

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291139 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.09.09

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.11.23

(54) МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИ-PD-L1/АНТИ-B7-H3 АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) PCT/CN2019/120246

(32) 2019.11.22

(33) CN

(86) PCT/IB2020/061012

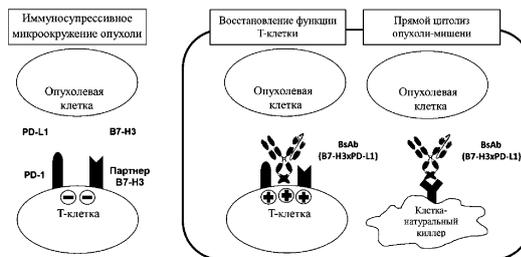
(87) WO 2021/100022 2021.05.27

(71) Заявитель:
ЭЙБИЭЛ БИО ИНК. (KR); АЙ-МАБ
(CN)

(72) Изобретатель:
Сон Ынсил, Пак Ынён, Чон Чжихён,
Чон Чжунхён, Сон Дэхе, Ли Сунчжу
(KR), Фан Лэй, Цзян Вэньцин, Цуй
Фэйфэй (CN)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) В изобретении предложено мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело, способное эффективно блокировать взаимодействие между PD-L1 и его рецептором PD-1 и подавлять ингибирующее действие белка B7-H3 на Т-клетки. Указанное мультиспецифическое антитело может иметь высокую аффинность связывания как в отношении белка PD-L1, так и в отношении белка B7-H3.



A1

202291139

202291139

A1

PCT/IB2020/061012

МПК: *C07K 16/28* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)**МУЛЬТИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИ-PD-L1/АНТИ-B7-H3 АНТИТЕЛА И ИХ
ПРИМЕНЕНИЯ****Область изобретения**

Предложены мультиспецифические анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитела и их применения.

Уровень техники

Лиганд программируемой гибели клетки 1 (PD-L1), также известный как кластер дифференцировки 274 (CD274) или гомолог 1 В7 (B7-H1), представляет собой трансмембранный белок типа 1 40 кДа, который, как полагают, играет главную роль в подавлении иммунной системы во время определенных состояний, таких как беременность, присутствие тканевых аллотрансплантатов, аутоиммунное заболевание и другие болезненные состояния, например гепатит. Связывание PD-L1 с PD-1 или B7.1 передает ингибирующий сигнал, который снижает пролиферацию CD8⁺ Т-клеток в лимфатических узлах, и дополнительно к этому PD-1 также может контролировать накопление специфичных к чужеродным антигенам Т-клеток в лимфатических узлах посредством апоптоза, который, кроме того, опосредуется пониженной регуляцией гена Vcl-2.

Было показано, что повышающая регуляция PD-L1 может давать видам рака возможность избегать иммунной системы хозяина. Анализ опухолевых образцов от пациентов с карциномой почки показал, что высокий уровень экспрессии PD-L1 в опухоли ассоциирован с повышенной агрессивностью опухоли и повышенным риском смерти. Многие ингибиторы PD-L1 находятся в разработке в качестве иммуноонкологических препаратов и показывают хорошие результаты в клинических испытаниях.

B7-H3 (CD276) является членом семейства B7 и представляет собой трансмембранный белок, содержащий внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Два внеклеточных домена B7-H3 состоят из одной пары (2Ig B7-H3) или двух идентичных пар (4Ig B7-H3) варибельного домена иммуноглобулина и константного домена иммуноглобулина вследствие дубликации экзона. Функциональное различие между этими двумя формами не было подтверждено. Внутриклеточный домен

B7-H3 является коротким и не содержит какого-либо известного мотива (Charoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, et al. *NatImmunol* 2001;2:269-74.).

Белок B7-H3 на 20~27% идентичен другим членам семейства B7 по аминокислотной последовательности. B7-H3 человека на 88% идентичен B7-H3 мыши по аминокислотной последовательности. В то время как B7-H3 мыши имеет один подтип (2IgB7-H3), B7-H3 человека имеет два подтипа (2Ig B7-H3, 4Ig B7-H3). 4Ig B7-H3 был подтвержден в ткани человека.

Было обнаружено, что B7-H3 мыши связывается с TLT1 CD8⁺ Т-клетки, таким образом усиливая пролиферацию Т-клеток, продукцию цитокинов и цитотоксичность, и, следовательно, было предположено, что TLT2 может действовать как рецептор B7-H3. Однако впоследствии данные в поддержку этого взаимодействия не были обнаружены ни у мыши, ни у человека (M. Loos, D. M. Hedderich, and D. M. Hedderich, et al. *BMC Cancer*, vol. 9, article 463, 2009).

Белок B7-H3 не всегда экспрессируется в клетках-натуральных киллерах (NK-клетки) или антигенпрезентирующих клетках (APC) в нормальной ткани, но его экспрессия может быть индуцирована. Несмотря на то, что экспрессия B7-1 и B7-2 в основном ограничена иммунными клетками, такими как антигенпрезентирующие клетки, белок B7-H3 присутствует не только в остеобластах, фибробластах, фибробластоподобных синовиальных клетках и эпителиальных клетках, но также в таких органах человека как печень, легкое, мочевой пузырь, семенник, предстательная железа, молочная железа, плацента и лимфатические сосуды. Такая широкая площадь экспрессии позволяет предположить больше различных иммунологических и неиммунологических функций для B7-H3, особенно в периферических тканях.

За последние годы была подтверждена экспрессия B7-H3 в различных солидных формах рака, таких как немелкоклеточный рак легкого, карцинома почки, нейробластома, рак ободочной и прямой кишки, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак легкого, рак предстательной железы, рак эндометрия, печеночно-клеточная карцинома, рак молочной железы, рак шейки матки, остеосаркома, рак ротовой полости, рак мочевого пузыря, глиома, меланома и так далее, и сообщалось, что B7-H3 экспрессируется при таких гематологических злокачественных новообразованиях как острый лейкоз, множественная миелома, различные типы лимфом (Zhimeng Yea, Zhuojun Zhengb et al, *Cell Physiol Biochem* (2016), Elodie Picarda, Kim C. Ohaegbulam and Xingxing Zang, *clinical cancer research* (2016), Wei Zhang, Yanfang Wang, Jing Wang et al, *international journal of oncology*

(2015)).

B7-H3 представляет собой белок, относящийся к лигандам иммунной контрольной точки. Белок иммунной контрольной точки действует как регулятор иммунцитов в организме человека для предупреждения их ошибочного аномального поведения. Когда белок иммунной контрольной точки сверхэкспрессируется в раковой клетке, иммунциты получают аномальный сигнал, который раковая клетка отправляет в качестве нормального сигнала, и распознают раковую клетку как здоровую клетку. Ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой противораковый иммунотерапевтический агент, который блокирует такой аномальный сигнал раковой клетки, тем самым осуществляя лечение рака посредством иммунологической функции самого пациента. B7-H3, который представляет собой один из лигандов иммунной контрольной точки, связывается с рецептором B7-H3 на поверхности Т-клетки и индуцирует ингибирование иммунной реакции Т-клетки, но все еще не выявлено, с каким рецептором связывается B7-H3.

Антитело, которое может блокировать такой лиганд иммунной контрольной точки, демонстрирует противораковый иммунотерапевтический эффект путем частичной или полной нейтрализации взаимодействия лигандов иммунной контрольной точки и рецепторов иммунной контрольной точки и ингибирования иммунной контрольной точки, таким образом восстанавливая пониженную активность иммунцитов. Рецептор, связывающийся с B7-H3, еще не обнаружен, но анти-B7-H3 антитело, связывающееся с B7-H3, может демонстрировать противораковое иммунотерапевтическое действие путем блокирования связывания между рецептором иммунной контрольной точки и B7-H3 и ингибирования такой иммунной контрольной точки, таким образом восстанавливая пониженную активность иммунцитов. Другими словами, можно ожидать, что моноклональное анти-B7-H3 антитело, блокирующее связывание с рецептором B7-H3, будет обладать противораковым терапевтическим действием (Elodie Picarda, Kim C. Ohaegbulam and Xingxing Zang, Clin Cancer Res, 2017 Jul 12;22). В патентах США № 8802091 и 9371395 раскрыты антитела к B7-H3.

Подробное описание изобретения

Техническая задача

Предложены мультиспецифические анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитела и их применения.

Техническое решение

В настоящем изобретении предложены мультиспецифические анти-PD-L1/анти-

В7-Н3 антитела, способные эффективно блокировать взаимодействие между PD-L1 и его рецептором PD-1 и подавлять ингибирующее действие белка В7-Н3 на Т-клетки. Раскрытые мультиспецифические антитела могут иметь высокую аффинность связывания как в отношении PD-L1 (например белком PD-L1 человека), так и в отношении В7-Н3 (например белка В7-Н3 человека). Также в настоящем изобретении предложены комбинированные терапии, включающие анти-PD-L1 антитело и отдельно анти-В7-Н3 антитело.

Как показывают экспериментальные данные, комбинированное лечение антителом анти-В7-Н3 и антителом анти-PD-1 демонстрирует превосходную эффективность по ингибированию роста рака сингенным образом по сравнению с их введением по отдельности. Далее, комбинаторный эффект был еще более выраженным для биспецифических анти-В7-Н3 антител/анти-PD-L1.

Более того, среди всех протестированных биспецифических антител формата “1+1” значительно превосходили форматы “2+2”. Такие результаты были также неожиданными, поскольку ожидалось, что форматы “2+2” будут более мощными, поскольку каждая молекула имеет больше сайтов связывания как с PD-L1, так и с В7-Н3 и может быть структурно более стабильной.

Предполагают, что превосходные активности биспецифических анти-В7-Н3 антител/анти-PD-L1, в частности таковые формата “1+1”, связаны с тем, как белки В7-Н3 и PD-L1 экспрессируются на раковых клетках-мишенях. Также предполагают, что эпитопы анти-В7-Н3 антител и/или анти-PD-L1 антител способствуют значительному синергизму. Например, в отличие от всех других терапевтических анти-PD-L1 антител анти-PD-L1 антитела и их фрагменты по настоящему изобретению связываются с доменом IgC белка PD-L1. Следовательно, в одном воплощении предложено биспецифическое анти-PD-L1/анти-В7-Н3 антитело, содержащее анти-PD-L1-часть, обладающую специфичностью связывания в отношении белка PD-L1 человека, и анти-В7-Н3-часть, обладающую специфичностью связывания в отношении белка В7-Н3 человека. Предпочтительно биспецифическое антитело имеет формат 1+1, но также может иметь формат 2+2, как дополнительно описано ниже.

