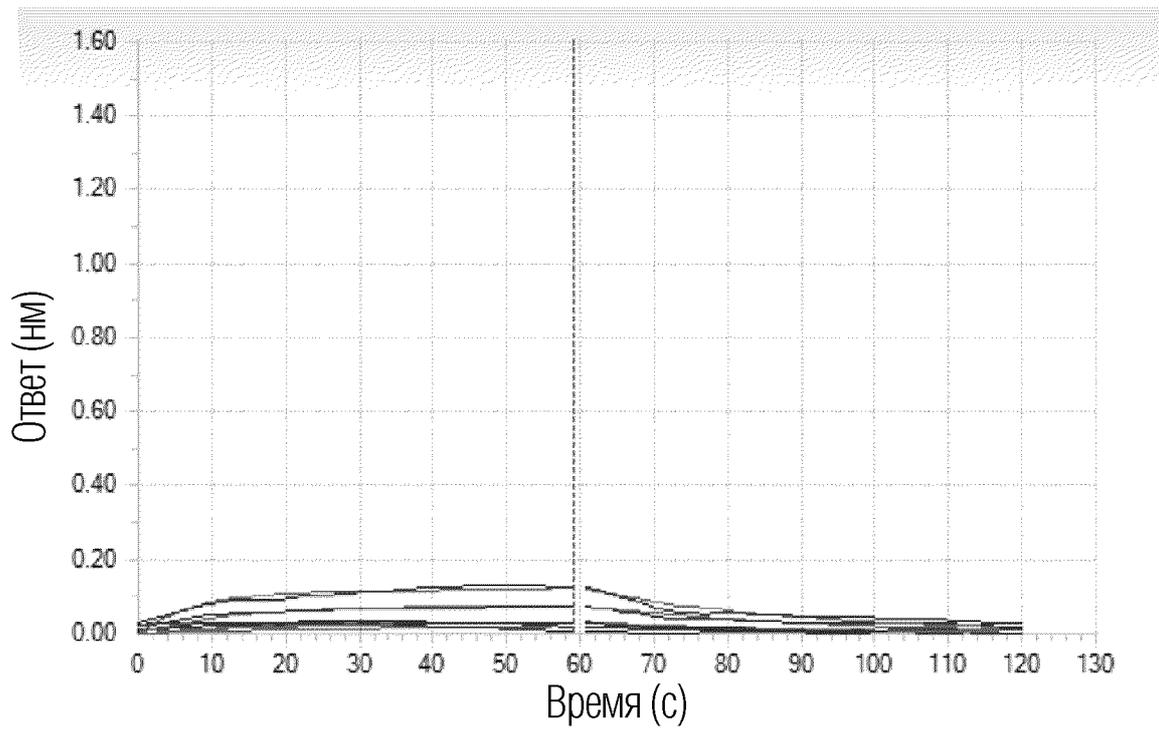
6/21



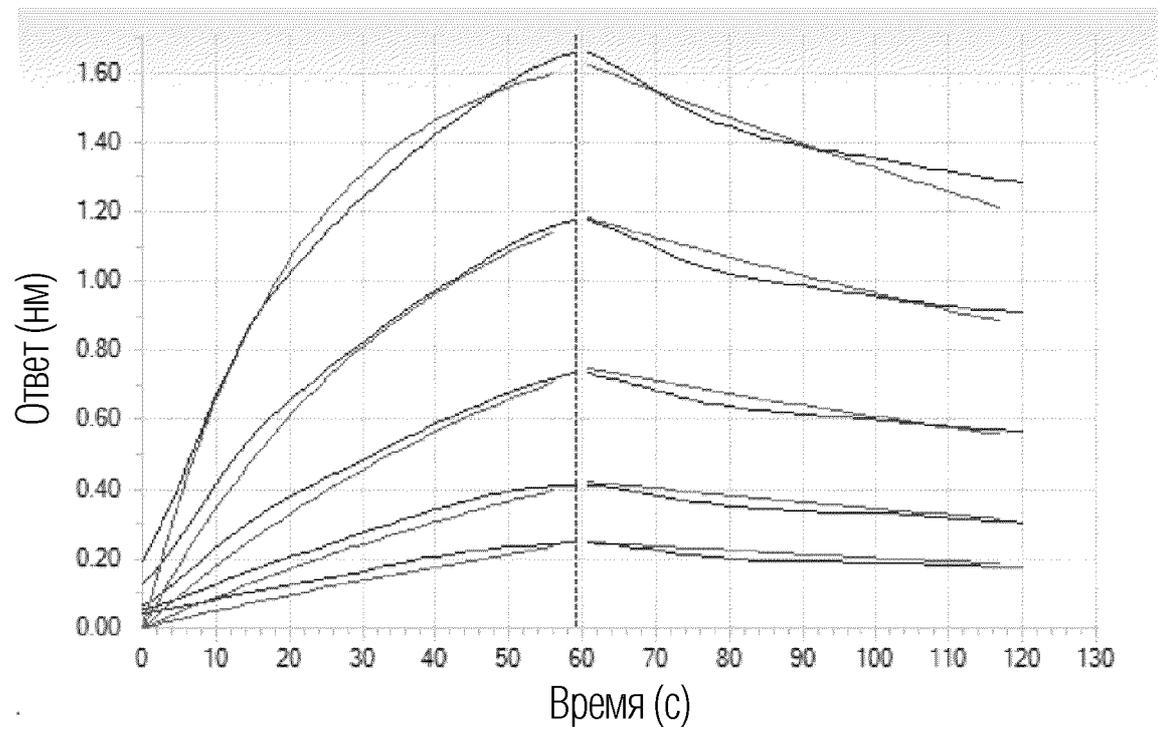
ФИГ. 11



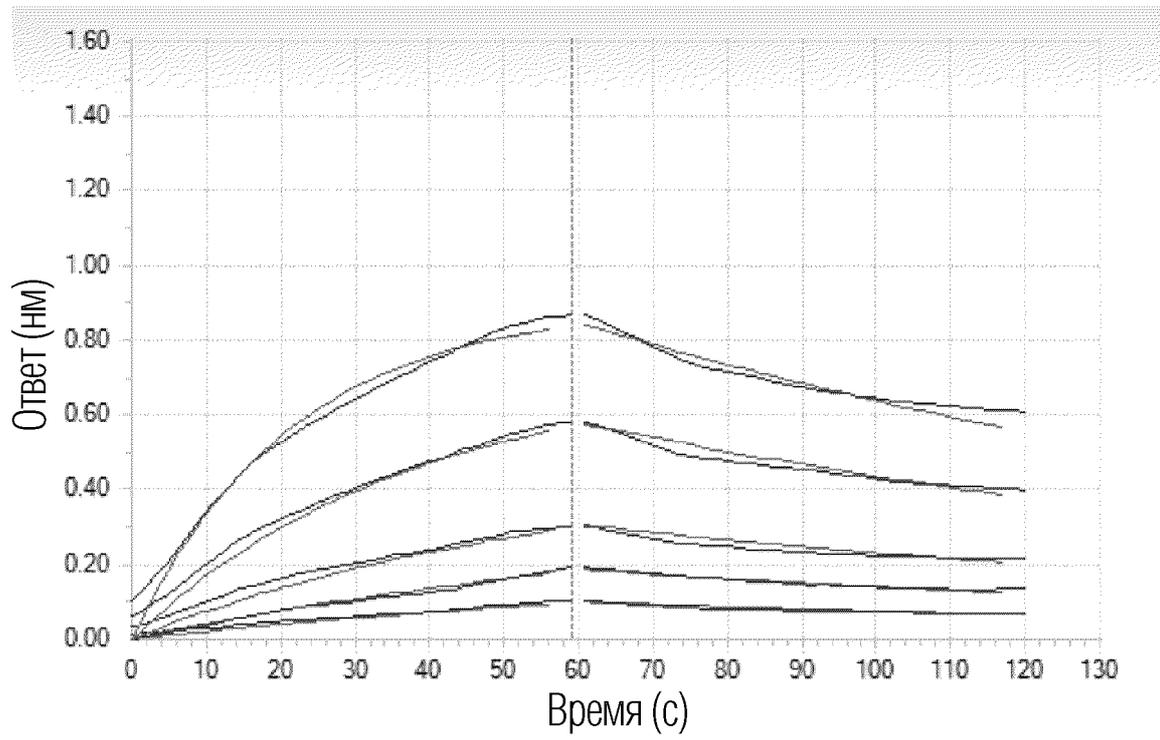
ФИГ. 12



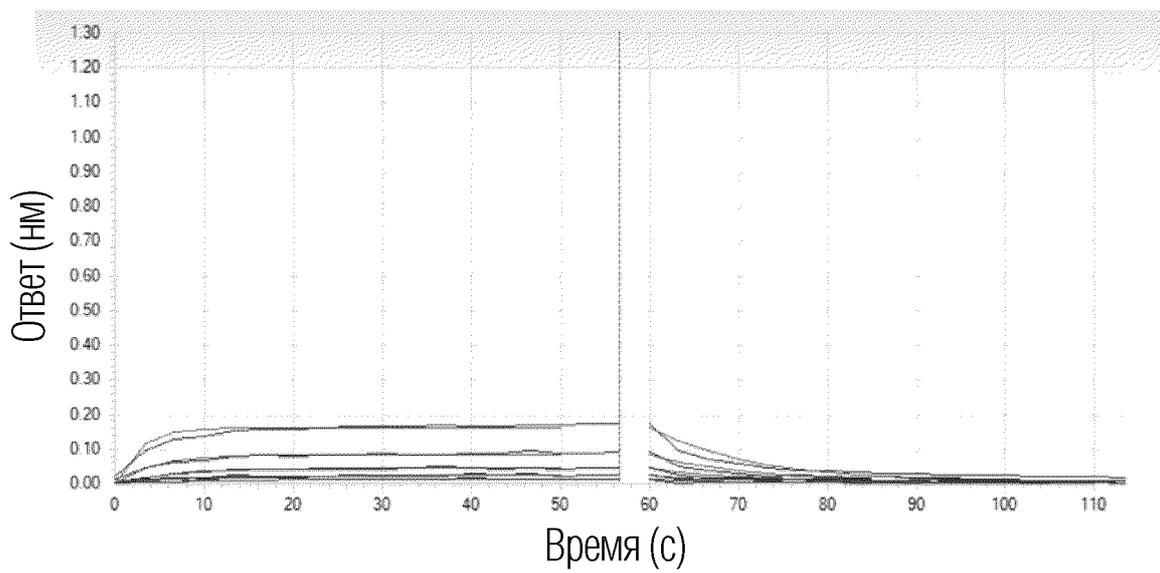
ФИГ. 13



ФИГ. 14

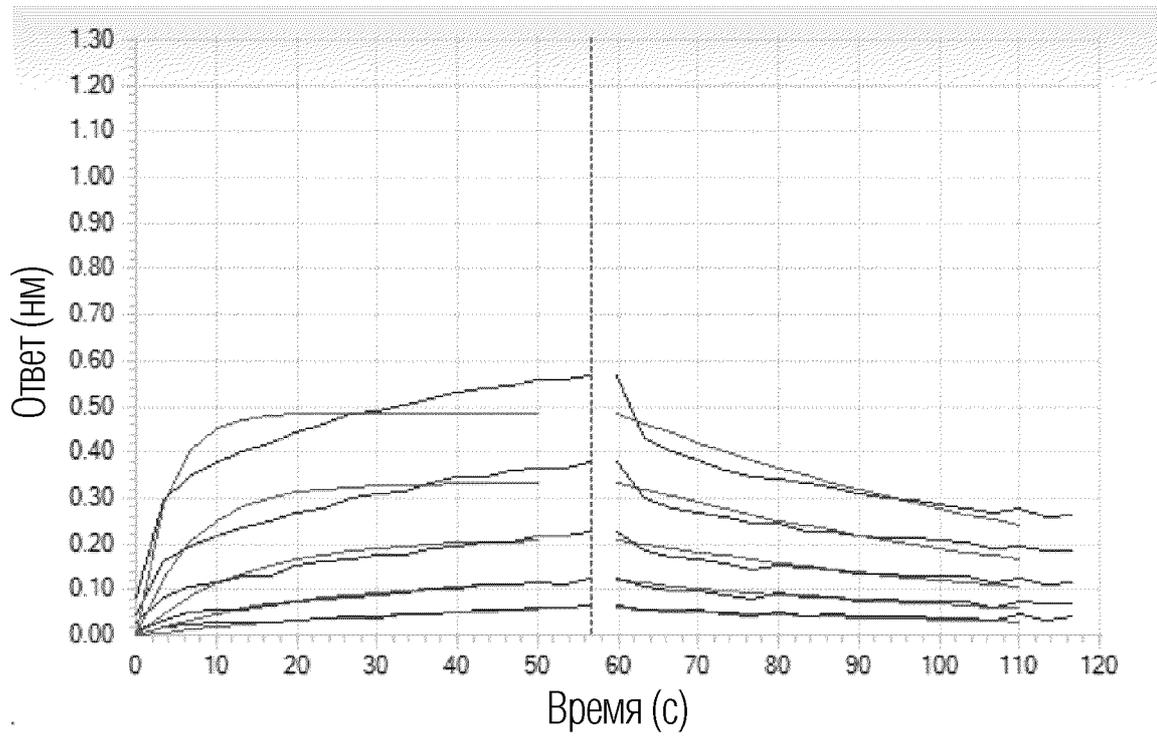


ФИГ. 15

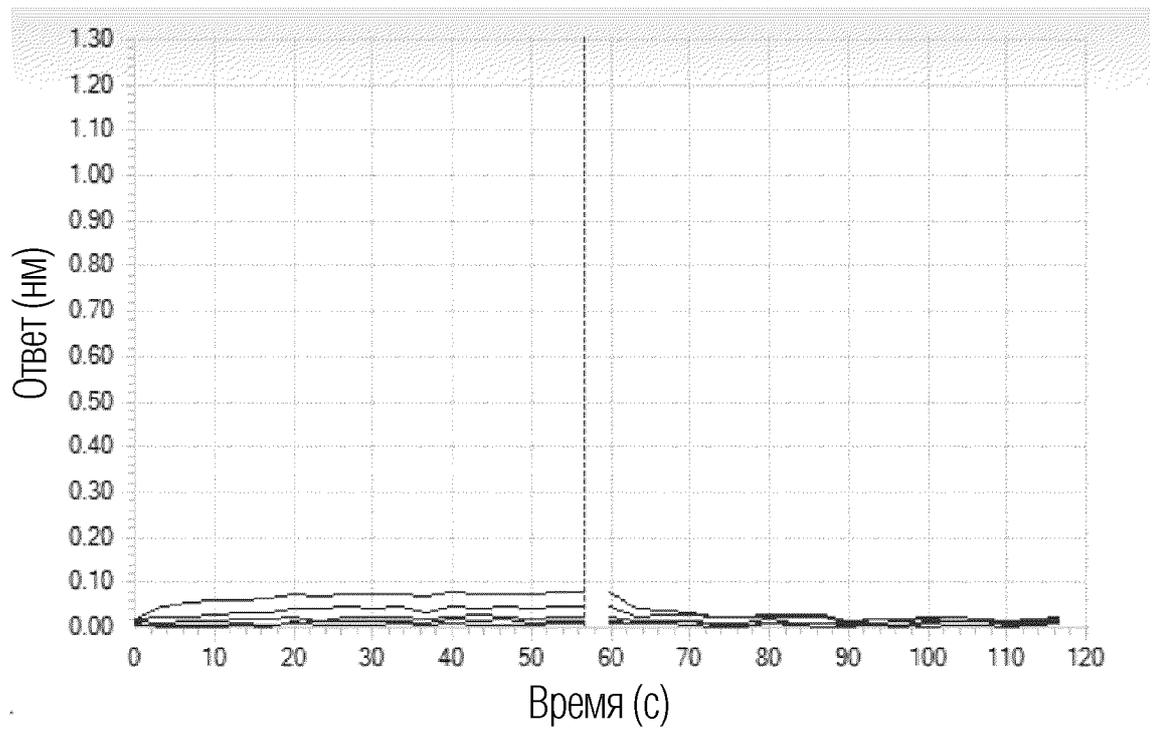


ФИГ. 16

9/21

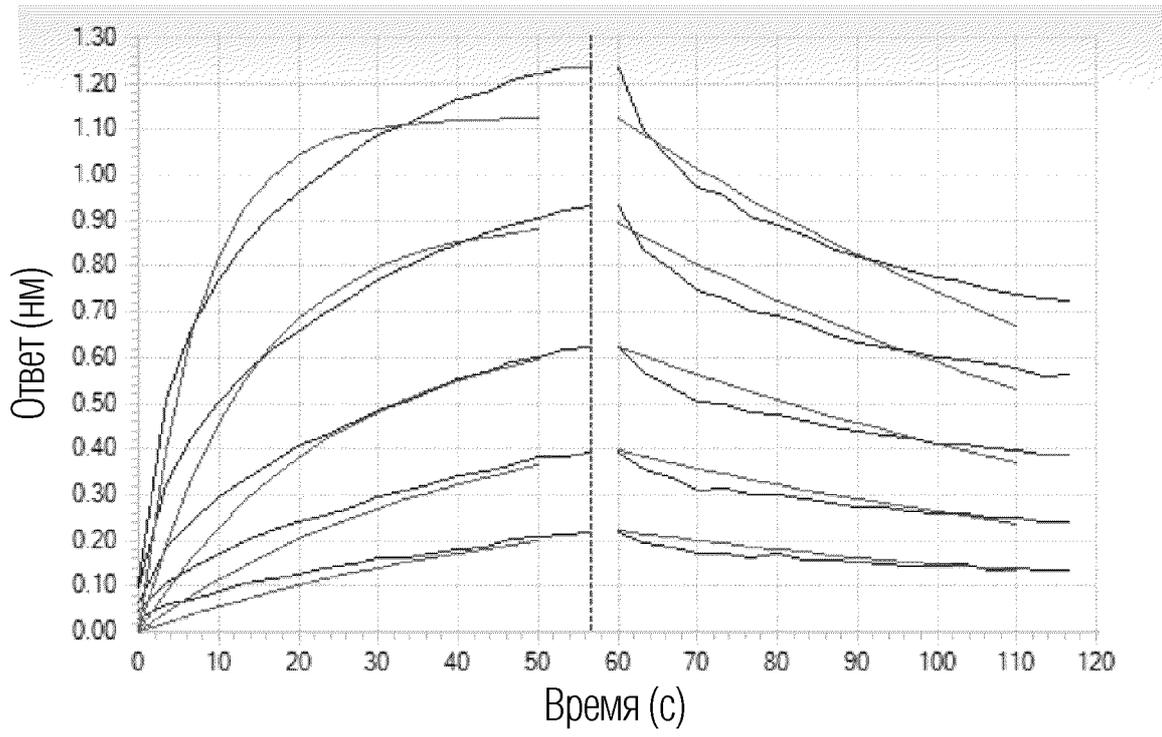