В формате 1+1, например, биспецифическое антитело имеет Fc-фрагмент, и как анти-PD-L1-связывающий фрагмент, так и анти-В7-Н3-связывающий фрагмент находятся на N-концевой стороне Fc-фрагмента (или альтернативно на C-концевой стороне Fc-фрагмента). Каждый из анти-PD-L1-связывающего фрагмента и анти-В7-Н3-

связывающего фрагмента может быть независимо выбран из Fab-фрагмента, одноцепочечного Fab-фрагмента (scFab), однодоменного антитела (sdAb), одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) и антигенсвязывающей группировки или любых других антигенсвязывающих фрагментов.

В одном примере сайт связывания с PD-L1 представляет собой Fab-фрагмент, и сайт связывания с B7-H3 представляет собой scFab-фрагмент. В другом примере сайт связывания с PD-L1 представляет собой Fab-фрагмент, и сайт связывания с B7-H3 представляет собой scFv-фрагмент. В одном примере сайт связывания с PD-L1 представляет собой scFab-фрагмент, и сайт связывания с B7-H3 представляет собой Fab. В одном примере сайт связывания с PD-L1 представляет собой scFv-фрагмент, и сайт связывания с B7-H3 представляет собой Fab. Формат 1+1, как видно из названия, является моновалентным в отношении связывания PD-L1 и моновалентным в отношении связывания B7-H3.

В формате 2+2 полноразмерное антитело (Fab и Fc) может быть слито с двумя антигенсвязывающими фрагментами на C-концевой стороне Fc-фрагмента. В одном воплощении полноразмерное антитело является специфичным к PD-L1, и два антигенсвязывающих фрагмента являются специфичными к B7-H3. В другом воплощении полноразмерное антитело является специфичным к B7-H3, и два антигенсвязывающих фрагмента являются специфичными к PD-L1. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть выбраны из Fab-фрагмента, одноцепочечного Fab-фрагмента (scFab), однодоменного антитела (sdAb), одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) и антигенсвязывающей группировки или любых других антигенсвязывающих фрагментов.

В любом из приведенных выше примеров анти-PD-L1-связывающая часть может специфически связываться с доменом иммуноглобулина C (Ig C) белка PD-L1 человека, где домен Ig C состоит из аминокислотных остатков 133-225. В некоторых воплощениях анти-PD-L1-связывающая часть может специфически связываться с аминокислотными остатками Y134, K162 и N183 белка PD-L1 человека. Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело может содержать анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве нацеливающей на PD-L1 группировки, обладающее способностью специфически распознавать белок PD-L1 и/или связываться с ним, и анти-B7-H3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве нацеливающей на B7-H3 группировки, обладающее способностью специфически распознавать белок B7-H3 и/или связываться с ним.

Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело может содержать анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве нацеливающей на PD-L1 группировки.

В одном воплощении анти-PD-L1 антитело или его фрагмент, содержащиеся в мультиспецифическом антителе, могут специфически связываться с доменом иммуноглобулина С (IgC) белка PD-L1 (например, PD-L1 человека). В некоторых воплощениях домен IgC состоит из аминокислотных остатков 133-225 белка PD-L1 человека. В некоторых воплощениях анти-PD-L1 антитело или его фрагмент может связываться по меньшей мере с одним аминокислотным остатком, выбранным из Y134, K162 и N183 белка PD-L1 человека. В некоторых воплощениях анти-PD-L1 антитело или его фрагмент не связывается с доменом иммуноглобулина V (IgV) белка PD-L1, и, например, домен IgV состоит из аминокислотных остатков 19-127 белка PD-L1 человека.

Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело, содержащее анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и анти-B7-H3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

где анти-PD-L1 антитело или его фрагмент содержит: (1) VH CDR1 (определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 294; (2) VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3 и 295; (3) VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 296; (4) VL CDR1 (определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 14 и 297; (5) VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и 298, и (6) VL CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19 и 299;

и анти-B7-H3 антитело или его фрагмент содержит: (1) VH CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 21, 22 и 23; (2) VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28 и 29; и (3) VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33 и 34; (4) VL CDR1, имеющую аминокислотную последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38 и 39; (5) VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44 и 45, и (6) VL CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 47, 48, 49 и 50.

В одном воплощении анти-PD-L1 антитело или его фрагмент содержит: (1) VH CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 294; (2) VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3 и 295; (3) VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 5 и 296; (4) VL CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 297; (5) VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и 298, и (6) VL CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 299; и

анти-B7-H3 антитело или его фрагмент содержит: (1) VH CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20 и 21; (2) VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24 и 25, и (3) VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30 и 31; (4) VL CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35 и 36; (5) VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40 и 41, и (6) VL CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46 и 47.

В одном воплощении анти-PD-L1 антитело или его фрагмент содержит: (1) VH CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 294; (2) VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и 295; (3) VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 и 296; (4) VL CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 297; (5) VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и 298, и (6) VL CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей

из SEQ ID NO: 16 и 299; и

анти-B7-H3 антитело или его фрагмент содержит: (1) VH CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20 и 21; (2) VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24 и 25, и (3) VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30 и 31; (4) VL CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35 и 36; (5) VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40 и 41, и (6) VL CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46 и 47.

В одном воплощении анти-PD-L1 антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140 и 209, или пептид, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140 и 209.

В одном воплощении анти-PD-L1 антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130 и 209, или пептид, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 130 и 209.

В одном воплощении анти-B7-H3 антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 57, 58, 59, 60, 61 и 62, или пептид, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 57, 58, 59, 60, 61 и 62.

В одном воплощении анти-B7-H3 антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 57 и 58, или пептид, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 57 и 58.

В одном воплощении анти-PD-L1 антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139 и 211, или пептид, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139 и 211.

В одном воплощении анти-PD-L1 антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129 и 211, или пептид, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 129 и 211.

В одном воплощении анти-B7-H3 антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55 и 56, или пептид, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55 и 56.

В одном воплощении анти-B7-H3 антитело или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 51 и 52, или пептид, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 51 и 52.

В одном воплощении анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью связываться с по меньшей мере одним из аминокислотных остатков, выбранных из Y134, K162 и N183 белка PD-L1.

В одном воплощении анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент не связывается с доменом иммуноглобулина V (Ig V) белка PD-L1, где домен Ig V состоит из аминокислотных остатков 19-127.

В одном воплощении анти-B7-H3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент восстанавливает активность Т-клетки, ингибированную иммунной контрольной точкой B7-H3.

В одном воплощении каждое из анти-PD-L1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и анти-B7-H3 антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента независимо представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело.

В одном воплощении каждое из анти-PD-L1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и анти-B7-H3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента независимо выбрано из группы, состоящей из полноразмерного IgG, Fab, Fab', F(ab')₂, scFab, dsFv, Fv, scFv, scFv-Fc, scFab-Fc, диатела, миниантитела, scAb, dAb, полу-IgG и их комбинаций.

Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по настоящему изобретению представлено в форме IgG X форма scFv.

В другом воплощении мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по настоящему изобретению представлено в форме (HC + LC) X форма scFab-Fc.

В одном воплощении мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по настоящему изобретению дополнительно содержит антитело анти-4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитело анти-4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть выбраны из группы, состоящей из полноразмерного IgG, Fab, Fab', F(ab')₂, scFab, dsFv, Fv, scFv, scFv-Fc, scFab-Fc, диатела, миниантитела, scAb, dAb, полу-IgG и их комбинаций.

В одном воплощении полинуклеотид может представлять собой полинуклеотид, кодирующий раскрытую здесь вариабельную область тяжелой цепи и/или легкой цепи.

В одном воплощении выделенный полинуклеотид может представлять собой полинуклеотид, кодирующий раскрытую здесь тяжелую цепь и/или легкую цепь.

В одном воплощении предложен вектор, содержащий указанный полинуклеотид.

В одном воплощении предложена клеточная линия, трансформированная указанным вектором.

В другом воплощении предложен способ получения выделенного антитела, специфически связывающегося с PD-L1 или B7-H3, или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий стадию выделения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из указанной клеточной линии.

В другом воплощении предложена фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном воплощении фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию для лечения и/или предупреждения заболевания,

ассоциированного с PD-L1, B7-H3 или ими обоими, например рака.

В другом воплощении предложен способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества мультиспецифического анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитела по настоящему изобретению.

В другом воплощении предложен способ детектирования PD-L1 или B7-H3 в биологическом образце, включающий стадию приведения в контакт антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано здесь, с биологическим образцом, в котором требуется выявить экспрессию PD-L1 или B7-H3. Этот способ может дополнительно включать, после стадии приведения в контакт, стадию измерения ответа антиген-антитело в биологическом образце, обработанном (приведенным к контакту с) антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В одном воплощении способ можно выполнять *in vitro* или *in vivo*.

В другом воплощении предложен набор, содержащий антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или композицию, содержащую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Набор может быть предложен в качестве набора для детектирования PD-L1 или B7-H3, или набора для введения для лечения рака, или набора для лечения рака, в зависимости от определенной задачи, для которой используют набор, и в зависимости от этой определенной задачи он может содержать дополнительный компонент. Например, дополнительно может содержаться компонент для иммунологического анализа, например буфер и инструкции для набора для детектирования или диагностики, или аппарат для введения и инструкции для набора для введения антитела или лечения рака.

Анти-B7-H3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может: (1) специфически распознавать B7-H3, экспрессированный на клеточной поверхности, имеющий происхождение из человека, мыши или обезьяны, или связываться с ним; или (2) специфически распознавать внеклеточный домен B7-H3, который может присутствовать или отсутствовать на клеточной поверхности, или связываться с ним.

Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по настоящему изобретению демонстрирует эффект ингибитора иммунной контрольной точки, который активирует Т-клетку, активность которой понижена лигандом иммунной контрольной точки, белком B7-H3, таким образом его полезно использовать для лечения рака посредством активации иммунцитов.

Кроме этого, это антитело можно использовать, например, для доставки

лекарственного средства к определенному злокачественному новообразованию и так далее или для детектирования, диагностики рака и/или нацеливания на рак путем специфического связывания.

Дополнительно раскрытое здесь моноклональное антитело имеет межвидовую перекрестную реактивность, обладая аффинностью связывания с В7-Н3 человека, обезьяны и мыши. Это может быть очень полезно для разработки лекарственных средств и так далее, по сравнению с другими человеческими антителами, которые не демонстрируют аффинность связывания с В7-Н3 мыши или обезьяны. Например, моноклональное антитело или различные формы терапевтических агентов с использованием этого антитела может(гут) продвинуть разработку лекарственных средств более экономически выгодно и эффективно путем получения начальных результатов с низкими затратами на мышинной модели перед переходом к дорогостоящему эксперименту на обезьянах.

В другом воплощении предложено применение мультиспецифического анти-PD-L1/анти-В7-Н3 антитела по настоящему изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения или предупреждения заболевания, ассоциированного с PD-L1, В7-Н3 или ими обоими.

В другом воплощении предложено применение мультиспецифического анти-PD-L1/анти-В7-Н3 антитела по настоящему изобретению для лечения или предупреждения заболевания, ассоциированного с PD-L1, В7-Н3 или ими обоими.