ФИГ. 17

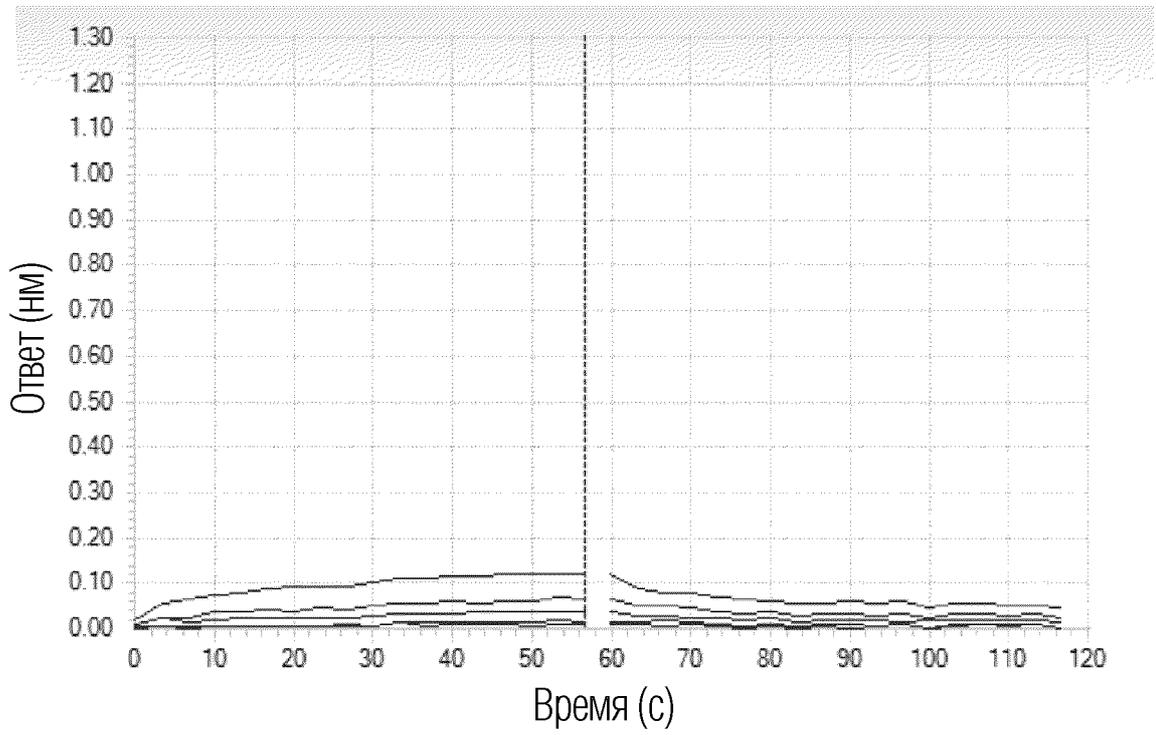


ФИГ. 18

10/21

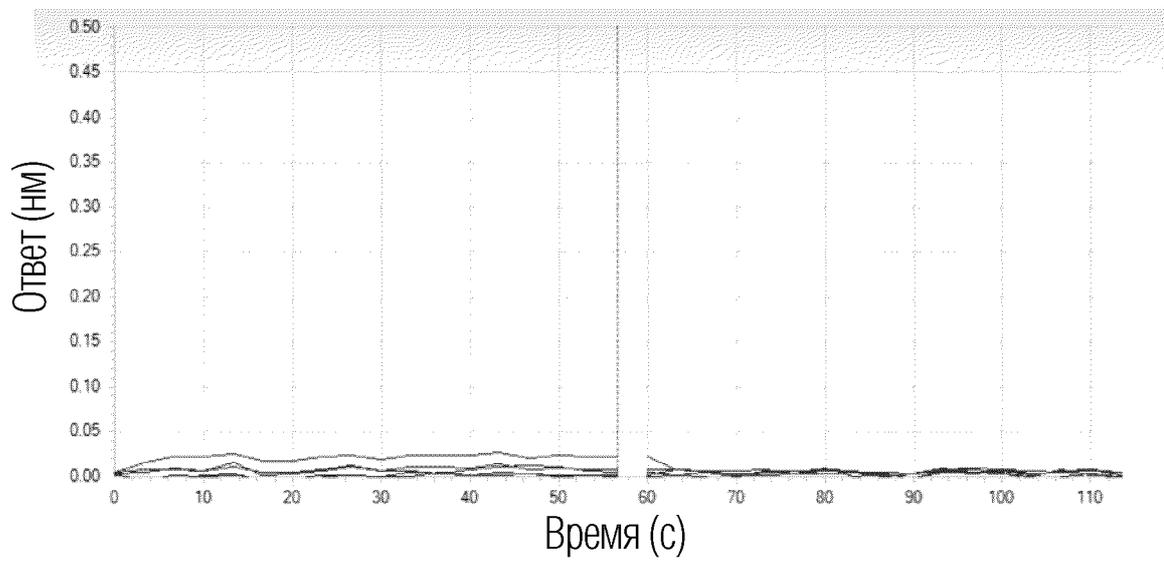


ФИГ. 19

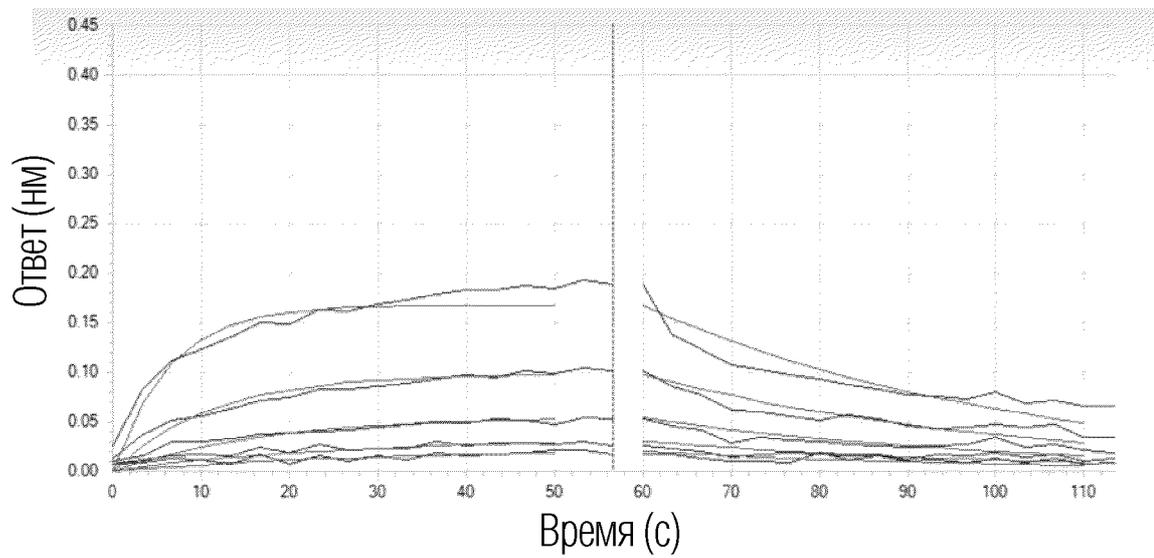