Полезные эффекты изобретения

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, которое(ый) специфически связывается с PD-L1 и В7-Н3, демонстрирует превосходную активность по ингибированию пролиферации раковых клеток и в высшей степени превосходную противораковую активность синергического характера, таким образом оказывая эффективное превентивное или лечебное действие при таком заболевании как рак.

Краткое описание графических материалов

На Фиг. 1а показан “формат 2+2” мультиспецифического анти-PD-L1/анти-В7-Н3 антитела по настоящему изобретению.

На Фиг. 1б показан “формат 1+1” мультиспецифического анти-PD-L1/анти-В7-Н3 антитела по настоящему изобретению.

На Фиг. 2 схематически показан механизм действия мультиспецифического анти-

PD-L1/анти-В7-Н3 антитела согласно одному воплощению.

На Фиг. 3 представлен график, демонстрирующий критерии отбора для вариантов PD-L1 для определения остатков, требуемых для связывания с Hu1210-41.

На Фиг. 4 показано расположение Y134, K162 и N183, остатков (кружки), вовлеченных в связывание с антителом анти-PD-L1 согласно одному воплощению.

На Фиг. 5а и 5б представлены результаты анализа (ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ)) связывающей способности анти-В7-Н3 антитела, полученного согласно одному воплощению настоящего изобретения, в отношении внеклеточного домена (ECD) белка В7-Н3. Было показано, что каждое антитело связывалось с внеклеточным доменом белка В7-Н3 человека зависимым от концентрации образом.

На Фиг. 6 представлен результат анализа (ELISA) связывающей способности анти-В7-Н3 антитела, полученного согласно одному воплощению настоящего изобретения, в отношении ECD других белков, принадлежащих семейству В7. Было показано, что каждое антитело, полученное согласно одному воплощению настоящего изобретения, не связывалось с другими белками и специфически распознавало только белок В7-Н3.

На Фиг. 7 представлен результат анализа межвидовой перекрестной реактивности анти-В7-Н3 антитела, полученного согласно одному воплощению настоящего изобретения методом ELISA. Было показано, что каждое антитело связывалось с В7-Н3 обезьяны (яванского макака) и В7-Н3 мыши зависимым от концентрации образом.

На Фиг. 8 представлен результат сравнения степени связывающей способности различных анти-В7-Н3 антител, полученных согласно одному воплощению настоящего изобретения, в отношении белка В7-Н3 мыши методом ELISA. Было показано, что степень связывания антител с В7-Н3 мыши варьирует, но каждое антитело связывалось с белком В7-Н3 мыши зависимым от концентрации образом. Напротив, антитело 84D, используемое в качестве антитела группы сравнения, не связывалось с белком В7-Н3 мыши.

На Фиг. 9 представлен результат измерения (FACS (сортировка флуоресцентно-активированных клеток)) связывающей способности анти-В7-Н3 антитела, полученного согласно одному воплощению настоящего изобретения, в отношении антигена В7-Н3, экспрессированного на клеточной поверхности. Клеточная линия MCF-7 представляет собой клеточную линию, сверхэкспрессирующую В7-Н3, и Jurkat представляет собой клеточную линию, которая не экспрессирует В7-Н3. Было показано, что анти-В7-Н3

антитела по настоящему изобретению специфически связывались с MCF-7, клеточной линией, сверхэкспрессирующей В7-Н3, но не связывались с Jurkat, клеточной линией, которая не экспрессирует В7-Н3.

На Фиг. 10 представлен результат измерения (FACS) связывающей способности анти-В7-Н3 антитела, полученного согласно одному воплощению настоящего изобретения, в отношении антигена В7-Н3, экспрессированного на клеточной поверхности, для различных концентраций антитела. Было показано, что каждое антитело связывалось с клетками раковых клеточных линий, экспрессирующих В7-Н3 (MCF-7, DLD-1, HCC1954 и HCT116), зависимым от концентрации образом. Связывающая способность антител в отношении В7-Н3, экспрессированного в других различных линиях раковых клеток, описана в Таблице 19.

Для того чтобы применять антитело к определенному антигену *in vivo* в качестве антитела для лечения и так далее, необходимым фактором является его способность связываться с антигеном, экспрессированным на клеточной поверхности. В случае некоторых антител они связываются с очищенным антигеном, но не связываются с антигеном, экспрессированным на клеточной поверхности. В этом случае антитело, введенное в организм, не может связываться с клеткой в организме и, следовательно, не может действовать *in vivo* как антитело для лечения и так далее. Следовательно, этот результат показывает, что анти-В7-Н3 антитело по настоящему изобретению может связываться с В7-Н3 клеточной поверхности и демонстрирует активность *in vivo*, таким образом обеспечивая возможность полезного применения в качестве антитела для лечения.

На Фиг. 11 представлен результат измерения (FACS) связывающей способности анти-В7-Н3 антитела в отношении клеток раковых клеточных линий мышинового происхождения (СТ26, В16F10 и ТС-1). Было показано, что каждое моноклональное антитело В7-Н3 также специфически распознавало В7-Н3, экспрессированный на поверхности клеток раковых клеточных линий мышинового происхождения.

На Фиг. 12 представлен результат измерения ADCC(антителозависимая клеточная цитотоксичность)-индуцирующей способности анти-В7-Н3 антитела, полученного согласно одному воплощению настоящего изобретения. Антитело, полученное согласно одному воплощению настоящего изобретения, демонстрировало индуцирование ADCC, специфичное в отношении только В7-Н3-положительных клеточных линий человека, включая MCF-7, Calu-6, DLD-1 и Mino. ADCC не обнаруживалась в В7-Н3-отрицательной клеточной линии человека, Jurkat. Эти данные показывают, что это антитело можно

эффективно использовать для уничтожения раковых клеток, поскольку оно специфически связывается только с раковыми клетками, экспрессирующими В7-Н3, и индуцирует антителозависимую клеточную цитотоксичность. В частности, эти данные показывают, что анти-В7-Н3 антитело по настоящему изобретению можно более эффективно использовать для лечения рака, поскольку оно имеет меньшую EC50 и большую силу сигнала антителозависимой клеточной цитотоксичности по сравнению с антителом сравнения, 84D.

На Фиг. 13а показана активность Т-клетки, ингибированная белком В7-Н3, и ингибированная в результате подукция интерферона гамма. Было показано, что белок В7-Н3 ингибировал продукцию интерферона гамма зависимым от концентрации образом.

На Фиг. 13б показано, что анти-В7-Н3 антитело, полученное согласно одному воплощению настоящего изобретения, может восстанавливать активность Т-клетки, ингибированную белком В7-Н3, как показано на Фиг. 9а, что было измерено по продукции интерферона гамма. Результаты, представленные на Фиг. 9а и Фиг. 9б, означают, что моноклональное анти-В7-Н3 антитело по настоящему изобретению может нейтрализовать или блокировать иммуносупрессию Т-клетки белком В7-Н3. Другими словами, антитело В7-Н3 по настоящему изобретению может индуцировать уничтожение раковой клетки Т-клеткой путем реактивации Т-клетки, активность которой ингибирована, и это показывает, что антитело В7-Н3 по настоящему изобретению можно эффективно использовать для лечения рака.

На Фиг. 14 показано воздействие анти-В7-Н3 антитела, полученного согласно одному воплощению настоящего изобретения, на активацию Т-клетки интерфероном, когда его используют вместе с антителом анти-PD-1, как измеряли по продукции гамма. Было показано, что анти-В7-Н3 антитело в отдельности или анти-В7-Н3 антитело с противораковым иммунным антителом эффективно облегчает продукцию интерферона гамма путем активации Т-клетки. Этот результат показывает, что это антитело можно эффективно использовать для лечения рака путем активации Т-клеток, отдельно или в комбинации с другим противораковым иммунным антителом.

На Фиг. 15 представлен результат, подтверждающий, что рост опухоли ингибирован и выживаемость улучшена, когда анти-В7-Н3 антитело, полученное согласно одному воплощению настоящего изобретения, вводят совместно с антителом анти-PD-1 в модели изогенной трансплантации опухоли, в которой трансплантируют СТ26, В7-Н3-положительную клеточную линию мыши. Анти-PD-L1 антитело действует путем

ингибирования иммунной контрольной точки. Было показано, что анти-B7-H3 антитело, отдельно или с противораковым иммунным антителом, эффективно облегчает продукцию интерферона гамма путем активации Т-клетки. Этот результат показывает, что это антитело можно эффективно использовать для лечения рака путем активации Т-клетки, отдельно или в комбинации с другим противораковым иммунным антителом.

На Фиг. 16 представлен результат анализа потока инфильтрующих опухоль лимфоцитов в опухоли, когда анти-B7-H3 антитело, полученное согласно одному воплощению настоящего изобретения, вводят совместно с антителом анти-PD-1 в модели изогенной трансплантации опухоли, в которой трансплантируют CT26, B7-H3-положительную раковую клеточную линию мыши. Было показано, что активность CD8+ Т-клетки повышена и пролиферация регуляторной Т-клетки ингибирована посредством совместного введения анти-B7-H3 антитела и антитела анти-PD-1. Это означает, что противораковое действие, вызванное совместным введением анти-B7-H3 антитела и ингибитора иммунной контрольной точки, антитела анти-PD-1, проявляется через изменение CD8+ Т-клетки и регуляторной Т-клетки.

На Фиг. 17 представлен результат анализа (FACS) связывающей способности биспецифических анти-PD-L1/анти-B7-H3 антител, полученных согласно воплощениям настоящего изобретения к PD-L1 и B7-H3, экспрессируемым на клеточной поверхности.

На Фиг. 18 представлен результат анализа (FACS) связывающей способности биспецифических анти-PD-L1/анти-B7-H3 антител формата 1+1, полученных согласно воплощениям настоящего изобретения к PD-L1 и B7-H3, экспрессируемым на клеточной поверхности.

На Фиг. 19 представлен результат анализа (анализ IG4 TCR(Т-клеточный рецептор)-сконструированной Т-клетки) способности биспецифических анти-PD-L1/анти-B7-H3 антител, полученных согласно воплощениям настоящего изобретения, уничтожать опухоль *in vitro*.

На Фиг. 20 представлен результат анализа способности биспецифических анти-PD-L1/анти-B7-H3 антител формата 1+1, полученных согласно воплощениям настоящего изобретения, к антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

На Фиг. 21 представлен результат анализа (анализ IG4 TCR-сконструированной Т-клетки) способности биспецифических антител C4IxB6 и B5xB6 формата 1+1, полученных согласно воплощениям настоящего изобретения, уничтожать опухоль *in vitro*.

На Фиг. 22 представлен результат анализа ингибирования опухолевого роста

биспецифическими антителами формата 1+1 согласно воплощениям настоящего изобретения с использованием гуманизированной мышинной модели RKO-PBMC.