ФИГ. 20

11/21

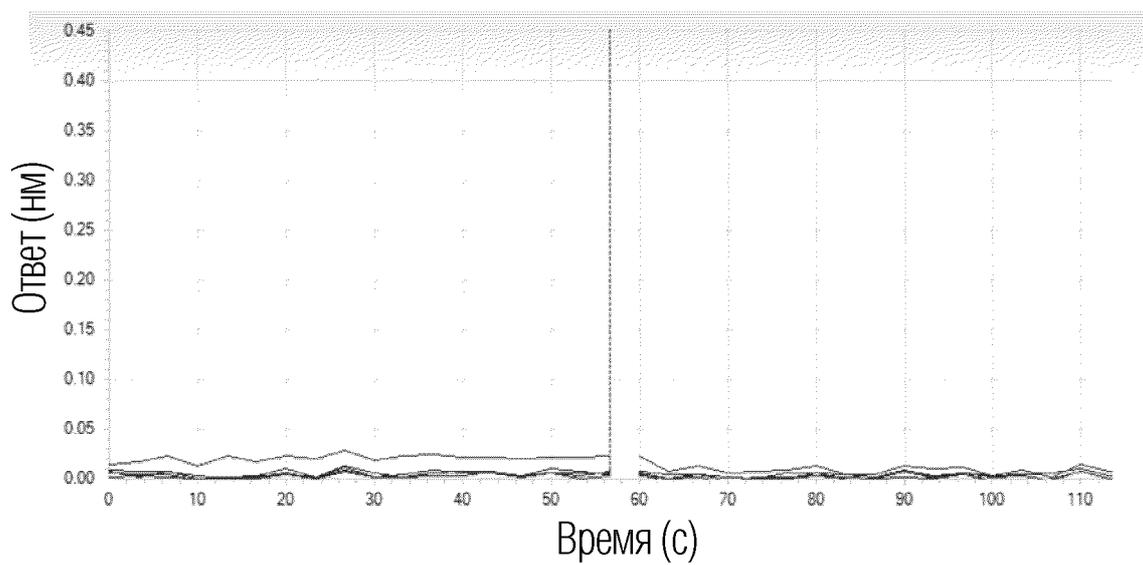


ФИГ. 21

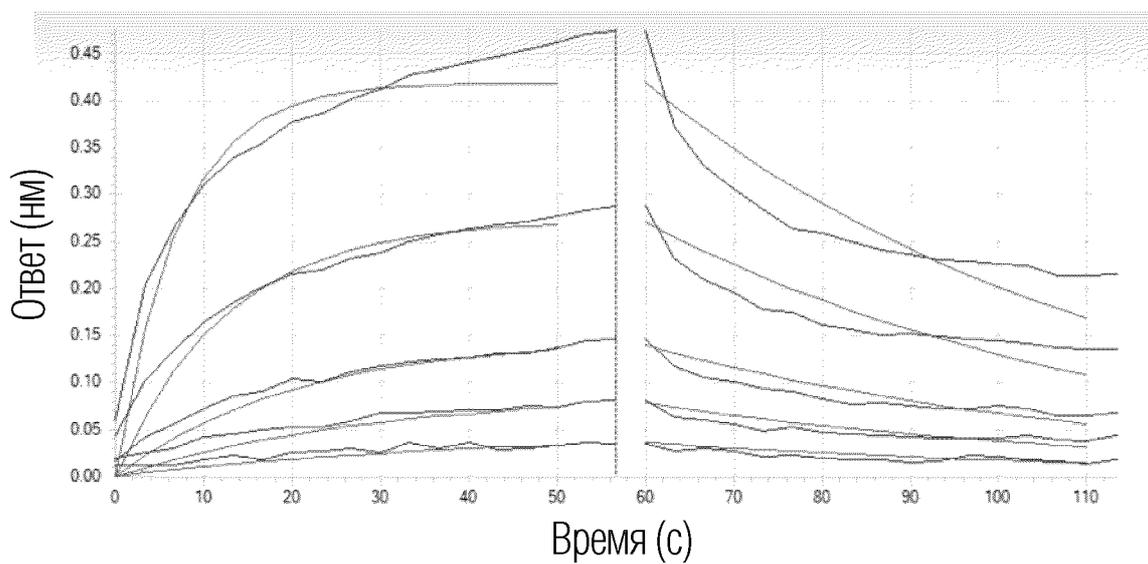


ФИГ. 22

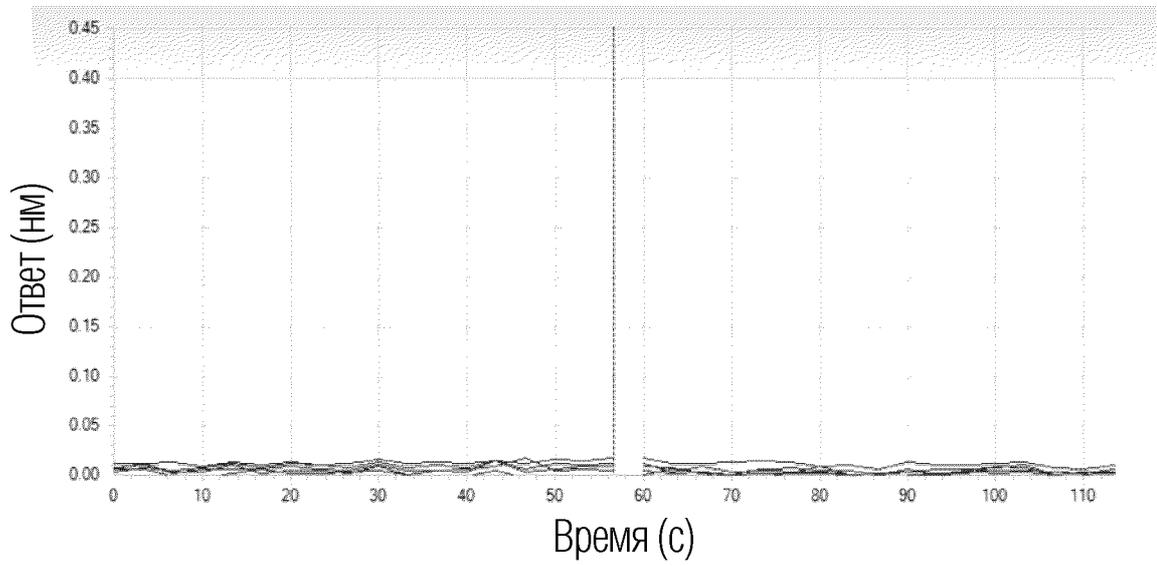
12/21



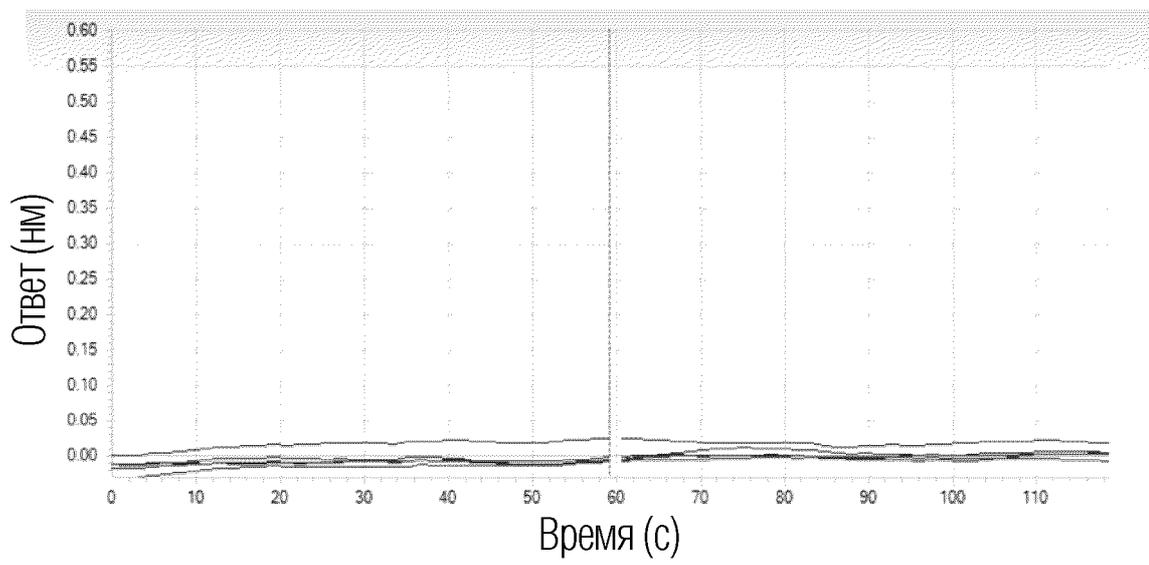
ФИГ. 23



ФИГ. 24

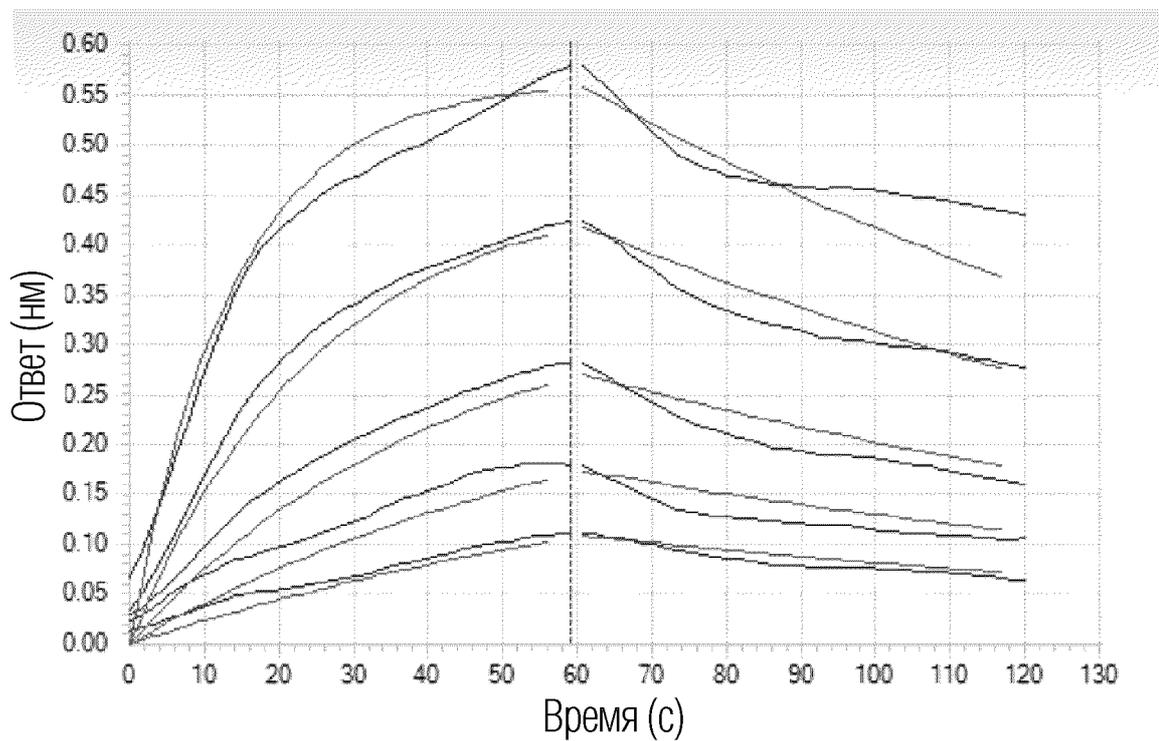


ФИГ. 25

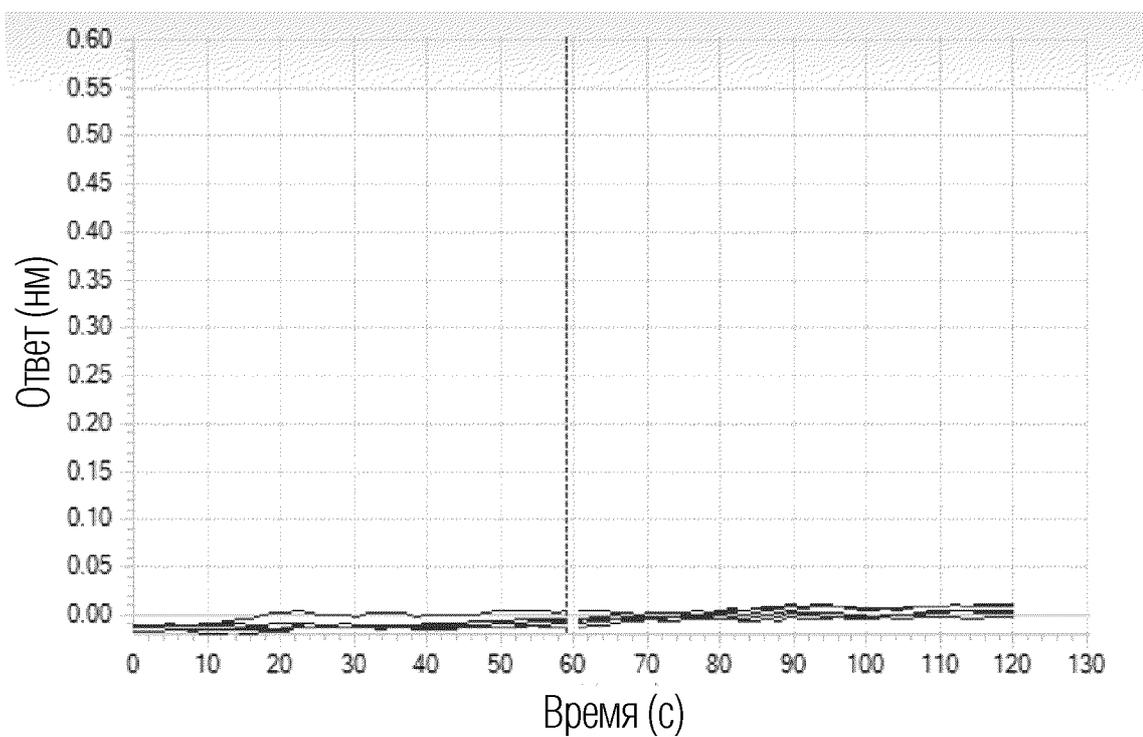


ФИГ. 26

14/21