На Фиг. 23 представлен результат анализа способности триспецифических антител индуцировать сигнал 4-1BB.

Определения

Следует отметить, что термин, обозначающий объект, в единственном числе, относится к одному или более чем одному такому объекту, например следует понимать, что термин “антитело” относится к одному или более чем одному антителу. Сами по себе термины “один”, “один или более” и “по меньшей мере один” здесь можно использовать взаимозаменяемо.

Как его используют здесь, термин “полипептид” предназначен охватывать единичный “полипептид”, а также множественные “полипептиды” и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно соединенных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин “полипептид” относится к любой цепи или цепям из двух или более чем двух аминокислот и не ограничен определенной длиной продукта. Следовательно, “пептиды”, “дипептиды”, “трипептиды”, “олигопептиды”, “белок”, “аминокислотная цепь” или любой другой термин, используемый для ссылки на цепь или цепи из двух или более чем двух аминокислот, включены в определение “полипептид”, и термин “полипептид” можно использовать вместо любого из этих терминов или взаимозаменяемо с любым из этих терминов. Термин “полипептид” также предназначен для обозначения продуктов постэкспрессионных модификаций полипептида, включая, без ограничения, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификацию не встречающимися в природе аминокислотами. Полипептид может иметь происхождение из природного биологического источника или быть получен с помощью технологии рекомбинантных нуклеиновых кислот, но он не обязательно транскрибируется с обозначенной последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, включая химический синтез. Кроме того, термин “фрагмент полипептида” обозначает полипептид, имеющий делецию аминокислотной последовательности на амино-конце, делецию аминокислотной последовательности на карбоксильном конце и/или внутреннюю делецию по сравнению с полноразмерным белком. Также этот фрагмент может включать модифицированные аминокислоты по сравнению с полноразмерным белком. В одном воплощении длина

фрагмента может составлять примерно от 5 до 900 аминокислот, например, по меньшей мере 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850 или более аминокислот. С учетом задачи настоящего изобретения полезный полипептидный фрагмент включает иммунологический функциональный фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающий домен. В случае антитела, связывающегося с PD-L1 или B7-H3, такой полезный фрагмент включает последовательность CDR, содержащую 1, 2 или 3 тяжелые цепи или легкие цепи, или полную цепь антитела или ее часть, содержащую вариабельную область или константную область тяжелой цепи или легкой цепи, но без ограничения этим.

Как его используют здесь, термин “вариант” полипептида, например, такой как антигенсвязывающий фрагмент, белок или антитело, обозначает полипептид, в котором один или более чем один аминокислотный остаток вставлен, детелирован, добавлен и/или заменен по сравнению с другой полипептидной последовательностью, и включает слитый полипептид. Дополнительно, вариант белка включает вариант, полученный путем ферментативного разрезания, фосфорилирования или другой посттрансляционной модификации белка, но сохраняющий биологическую активность раскрытого здесь антитела, например способность специфически связываться с B7-H3, и биологическую активность. Этот вариант может быть примерно на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81% или 80% идентичным последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, раскрытого здесь.

Как его используют здесь, термин “производное” полипептида обозначает полипептид, химически модифицированный путем конъюгирования с другой химической группировкой, который отличается от варианта с инсерцией, делецией, добавлением или заменой.

Как его используют здесь, термин “выделенный”, как его используют здесь в отношении клеток, нуклеиновых кислот, таких как ДНК или РНК, относится к молекулам, отделенным от других ДНК или РНК, соответственно, которые присутствуют в природном источнике макромолекулы. Термин “выделенный(ая)”, как его используют здесь, также относится к нуклеиновой кислоте или пептиду, который(ая) по существу не содержит клеточного материала, вирусного материала или культуральной среды, когда получен с использованием технологии рекомбинантной ДНК, либо химических предшественников или других химических соединений, когда химически синтезирован. Кроме того, подразумевают, что термин “выделенная нуклеиновая кислота” включает фрагменты

нуклеиновой кислоты, которые не встречаются в природе как фрагменты и не обнаруживаются в природном виде. Также термин “выделенные” здесь используют для ссылки на клетки или полипептиды, отделенные от других клеточных белков или тканей. Подразумевают, что термин “выделенные полипептиды” охватывает как очищенные, так и рекомбинантные полипептиды.

Как его используют здесь, термин “рекомбинантный”, когда его используют в отношении полипептидов или полинуклеотидов, обозначает форму полипептида или полинуклеотида, который не существует в природе, неограничивающий пример которого может быть создан путем комбинирования полинуклеотидов или полипептидов, которые обычно не встречаются вместе.

Термины “гомология”, или “идентичность”, или “сходство” относятся к сходству между последовательностями двух пептидов или двух молекул нуклеиновой кислоты. Гомологию можно определить путем сравнения положения в каждой последовательности, которые могут быть выровнены для сравнения. Когда положение в сравниваемой последовательности занято одним и тем же основанием или одной и той же аминокислотой, значит молекулы являются гомологичными по этому положению. Степень гомологии между последовательностями представляет собой функцию от числа совпадающих или гомологичных положений, одинаковых у обеих последовательностей. Термин “неродственная” или “негомологичная” обозначает последовательность, идентичную менее чем на 40%, хотя предпочтительно идентичную менее чем на 25% одной из последовательностей по настоящему изобретению.

То, что последовательность полинуклеотида или области полинуклеотида (или полипептида или области полипептида) идентична другой последовательности на определенный процент (например, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%) означает, что при выравнивании этот процент оснований (или аминокислот) совпадает при сравнении двух последовательностей.

Термин “вектор” обозначает любую молекулу, используемую для доставки молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, в клетку-хозяина, включая, например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг или вирус.

Термин “экспрессионный вектор” обозначает вектор, подходящий для трансформации клетки-хозяина и содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, функционально связанную с экспрессионным вектором и регулируемую экспрессию гетерологичных последовательностей, кодирующих целевой белок. Также этот

экспрессионный вектор может быть функционально связан с кодирующей последовательностью, и в случае транскрипции, трансляции и присутствия интрона он может содержать последовательность, регулирующую сплайсинг РНК или влияющую на него.

Термин “функционально связанный” обозначает, что последовательности нуклеиновых кислот, подлежащие присоединению, расположены так, чтобы выполнять нацеливающую функцию в подходящих условиях. Например, если транскрипция кодирующей последовательности находится под влиянием регуляторной последовательности в подходящих условиях в векторе, содержащем кодирующую последовательность и регуляторную последовательность, она функционально связана.

Термин “клетка-хозяин” обозначает клетку, которая может экспрессировать целевой ген, которую трансформируют или которая подлежит трансформации целевой последовательностью нуклеиновой кислоты. Этот термин включает потомство клетки-хозяина, при условии, что оно экспрессирует целевой ген, независимо от идентичности клетки-хозяина и формы и генетической структуры.

Термин “трансдукция” обычно обозначает перемещение нуклеиновой кислоты из одной бактерии в другую посредством бактериофага. Например, она включает перемещение нуклеиновой кислоты в эукариотическую клетку с использованием ретровируса, не способного к репликации.

Термин “трансфекция” обозначает, что клетка принимает чужеродную или экзогенную ДНК, и в этом случае ДНК вводят в клетку через клеточную мембрану. За ссылкой можно обратиться к методам, известным в данной области техники, например Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012), Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates.

Термин “кодирует”, как его применяют в отношении полинуклеотидов, относится к полинуклеотиду, о котором говорят, что он “кодирует” полипептид, если в его нативном состоянии или при обработке методами, хорошо известными специалисту в данной области техники, он может быть транскрибирован и/или транслирован с получением мРНК для этого полипептида и/или его фрагмента. Антисмысловая цепь представляет собой комплемент такой нуклеиновой кислоты, и кодирующая последовательность может быть выведена из нее.

Как его используют здесь, термин “антитело”, “антигенсвязывающая(ий) область

или участок” или “антигенсвязывающий полипептид” относится к полипептиду или полипептидному комплексу, который специфически распознает антиген и связывается с ним. Антитело может представлять собой полноразмерное антитело и любой(ую) его антигенсвязывающий фрагмент или одну цепь. Следовательно, термин “антитело” включает любой белок или пептид, содержащий молекулу, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, имеющую биологическую активность по связыванию с антигеном. Примеры таковых включают область, определяющую комплементарность (CDR), тяжелой или легкой цепи или ее лиганд-связывающую часть, переменную область тяжелой цепи или легкой цепи, константную область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасную область (FR) или любую ее часть или по меньшей мере одну часть связывающего белка, но без ограничения ими.

В одном воплощении антитело включает моноклональное антитело, моноспецифическое антитело, биспецифическое антитело, триспецифическое антитело, двойное антитело, мультиспецифическое антитело, множественное антитело, миниантитело, доменное антитело, миметик антитела (или синтетическое антитело), химерное антитело, гуманизированное антитело или слияние антител (или конъюгат антител) и их фрагмент, но без ограничения ими, и включает различные формы антител, раскрытые здесь.

Как его используют здесь, термин “антиген” или “иммуноген” обозначает молекулу или часть молекулы, с которой, например, может связываться антигенсвязывающий белок (например, антитело или его иммунологически функциональный антигенсвязывающий фрагмент), и которую можно использовать для продукции антитела, которое может связываться с антигеном у животного. Антиген может содержать один или более чем один эпитоп, который может взаимодействовать с другим антителом или его фрагментом.

Как их используют здесь, термины “фрагмент антитела” или “антигенсвязывающий фрагмент” включают часть антитела, которая не имеет нескольких аминокислот по сравнению с полноразмерной цепью, но которая может специфически связываться с антигеном. Этот фрагмент можно рассматривать как обладающий биологической активностью в том аспекте, что он может специфически связываться с целевым антигеном или может конкурировать с другими антителами или антигенсвязывающим фрагментом за связывание с определенным эпитопом. В одном аспекте этот фрагмент содержит по меньшей мере одну CDR, присутствующую в

полноразмерной легкой цепи или тяжелой цепи, и в некоторых воплощениях он содержит короткоцепочечную тяжелую цепь и/или легкую цепь или ее часть. Такой биологически активный фрагмент можно получить с помощью технологии рекомбинантной ДНК или можно получить, например, путем ферментативного или химического разрезания интактного антитела. Иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина включает Fab, Fab', F(ab')₂, scFab, dsFv, Fv, scFv, scFv-Fc, scFab-Fc, диатело, миниантитело, scAb, dAb, полу-IgG или их комбинации, но без ограничения ими. Кроме того, он может быть получен от любого млекопитающего, включая человека, мышь, крысу, животное семейства верблюдовых или кролика, но без ограничения ими. Функциональная часть антитела, такая как одна или более чем одна CDR, описанная здесь, может быть связана со вторичным белком или низкомолекулярным соединением ковалентной связью, таким образом будучи используема в качестве целевого терапевтического агента к определенной мишени. Термин “фрагмент антитела” включает аптамеры, шпигельмеры и диатела. Термин “фрагмент антитела” также включает любой искусственный или генетически сконструированный белок, который действует как антитело путем связывания с определенным антигеном с образованием комплекса.

Здесь “Fc-фрагмент” содержит два фрагмента тяжелых цепей антитела, содержащие домены CH2 (константный домен 2 тяжелой цепи) и CH3 антитела. Эти 2 фрагмента тяжелых цепей скомбинированы друг с другом путем гидрофобного взаимодействия двух или более чем двух дисульфидных связей и домена CH3.

Здесь “Fab-фрагмент” состоит из 1 легкой цепи и 1 тяжелой цепи, содержащей только CH1 и вариабельную область. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи.

Здесь “Fab'-фрагмент” содержит область между доменами CH1 и CH2 тяжелой цепи дополнительно к Fab-фрагменту, и он может образовывать дисульфидную связь между двумя тяжелыми цепями двух молекул Fab'-фрагмента с образованием молекулы F(ab')₂.

Здесь “F(ab')₂-фрагмент” содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие вариабельную область, CH1 и часть константной области между доменами CH1 и CH2, как описано выше, и таким образом формируется межцепочечная дисульфидная связь между 2-мя тяжелыми цепями. Таким образом, F(ab')₂-фрагмент состоит из двух Fab'-фрагментов, и два Fab'-фрагмента соединяются друг с другом посредством дисульфидной связи между ними.

Здесь термин “Fv-фрагмент” обозначает антитело, содержащее каждую переменную область тяжелой цепи и легкой цепи, но не содержащее константную область. scFv представляет собой такой фрагмент, где Fv соединен гибким линкером. scFv-Fc представляет собой такой фрагмент, где Fc соединен с scFv. Миниантитело представляет собой такой фрагмент, где CH3 соединен с scFv. Диантитело содержит две молекулы scFv. Термин “одноцепочечный переменный фрагмент” или “scFv” относится к слитому белку переменных областей тяжелых (VH) и легких (VL) цепей иммуноглобулинов. В некоторых аспектах эти области соединены с коротким линкерным пептидом длиной от 10 до примерно 25 аминокислот. Линкер может быть богат глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости, и может либо соединять N-конец VH с C-концом VL, либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина несмотря на удаление константных областей и введение линкера. Молекулы ScFv известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США 5892019.

Здесь термин “короткоцепочечное антитело (scAb)” обозначает одну полипептидную цепь, содержащую одну переменную область тяжелой цепи или константную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи и легкой цепи связаны гибким линкером. За ссылкой на короткоцепочечное антитело можно обратиться, например, к патенту США No. 5260203, и он раскрыт здесь посредством ссылки.

Здесь термин “доменное антитело (dAb)” обозначает иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи. В одном воплощении две или более чем две VH-области соединены ковалентной связью через пептидный линкер с образованием бивалентного доменного антитела. Две VH-области этого бивалентного доменного антитела могут быть нацелены на один и тот же антиген или на разные антигены.

Здесь “бивалентный антигенсвязывающий белок” или “бивалентное антитело” содержит два антигенсвязывающих участка. Два антигенсвязывающих участка, содержащиеся в этом бивалентном антителе, могут иметь одинаковую антигенную специфичность или могут обеспечивать антитело с двойной специфичностью, связывающееся с разными антигенами отдельно.

Здесь “мультиспецифический антигенсвязывающий белок” или “мультиспецифическое антитело” нацелено на два или более чем два антигена или эпитопа,

предпочтительно нацелено на два (то есть биспецифический(ое)) или три (например, триспецифический(ое)) антигена или эпитопа, более предпочтительно нацелено на два антигена или эпитопа.

Здесь “биспецифический(ое)”, “с двойной специфичностью” антигенсвязывающий белок или антитело представляет собой гибридный антигенсвязывающий белок или антитело, имеющий(ее) два различных антигенсвязывающих участка. Это биспецифическое антитело представляет собой один тип мультиспецифического антигенсвязывающего белка или мультиспецифического антитела, и оно может быть получено различными известными методами, например слиянием гибридомы или присоединением Fab'-фрагмента. За ссылкой можно обратиться, например, к Songsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553 и так далее. Два отличающихся друг от друга эпитопа, с которыми связываются два антигенсвязывающих участка биспецифического антигенсвязывающего белка или антитела, могут быть расположены на одной и той же или на различных белковых мишенях.

Здесь термин “триспецифический(ое)” антигенсвязывающий белок или антитело обозначает гибридный(ое) антигенсвязывающий белок или антитело, имеющий(ее) 3 различных антигенсвязывающих участка.

Здесь термин “мультиспецифическое антитело” включает биспецифическое антитело и триспецифическое антитело, предпочтительно биспецифическое антитело.

Термин “антитело” охватывает различные обширные классы полипептидов, которые можно различить биохимически. Специалист в данной области техники понимает, что тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ , μ , α , δ , ϵ) с некоторыми подклассами среди них (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Именно природа этой цепи определяет “класс” антитела как IgG, IgM, IgA, IgG или IgE, соответственно. Подклассы иммуноглобулинов (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5 и так далее хорошо охарактеризованы, и известно, что они придают функциональную специализацию. Модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов легко распознает специалист в данной области техники в свете настоящего описания, и соответственно, они попадают в объем настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов очевидно попадают в объем настоящего изобретения, следующее обсуждение в целом направлено на молекулы иммуноглобулинов класса IgG. Что касается IgG, стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной

массой приблизительно 23000 Дальтон и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи обычно соединены дисульфидными связями в конфигурацию “Y”, где легкие цепи “заклучают в скобки” тяжелые цепи, начиная с развилки “Y” и продолжая на протяжении вариабельной области.

Антитела, их антигенсвязывающие полипептиды, варианты или производные по изобретению включают поликлональные, моноклональные, мультиспецифические, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, например Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fvs, одноцепочечные Fvs (scFv), одноцепочечные антитела, связанные дисульфидными связями Fvs (sdFv), фрагменты, содержащие либо домен VL, либо домен VH, фрагменты, полученные с помощью библиотеки экспрессии Fab и анти-идиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, антитела анти-Id к антителам “LIGHT”, раскрытым здесь), но без ограничения ими. Молекулы иммуноглобулина или антитела по настоящему изобретению могут принадлежать любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекул иммуноглобулинов.

Легкие цепи классифицируют либо как каппа, либо как лямбда (κ , λ). Тяжелая цепь любого класса может быть связана либо с каппа, либо с лямбда легкой цепью. Обычно легкие и тяжелые цепи ковалентно связаны друг с другом, и “хвостовые” части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда иммуноглобулины произведены гибридомами, В-клетками или генетически сконструированными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности идут от N-конца на раздвоенных концах Y-конфигурации к C-концу у основания каждой цепи.

Как легкие, так и тяжелые цепи подразделяют на области структурной и функциональной гомологии. Термины “константный” и “вариабельный” используют с функциональной точки зрения. В этом отношении, следует понимать, что вариабельные домены частей как легкой (VL), так и тяжелой (VH) цепи определяют распознавание антигена и специфичность. Наоборот, константные домены легкой цепи (СК) и тяжелой цепи (СН1, СН2 или СН3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная подвижность, связывание с Fc-рецептором, связывание комплемента и тому подобное. Принято, что нумерация доменов константной области увеличивается по мере их отдаления от антиген-связывающего участка или аминоконца антитела. N-

концевая часть представляет собой вариабельную область, и С-концевая часть представляет собой константную область; в действительности домены СНЗ и СК составляют карбокси-конец тяжелой и легкой цепи, соответственно.

Как указано выше, вариабельная область позволяет антителу селективно распознавать эпитопы на антигенах и специфически связываться с ними. То есть домен VL и домен VH или подмножество областей, определяющих комплементарность (CDR), антитела комбинируются с образованием вариабельной области, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий участок. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий участок, присутствующий на конце каждой ветви Y. Более конкретно, антигенсвязывающий участок определяется тремя CDR на каждой из VH и VL цепей (то есть CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). В некоторых случаях, например у определенных молекул иммуноглобулинов, полученных от видов верблюдовых или сконструированных на основе иммуноглобулинов верблюдовых, полная молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей без легких цепей. См., например, Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446-448 (1993).

В природных антителах шесть “областей, определяющих комплементарность” или “CDR”, присутствующие в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот, расположенные определенным образом с образованием антигенсвязывающего домена, когда антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водном окружении. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые “каркасной” областью, демонстрируют меньшую внутримолекулярную вариабельность. Каркасные области в основном принимают конформацию складчатого β -слоя, и CDR образуют петли, которые соединяют эту β -складчатую структуру и в некоторых случаях образуют ее часть. Таким образом, каркасные области служат для образования каркаса, который обеспечивает определенное расположение CDR в правильной ориентации, путем внутрицепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный позиционированными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с распознаваемым им эпитопом. Специалист в данной области техники может легко идентифицировать аминокислоты, составляющие CDR и каркасные области, соответственно, для любой данной вариабельной области тяжелой или легкой цепи, поскольку они были точно определены (см. www.bioinf.org.uk: Dr. Andrew C.R. Martin's

Group; “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); и Chothia and Lesk, J. MoI. Biol., 196: 901-917 (1987)).

В случае, когда есть два или более чем два определения термина, используемых и/или принятых в данной области техники, определение термина, как его используют здесь, предназначено включать все такие значения, если ясно не указано противоположное. Конкретный пример представляет собой применение термина “область, определяющая комплементарность” (“CDR”) для описания несмежных антиген-комбинирующих участков, обнаруживаемых внутри вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Эта определенная область была описана Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983) и Chothia et al., J. MoI. Biol. 196: 901-917 (1987), которые включены сюда посредством ссылки во всей своей полноте. Определения CDR согласно Kabat и Chothia включают перекрывание или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, применение каждого из этих двух определений, относящихся к CDR антитела или его вариантам, предназначено попадать в объем этого термина, как его определяют и используют здесь. Подходящие аминокислотные остатки, которые окружают CDR, как определено в каждой из процитированных выше ссылок, приведены в таблице ниже для сравнения. Точное число остатков, которые окружают определенный CDR, варьирует в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалист в данной области техники может в рабочем порядке определить, какие остатки составляют определенный CDR при заданной аминокислотной последовательности вариабельной области антитела.

Таблица 1

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

Kabat et al. также определяет систему нумерации для последовательностей вариабельных доменов, применимую для любого антитела. Специалист средней

квалификации в данной области техники может однозначно применить эту систему “нумерации по Kabat” для любой последовательности переменного домена, независимо от каких-либо экспериментальных данных кроме самой последовательности. Как его используют здесь, термин “нумерация по Kabat” относится к системе нумерации, установленной Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequence of Proteins of Immunological Interest” (1983).

Раскрытые здесь антитела могут иметь любое животное происхождение, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно, антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. В другом воплощении переменная область может иметь происхождение от хрящевых рыб (condricthoid) (например, акул).