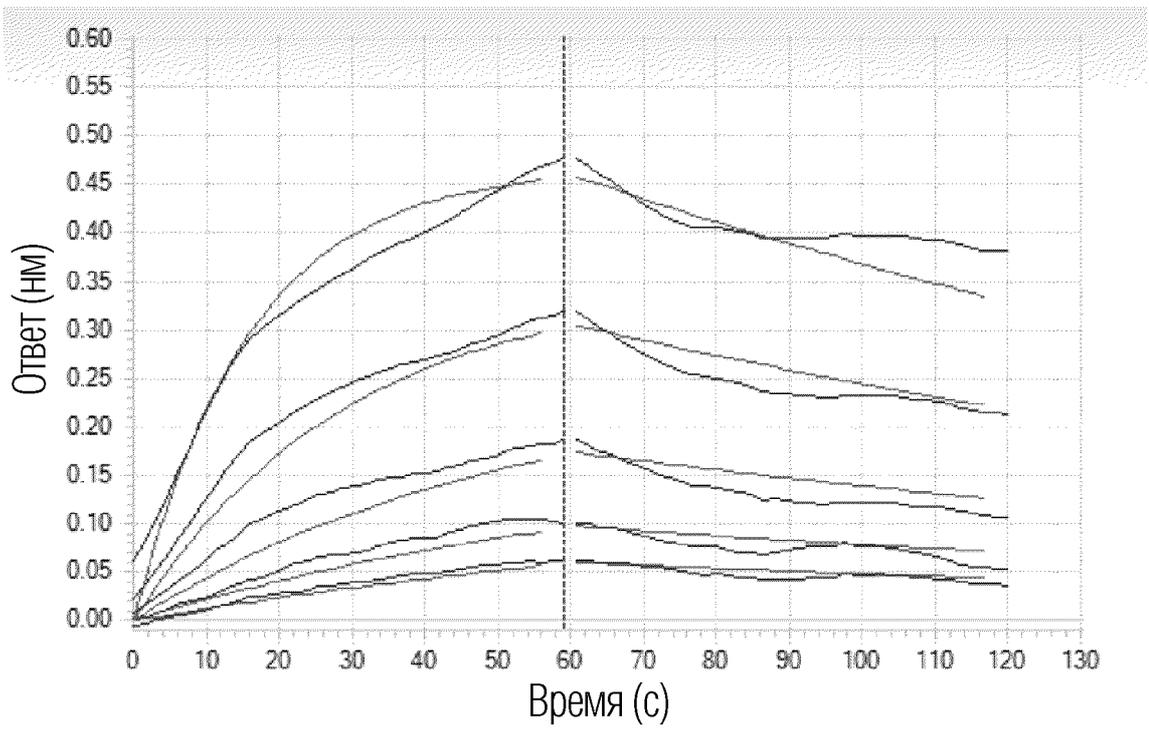


ФИГ. 27

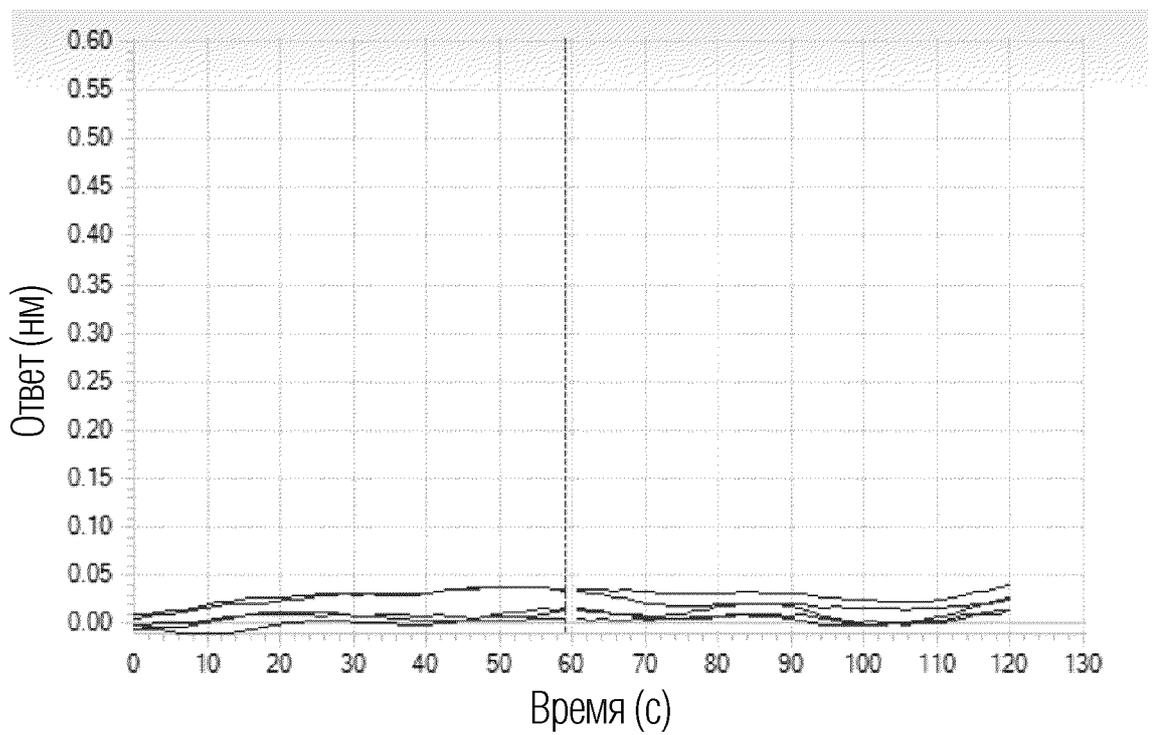


ФИГ. 28

15/21



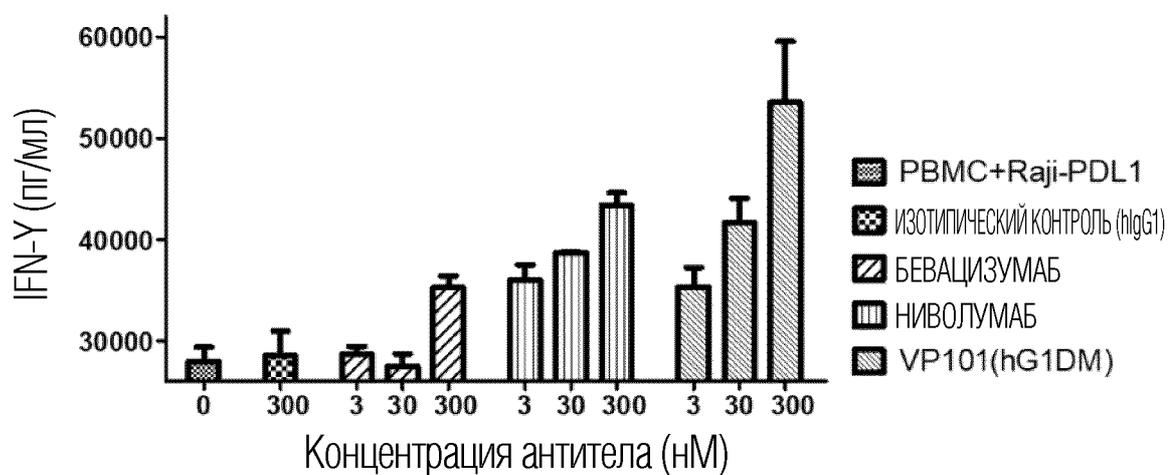
ФИГ. 29