Как его используют здесь, термин “константная область тяжелой цепи” включает аминокислотные последовательности, имеющие происхождение из тяжелой цепи иммуноглобулина. Как указано выше, специалист в данной области техники понимает, что константная область тяжелой цепи может быть модифицирована таким образом, что она будет отличаться по аминокислотной последовательности от встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина.

Раскрытая здесь константная область тяжелой цепи антитела может иметь происхождение от разных молекул иммуноглобулинов. Например, константная область тяжелой цепи полипептида может содержать домен CH1, имеющий происхождение из молекулы IgG1, и шарнирную область, имеющую происхождение из молекулы IgG3. В другом примере константная область тяжелой цепи может содержать шарнирную область, имеющую происхождение частично из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG3. В другом примере часть тяжелой цепи может содержать химерный шарнир, имеющий происхождение частично из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG4.

Как его используют здесь, термин “константная область легкой цепи” включает аминокислотные последовательности, имеющие происхождение из легкой цепи антитела. Предпочтительно, константная область легкой цепи содержит по меньшей мере один из константного домена каппа или константного домена лямбда.

Термин “пара легкая цепь-тяжелая цепь” относится к набору из легкой цепи и тяжелой цепи, которые могут образовывать димер посредством дисульфидной связи между доменом CL (константный домен легкой цепи) легкой цепи и доменом CH1 тяжелой цепи.

Выражения “специфически связывается” или “обладает специфичностью к” обычно обозначают, что антитело связывается с эпитопом через свой антигенсвязывающий домен, и что связывание подразумевает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно этому определению говорят, что антитело “специфически связывается” с эпитопом, когда оно связывается с этим эпитопом через свой антигенсвязывающий домен более легко, чем оно бы связывалось со случайным неродственным эпитопом. Термин “специфичность” используют здесь для оценки относительной аффинности, благодаря которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно считать, что антитело “А” обладает большей специфичностью к данному эпитопу, чем антитело “В”, или можно сказать, что антитело “А” связывается с эпитопом “С” с большей специфичностью, чем его специфичность к родственному эпитопу “D”. Предпочтительно антитело связывается с антигеном (или эпитопом) с “высокой аффинностью”, а именно с K_D (константа диссоциации) 1×10^{-7} М или менее, более предпочтительно 5×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 3×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 25×10^{-9} М или менее или еще более предпочтительно 1×10^{-9} М или менее.

Как его используют здесь, термин “аффинность” обозначает силу взаимодействия между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и антигеном, и ее определяют свойства антигена, такие как размер, форма и/или заряд антигена и последовательности CDR антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Способы определения аффинности известны в данной области техники.

Здесь, термин “эпитоп” обозначает часть молекулы, с которой связывается антигенсвязывающий белок или антитело, или распознаваемую ими и содержащую любой определяющий фактор, который может специфически связываться с антигенсвязывающим белком, таким как, например, антитело или рецептор Т-клетки. Эпитоп может быть непрерывным или прерывистым, и, например, он может не быть непрерывным в полипептидной последовательности, но в аспекте молекулы, как конформационный эпитоп, он может представлять собой аминокислотные остатки, каждый из которых связан с одним антигенсвязывающим белком, но которые не являются последовательными и расположены на расстоянии друг от друга. В одном воплощении эпитоп содержит трехмерную структуру, подобную антигену, используемому для продукции антитела, но он может представлять собой миметик в том аспекте, что он может не содержать остатки,

обнаруживаемые в эпитопе, или может содержать только некоторые остатки. Обычно эпитоп представляет собой белок, но он может представлять собой вещество другого типа, такое как нуклеиновая кислота. Фактор, определяющий эпитоп, может представлять собой химически активную группу, образованную на поверхности такой молекулой как аминокислота, сахарная боковая цепь, фосфорильная группа или сульфонильная группа, или может обладать определенными свойствами трехмерной структуры и/или определенными свойствами заряда. Обычно антитело, которое является специфичным к определенному антигену-мишени, распознает эпитоп антигена-мишени, присутствующий в комплексе белка и/или полимера.

Как их используют здесь, термины “лечить” или “лечение” могут относиться как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или предупредительным мерам, задача которых заключается в предупреждении или замедлении (уменьшении) нежелательного физиологического изменения или расстройства, такого как развитие рака. Полезные или желаемые клинические результаты включают облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (то есть, отсутствие ухудшения) состояния заболевания, отсрочку или замедление развития заболевания, облегчение или ослабление проявления заболевания и ремиссию (частичную или полную), детектируемое(ую) или недетектируемое(ую), но без ограничения ими. Также термин “лечение” может обозначать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения. Субъекты, нуждающиеся в лечении, включают таковых, у которых уже развилось состояние или заболевание, а также предрасположенных к развитию состояния или заболевания, или таковых, у которых необходимо предупредить состояние или заболевание.

Термины “субъект”, или “индивидуум”, или “животное”, или “пациент”, или “млекопитающее” могут относиться к любому субъекту, особенно субъекту-млекопитающему, для которого желательны диагностика, прогноз или терапия. Субъекты-млекопитающие включают человека, домашних животных, сельскохозяйственных животных и животных зоопарка, животных, участвующих в спортивных состязаниях, или домашних питомцев, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и так далее.

Как их используют здесь, такие выражения как “пациенту, нуждающемуся в лечении” или “субъект, нуждающийся в лечении” включают субъектов, таких как субъекты-млекопитающие, для которых полезно введение антитела или композиции по

настоящему изобретению, используемого(ой), например, для детектирования, для диагностической процедуры и/или для лечения.

В настоящем изобретении предложено мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело, способное эффективно блокировать взаимодействие между PD-L1 и его рецептором PD-1 и подавлять ингибирующее действие белка B7-H3 на Т-клетки. Мультиспецифическое антитело может иметь высокую аффинность связывания как с белком PD-L1 (например, белком PD-L1 человека), так и с белком B7-H3 (например, белком B7-H3 человека).

Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело может содержать анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве нацеливающей на PD-L1 группировки, способной специфически распознавать белок PD-L1 и/или связываться с ним, и анти-B7-H3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве B7-H3-нацеливающей группировки, способной специфически распознавать белок B7-H3 и/или связываться с ним.

Анти-PD-L1 антитело

Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело может содержать анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве группировки, нацеливающей на PD-L1. Анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может проявлять высокую связывающую и ингибирующую активность в отношении PD-L1 и быть полезным для терапевтического и диагностического применения.

Белок PD-L1 представляет собой 40 кДа трансмембранный белок типа 1. Белок PD-L1 может представлять собой белок PD-L1 человека, и белок PD-L1 человека может быть выбран из группы, состоящей из белков, представленных в GenBank под номерами доступа No. NP_001254635.1, NP_001300958.1, NP_054862.1 и так далее, но может быть не ограничен ими. Белок PD-L1 человека включает внеклеточную часть, содержащую N-концевой домен иммуноглобулина V (IgV) (аминокислоты 19-127) и C-концевой домен иммуноглобулина C (IgC) (аминокислоты 133-225). В отличие от предсуществующих анти-PD-L1 антител, которые связываются с доменом IgV PD-L1, таким образом разрушая связывание между PD-1 и PD-L1, анти-PD-L1 антитело или его фрагмент, содержащиеся в мультиспецифическом антителе, могут не связываться с доменом иммуноглобулина V (IgV) белка PD-L1, но связываться с доменом IgC PD-L1 для эффективного ингибирования PD-L1, таким образом улучшая терапевтические эффекты.

В частности, анти-PD-L1 антитело или его фрагмент, содержащиеся в

мультиспецифическом антителе, могут специфически связываться с доменом иммуноглобулина С (IgC) белка PD-L1. В случае белка PD-L1 человека домен Ig C содержит аминокислотные остатки 133-225 полноразмерного белка PD-L1 человека или по существу состоит из таковых. Более конкретно, анти-PD-L1 антитело или его фрагмент может связываться по меньшей мере с одним из аминокислотных остатков, выбранных из Y134, K162 и N183 белка PD-L1 человека. В некоторых воплощениях анти-PD-L1 антитело или его фрагмент может связываться по меньшей мере с двумя аминокислотными остатками, выбранными из Y134, K162 и N183 белка PD-L1 человека. В некоторых воплощениях анти-PD-L1 антитело или его фрагмент не связывается с доменом иммуноглобулина V (IgV) белка PD-L1, где домен IgV состоит из аминокислотных остатков 19-127 белка PD-L1 человека.

В одном воплощении анти-PD-L1 антитело или его фрагмент обладает специфичностью в отношении белка PD-L1 человека.

Анти-PD-L1 антитело или его фрагмент может содержать: (1) VH CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 294; (2) VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3 и 295; (3) VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 296; (4) VL CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 14 и 297; (5) VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и 298, и (6) VL CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19 и 299.

Последовательности CDR анти-PD-L1, предназначенные для включения в переменные области тяжелой цепи и легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно одному воплощению настоящего изобретения, представлены в таблице 2 ниже.

【Таблица 2】

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR1	<u>S</u> YDMS	1
	SYWMS	294
VH CDR2	TISD <u>A</u> GGYIYYSDSVKG	2
	TISD <u>A</u> GGYIYY <u>R</u> DSVKG	3

	NIKQDGSEKYYVDSVKG	295
VH CDR3	<u>E</u> FGKRYALDY	4
	EL <u>P</u> WRYALDY	5
	EFGKRYALDS	6
	E <u>I</u> FNRYALDY	7
	EL <u>H</u> FRYALDY	8
	EL <u>Y</u> FRYALDY	9
	EL <u>L</u> HRYALDY	10
	EL <u>R</u> GRYALDY	11
	VALWDDAFDI	296
VL CDR1	KAS <u>Q</u> DVTPAVA	12
	KA <u>K</u> QDVTPAVA	13
	KASQDV <u>W</u> PAVA	14
	RASRGISWLA	297
VL CDR2	<u>S</u> TSSRYT	15
	KASSLES	298
VL CDR3	<u>Q</u> QHYYTTPLT	16
	<u>M</u> QHYYTTPLT	17
	QQ <u>H</u> STTPLT	18
	QQ <u>H</u> SDAPLT	19
	QQSSSIPLT	299

В одном воплощении CDR каждой вариабельной области легкой цепи и CDR каждой вариабельной области тяжелой цепи, раскрытые в Таблице, представленной выше, можно комбинировать свободно.

В некоторых воплощениях антитело или его фрагмент включает не более чем одну, не более чем две или не более чем три из описанных выше замен. В некоторых воплощениях антитело или его фрагмент включает VH CDR1 SEQ ID NO: 1 или 294, VH CDR2 SEQ ID NO: 2, 3 или 295, VH CDR3 SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 296, VL CDR1 SEQ ID NO: 12, 13, 14 или 297, VL CDR2 SEQ ID NO: 15 или 298 и VL CDR3 SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19 или 299.