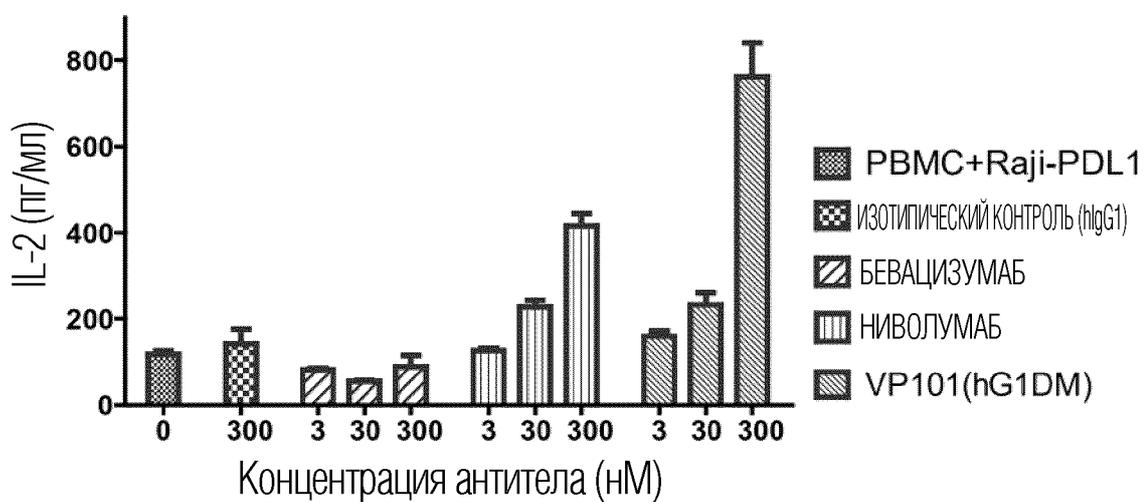
ФИГ. 30



17/21

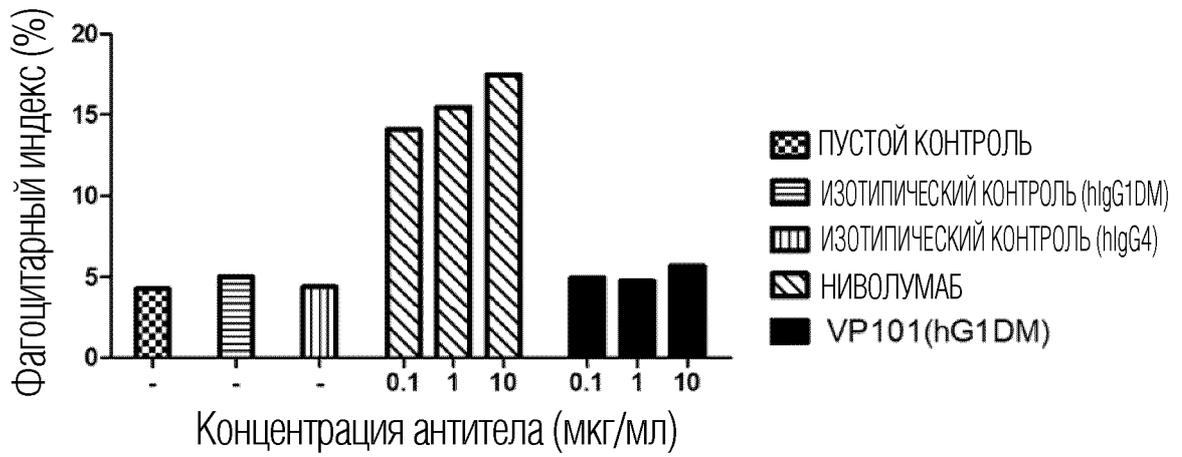


ФИГ. 33



ФИГ. 34

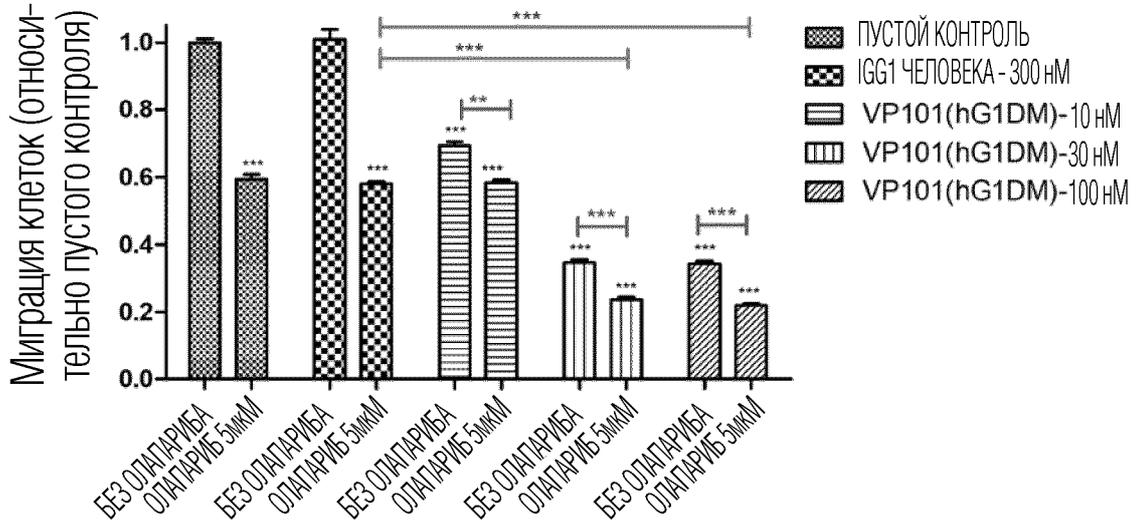
18/21



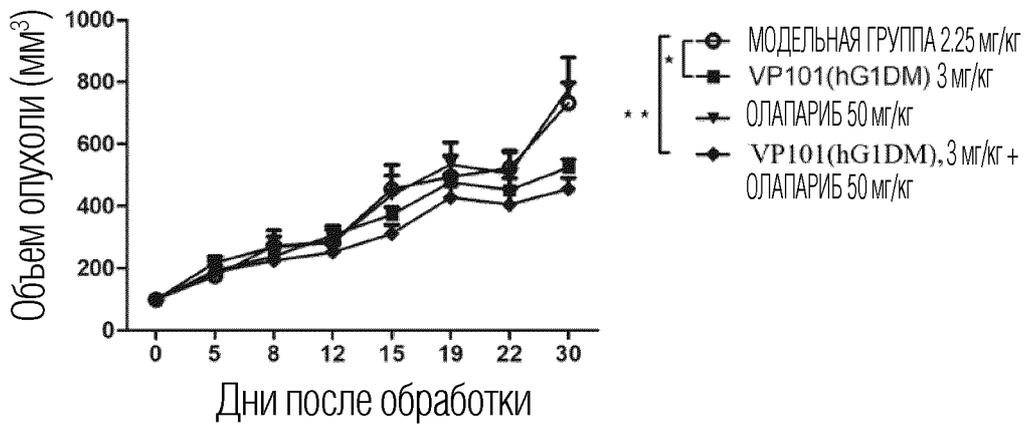
ФИГ. 35



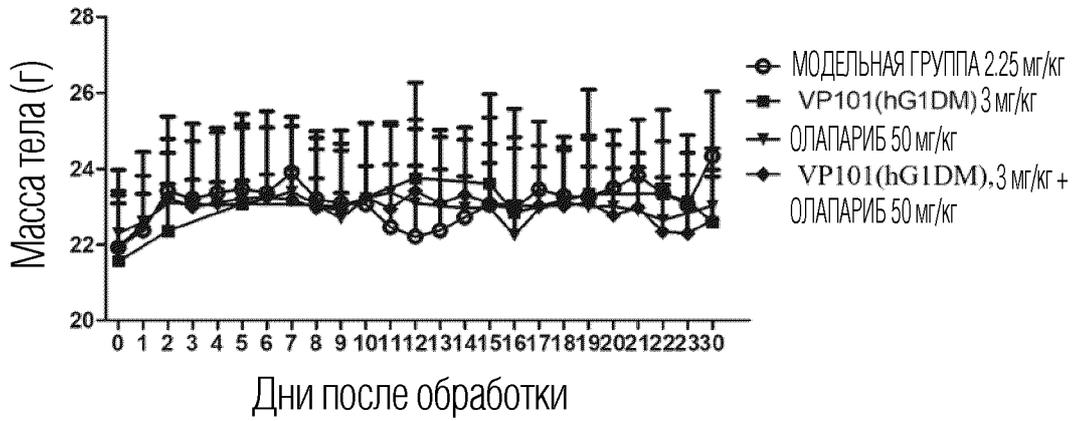
ФИГ. 36



ФИГ. 37



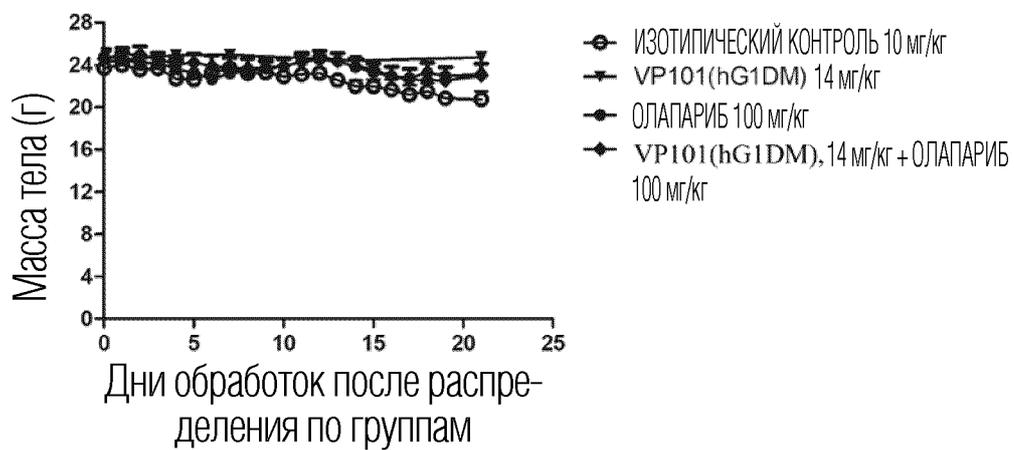
ФИГ. 38



ФИГ. 39



ФИГ. 40



ФИГ. 41