Например, анти-PD-L1 антитело или его фрагмент может содержать VH CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 294; VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 3 или 295; VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 5 или 296; VL CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или 297; VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или 298, и VL CDR3,

имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 299.

Например, анти-PD-L1 антитело или его фрагмент может содержать VH CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 294; VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или 295; VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или 296; VL CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или 297; VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или 298, и VL CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 299.

Обратные мутации могут быть полезны для сохранения определенных характеристик анти-PD-L1 антитела. В некоторых воплощениях анти-PD-L1 антитела по настоящему изобретению, в частности человеческие или гуманизированные анти-PD-L1 антитела, могут включать одну или более чем одну обратную мутацию. В некоторых воплощениях обратная мутация (то есть включенная в определенном положении аминокислота) в варибельной области тяжелой цепи (VH) представляет собой одну или более чем одну, выбранную из: (а) Ser в положении 44, (б) Ala в положении 49, (в) Ala в положении 53, (г) Ile в положении 91, (д) Glu в положении 1, (е) Val в положении 37, (ж) Thr в положении 40, (з) Val в положении 53, (и) Glu в положении 54, (к) Asn в положении 77, (л) Arg в положении 94 и (м) Thr в положении 108 варибельной области тяжелой цепи согласно нумерации по Kabat, и их комбинаций. В некоторых воплощениях обратные мутации VH выбраны из: (а) Ser в положении 44, (б) Ala в положении 49, (в) Ala в положении 53 и/или (г) Ile в положении 91 варибельной области тяжелой цепи согласно нумерации по Kabat, и их комбинаций.

В некоторых воплощениях обратная мутация в варибельной области легкой цепи (VL) представляет собой одну или более чем одну, выбранную из: (а) Ser в положении 22, (б) Gln в положении 42, (в) Ser в положении 43, (г) Asp в положении 60 и (д) Thr в положении 63 варибельной области легкой цепи согласно нумерации по Kabat, и их комбинаций.

В некоторых воплощениях анти-PD-L1 антитело или его фрагмент содержит константную область тяжелой цепи, константную область легкой цепи, Fc-фрагмент или их комбинацию. В некоторых воплощениях константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа-цепи или лямбда-цепи. В некоторых воплощениях антитело принадлежит изотипу IgG, IgM, IgA, IgE или IgD, например IgG человека, IgM человека, IgA человека, IgE человека или IgD человека. В некоторых

воплощениях изотип может представлять собой IgG, например IgG человека, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых воплощениях фрагмент (антигенсвязывающий фрагмент анти-PD-L1 антитела) может представлять собой любой фрагмент, содержащий CDR тяжелой цепи и/или CDR легкой цепи антитела, и, например, он может быть выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd (содержащего переменную область тяжелой цепи и домен CH1), Fv (переменная область тяжелой цепи и/или переменная область легкой цепи), одноцепочечного Fv (scFv; содержащего переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, в любом порядке, и пептидный линкер между переменной областью тяжелой цепи и переменной областью легкой цепи, или по существу состоящего из них), одноцепочечных антител, связанных дисульфидными связями Fv (sdFv), scFab (одноцепочечный Fab), scFab-Fc (содержащего scFab и Fc-фрагмент), полу-IgG (содержащего одну легкую цепь и одну тяжелую цепь) и тому подобного, но без ограничения ими.

Без ограничения, анти-PD-L1 антитело или его фрагмент представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело. В одном аспекте антитело или его фрагмент не встречаются в природе или синтезированы химически или с помощью технологии рекомбинантной ДНК.

Связывание антитела по настоящему изобретению с PD-L1 можно оценить с помощью одного или более чем одного метода, хорошо разработанного в данной области техники. Например, в предпочтительном воплощении антитело можно тестировать методом проточной цитометрии, в котором антитело приводят во взаимодействие с клеточной линией, экспрессирующей PD-L1 человека, такой как клетки CHO, которые были трансфицированы для экспрессии PD-L1, например, PD-L1 человека или PD-L1 обезьяны, например макака-резуса или яванского макака или PD-L1 мыши, на их клеточной поверхности. Другие подходящие клетки для применения в анализе методом проточной цитометрии включают анти-CD3-стимулированные-CD4+-активированные Т-клетки, экспрессирующие нативный PD-L1. Другие подходящие методы исследования связывания включают анализ ELISA, например с использованием рекомбинантного белка PD-L1. Дополнительно или альтернативно связывание антитела, включая кинетику связывания (например, значение K_D), можно протестировать в анализе Biacore. Предпочтительные аффинности связывания антитела по настоящему изобретению включают таковые с константой диссоциации или K_D $4,25 \times 10^{-9}$ М или менее.

При условии, что каждое из этих антител может связываться с PD-L1, таким как

PD-L1 человека, последовательности CDR или последовательности VH и VL могут быть “смешаны и подобраны” для создания других анти-PD-L1-связывающих молекул по настоящему изобретению. Предпочтительно, когда последовательности CDR или цепей VH и VL смешаны и подобраны, например последовательность VH из определенной пары VH/VL заменена на структурно похожую последовательность VH. Аналогично предпочтительно последовательность VL из определенной пары VH/VL заменена на структурно похожую последовательность VL.

Анти-В7-Н3 антитело

Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-В7-Н3 антитело может содержать анти-В7-Н3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве В7-Н3-нацеливающей группировки. Анти-В7-Н3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может специфически распознавать В7-Н3 человека и демонстрирует перекрестную реактивность в отношении В7-Н3 обезьяны и мыши. Анти-В7-Н3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может ингибировать или блокировать иммунную контрольную точку В7-Н3, таким образом реактивируя Т-клетку, активность которой ослаблена или ингибирована иммунной контрольной точкой В7-Н3. Следовательно, антитело или антигенсвязывающий фрагмент можно с пользой применять для реактивации Т-клетки, ингибированной иммунной контрольной точкой В7-Н3, и лечения различных заболеваний, требующих реактивации, путем такого ингибирования иммунной контрольной точки В7-Н3.

В7-Н3 (гомолог 3 В7, CD276), распознаваемый антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанными здесь, может относиться к трансмембранному белку семейства В7, принадлежащему суперсемейству иммуноглобулинов (Ig), и содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. В7-Н3, распознаваемый антителом, может представлять собой внеклеточный домен, присутствующий в клеточной мембране или не присутствующий в клеточной мембране. В7-Н3, распознаваемый антителом, может представлять собой внеклеточный домен, присутствующий в клеточной мембране или не присутствующий в клеточной мембране. Белок В7-Н3 человека состоит из 534 аминокислот, и он раскрыт в референсной последовательности NCBI: NP_001019907.1. Если это очевидно не противоречит используемому здесь контексту, В7-Н3 относится к В7-Н3 человека, но это антитело обладает связывающей способностью в отношении В7-Н3 обезьяны и мыши в частности. Белок В7-Н3 обезьяны состоит из 534 аминокислот, и он раскрыт в

референсной последовательности NCBI: XP_005560056.1. Белок В7-Н3 мышцы состоит из 316 аминокислот, и он раскрыт в референсной последовательности NCBI: NP_598744.1.

Раскрытое здесь анти-В7-Н3 антитело представляет собой полипептид, содержащий одну или более чем одну область, определяющую комплементарность, или участок, определяющий комплементарность (CDR), как раскрыто здесь.

Антитело специфически связывается с внеклеточным доменом В7-Н3, имеющим происхождение из человека, обезьяны и мыши, и оно может специфически связываться с выделенной формой внеклеточного домена или внеклеточным доменом В7-Н3, экспрессированным на поверхности клетки.

Анти-В7-Н3 антитело или его фрагмент может содержать: (1) VH CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 21, 22 и 23; (2) VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28 и 29, и (3) VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33 и 34; (4) VL CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38 и 39; (5) VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44 и 45, и (6) VL CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 47, 48, 49 и 50.

Аминокислотные последовательности CDR анти-В7-Н3, предназначенные для включения в переменные области тяжелой цепи и легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно одному воплощению настоящего изобретения, представлены в Таблице ниже.

Таблица 3

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR1	DYAMS	20
	GYYSMS	21
	SYSMS	22
	SYGMS	23
VH CDR2	SISSGSGSIYYADSVKG	24
	LISPSSGSIYYADSVKG	25
	GIYSDGSNTYYADSVKG	26
	GISPGGSNTYYADSVKG	27
	GIYSGGSSKYYADSVKG	28
	GIYSDASNTYYADSVKG	29

VH CDR3	NLIPLDY	30
	GLTKFDY	31
	MLHRFDY	32
	DAWIARLLLFDY	33
	NRLRFDY	34
VL CDR1	SGSSSNIGSNAVS	35
	TGSSSNIGSNDVS	36
	SGSSSNIGSNSVT	37
	SGSSSNIGSNAVT	38
	TGSSSNIGSNSVT	39
VL CDR2	YNSHRPS	40
	ANSHRPS	41
	ADSQRPS	42
	YNNKRPS	43
	SDSHRPS	44
	ADVQRPS	45
VL CDR3	GSWDASLNAYV	46
	GSWDDSLSGYV	47
	GTWDDSLNAYV	48
	GTWDDSLSGYV	49
	GTWDASLNAYV	50

В некоторых воплощениях антитело или его фрагмент включает не более чем одну, не более чем две или не более чем три из описанных выше замен. В некоторых воплощениях антитело или его фрагмент включает VH CDR1 SEQ ID NO: 20 или 21, VH CDR2 SEQ ID NO: 24 или 25, VH CDR3 SEQ ID NO: 30 или 31, VL CDR1 SEQ ID NO: 35 или 36, VL CDR2 SEQ ID NO: 40 или 41 и VL CDR3 SEQ ID NO: 46 или 47.

Например, анти-B7-H3 антитело или его фрагмент может содержать VH CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или 21; VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или 25; VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 или 31; VL CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35 или 36; VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 или 41, и VL CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46 или 47.

В одном воплощении CDR каждой переменной области легкой цепи и CDR каждой переменной области тяжелой цепи, раскрытые в Таблице, представленной выше,

можно комбинировать свободно.

В одном воплощении в качестве примеров переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащего последовательности CDR легкой цепи и тяжелой цепи, можно привести представленные в следующей Таблице ниже.

Таблица 4

Последовательность переменной области тяжелой цепи (VH)	SEQ ID NO
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISSGSGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNLIPLDYWGQGTLVTVSS	51
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYYMSWVRQAPGKGLEWVSLISPSSGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLTKFDYWGQGTLVTVSS	52
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKGLEWVSGIYSDGSNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKMLHRFDYWGQGTLVTVSS	53
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISPGGSNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDAWIARLLLFDYWGQGTLVTVSS	54
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVSGIYSGGSSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNRLRFDYWGQGTLVTVSS	55
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKGLEWVSGIYSDASNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKMLHRFDYWGQGTLVTVSS	56
Последовательность переменной области легкой цепи (VL)	SEQ ID NO
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNVSWYQQLPGTAPKLLIYNSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDASLNAYVFGGGTKLTVL	57
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLIYANSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDDSLSGYVFGGGTKLTVL	58
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNSVTWYQQLPGTAPKLLIYADSRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDDSLNAYVFGGGTKLTVL	59
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNVSWYQQLPGTAPKLLIYNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDDSLSGYVFGGGTKLTVL	60
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNSVTWYQQLPGTAPKLLIYSDSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWASLNAYVFGGGTKLTVL	61

TKLTVL	
QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGSNSVTWYQQLPGTAPKLLIYADV QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDSSLNAYVFGGGT KLTVL	62

В другом воплощении переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, раскрытые в Таблице выше, можно свободно комбинировать для получения различных форм антител, и, например, можно получить одиночное антитело, такое как scFv, или доменное антитело.

Каждая из переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, раскрытых здесь, может связываться с нацеливающими различными константными областями тяжелых цепей и легких цепей с образованием тяжелой цепи и легкой цепи интактного антитела, соответственно. Дополнительно каждую из последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи, связанную с константными областями таким образом, также можно комбинировать с образованием структуры интактного антитела.

Любая переменная область тяжелой цепи и легкой цепи антитела может быть соединена по меньшей мере с частью константных областей. Константные области могут быть выбраны в соответствии с тем, требуется ли антитело-зависимая клеточная цитотоксичность, антитело-зависимый фагоцитоз клетки и/или комплемент-зависимая цитотоксичность и так далее. Например, изоотипы IgG1 и IgG3 человека обладают комплемент-зависимой цитотоксичностью, и изоотипы IgG2 и IgG4 человека не обладают цитотоксичностью. IgG1 и IgG3 человека также индуцируют клеточно-опосредованную функцию эффектора сильнее, чем IgG2 и IgG4 человека. Например, переменная область тяжелой цепи может связываться с константной областью IgG, такой как IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 и IgG4, и переменная область легкой цепи может связываться с константной областью каппа или лямбда. Для константной области можно использовать одну подходящую по желанию, и, например, можно использовать таковую, имеющую происхождение из человека или мыши. В одном воплощении используют константную область тяжелой цепи IgG1 человека, и она может быть представлена последовательностью SEQ ID NO: 157. В другом воплощении в качестве константной области легкой цепи используют область лямбда человека, и она может быть представлена SEQ ID NO: 161.

Любая раскрытая здесь переменная область может быть связана с константной областью, тем самым образуя последовательности тяжелой цепи и легкой цепи. В одном

воплощении раскрытая здесь переменная область тяжелой цепи может быть связана с константной областью IgG1 человека с образованием тяжелой цепи (полноразмерной), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 282 - 286 и 292, или по существу состоящей из таковой. В другом воплощении раскрытая здесь переменная область легкой цепи может быть связана с константной областью лямбда человека с образованием легкой цепи (полноразмерной), содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 287 - 291 и 293, или по существу состоящей из таковой. Легкую цепь и тяжелую цепь можно комбинировать в форме различных комбинаций, тем самым образуя интактное антитело, состоящее из двух легких цепей и двух тяжелых цепей.

В другом воплощении антитело может содержать комбинацию тяжелой цепи и легкой цепи, которая представлена следующей последовательностью: SEQ ID NO: 282 и 287; SEQ ID NO: 283 и 288; SEQ ID NO: 284 и 289; SEQ ID NO: 285 и 290; SEQ ID NO: 286 и 291; SEQ ID NO: 292 и 289 или SEQ ID NO: 292 и 293, или по существу состоять из таковой.

Однако такие последовательности константных областей для комбинирования с раскрытыми здесь переменными областями являются примерами, и специалист в данной области техники понимает, что можно использовать другие константные области, включающие константную область тяжелой цепи IgG1, IgG3 или константную область тяжелой цепи IgG4, любую константную область каппа или лямбда легкой цепи, константные области, модифицированные для стабильности, экспрессии, технологичности или других желаемых свойств.

В некоторых воплощениях антигенсвязывающий фрагмент анти-B7-H3 антитела может представлять собой любой фрагмент, содержащий CDR тяжелой цепи и/или CDR легкой цепи антитела, и, например, он может быть выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd (содержащего переменную область тяжелой цепи и домен CH1), Fv (переменная область тяжелой цепи и/или переменная область легкой цепи), одноцепочечного Fv (scFv; содержащего переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи, в любом порядке, и пептидный линкер между переменной областью тяжелой цепи и переменной областью легкой цепи, или по существу состоящего из таковых), одноцепочечных антител, связанных дисульфидными связями Fv (sdFv), scFab (одноцепочечный Fab), scFab-Fc (содержащего scFab и Fc-фрагмент), полу-IgG (содержащего одну легкую цепь и одну тяжелую цепь) и им

подобного, но без ограничения ими.

Настоящее изобретение включает одну или более чем одну аминокислотную последовательность, имеющую существенную степень идентичности последовательности с одной или более чем одной раскрытой здесь аминокислотной последовательностью. Существенная степень идентичности означает поддержание раскрытого здесь эффекта при наличии изменения в последовательности. В одном воплощении она примерно на 90%, 95% или 99% идентична вариабельным областям тяжелой цепи, раскрытым в Таблице 4. В другом воплощении она примерно на 90%, 95% или 99% идентична вариабельным областям легкой цепи, раскрытым в Таблице 4. Например, в случае варианта, демонстрирующего 90%, 95% или 99% идентичности с раскрытым здесь антителом или антигенсвязывающим фрагментом, любое изменение происходит в каркасе вариабельных областей, кроме CDR.

Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело

В одном воплощении в мультиспецифическом антителе, содержащем PD-L1-нацеливающую группировку и B7-H3-нацеливающую группировку, одна из PD-L1-нацеливающей группировки и B7-H3-нацеливающей группировки может представлять собой полноразмерное антитело, и другая может представлять собой антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), содержащий CDR тяжелой цепи, CDR легкой цепи или их комбинацию. Полноразмерное антитело, нацеленное на один из белков PD-L1 и B7-H3, и антигенсвязывающий фрагмент, нацеленный на другой из этих белков, могут быть химически соединены (например, ковалентно связаны) прямо или через пептидный линкер. Антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) может быть присоединен прямо или через пептидный линкер к N-концу полноразмерного антитела (например, N-концу легкой цепи или тяжелой цепи полноразмерного антитела), C-концу полноразмерного антитела (например, C-концу тяжелой цепи (или Fc или CH3-домену) полноразмерного антитела) или к ним обоим (см. Фиг. 1a).

В одном воплощении мультиспецифическое антитело может содержать полноразмерное анти-PD-L1 антитело, антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) анти-B7-H3 антитела и пептидный линкер между ними. В другом воплощении мультиспецифическое антитело может содержать полноразмерное анти-B7-H3 антитело, антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) анти-PD-L1 антитела и пептидный линкер между ними (см. Фиг. 1a).

В одном воплощении scFv, содержащийся в мультиспецифическом антителе,

может содержать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи в любом порядке. Например, scFv, содержащийся в мультиспецифическом антителе, может содержать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи в направлении от N-конца к C-концу, и возможно пептидный линкер между ними, или, альтернативно, scFv, содержащийся в мультиспецифическом антителе, может содержать переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи в направлении от N-конца к C-концу, и возможно пептидный линкер между ними.

scFv может содержать дополнительную модификацию (мутацию аминокислот в положении VL100 и VH44 scFv на цистеин) для образования дисульфидного мостика, сшивающего VL100-VH44 с переменной легкой цепью и переменной тяжелой цепью, соответственно, для стабилизации scFv.

Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по настоящему изобретению может представлять собой антитело в форме IgG X scFv, которое также может быть обозначено как “антитело формата 2+2”. Антитело в форме IgG X scFv может иметь структуру, в которой scFv соединен с C-концом каждого Fc-фрагмента тяжелых цепей полноразмерного антитела IgG через линкер (см. Фиг. 1a), и содержать Тяжелый Компонент и Легкий Компонент.

Как его используют здесь, термин “Тяжелый Компонент” обозначает компонент мультиспецифического анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитела согласно одному воплощению настоящего изобретения, содержащий: 1) тяжелую цепь анти-PD-L1 антитела и переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь анти-B7-H3 антитела, или 2) тяжелую цепь анти-B7-H3 антитела и переменную тяжелую цепь и переменную легкую цепь анти-PD-L1 антитела.

Как его используют здесь, термин “Легкий Компонент” обозначает компонент мультиспецифического анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитела согласно одному воплощению настоящего изобретения, содержащий: 1) легкую цепь анти-PD-L1 антитела, если Тяжелый Компонент содержит тяжелую цепь анти-PD-L1 антитела, или 2) легкую цепь анти-B7-H3, если Тяжелый Компонент содержит тяжелую цепь анти-B7-H3 антитела.

В другом воплощении в мультиспецифическом антителе, содержащем PD-L1-нацеливающую группировку и B7-H3-нацеливающую группировку, ни PD-L1-нацеливающая группировка, ни B7-H3-нацеливающая группировка не является полноразмерным антителом. В этом случае любая из PD-L1-нацеливающей группировки и B7-H3-нацеливающей группировки может содержать одну тяжелую цепь (HC) и одну

легкую цепь (LC), и другая может содержать scFab-Fc. Термин “scFab-Fc” обозначает структуру, содержащую scFab и соединенный с ним Fc. В этой структуре scFab может быть химически соединен (например, ковалентно связан) с Fc-фрагментом прямо или через пептидный линкер.

В одном воплощении мультиспецифическое антитело может содержать HC+LC (что также может носить название полу-IgG) анти-PD-L1 антитела и scFab-Fc анти-B7-H3 антитела. В другом воплощении мультиспецифическое антитело может содержать HC+LC анти-B7-H3 антитела и scFab-Fc анти-PD-L1 антитела. Эти типы мультиспецифических антител могут носить название антитела формы (HC + LC) X scFab-Fc или также “антитело формата 1+1”.

Другими словами, антитело формы (HC + LC) X scFab-Fc может иметь такую структуру, в которой любая одна ветвь (VH, CH1 и легкая цепь) антитела IgG заменена на scFab (VL-CL-VH-CH1 в порядке от N-конца к C-концу) (см. Фиг. 1б). C-конец scFab может быть соединен с N-концом цепи Fc через линкер. Другими словами, антитело формы (HC + LC) X scFab-Fc может содержать полу-IgG и scFab-Fc.

В одном воплощении антитело формата 1+1 может дополнительно содержать scFv на C-конце каждого Fc для образования триспецифического антитела. Триспецифическое антитело может иметь такую структуру, в которой scFv соединен с мультиспецифическим антителом формата 1+1 через линкер. scFv может связываться с мишенью, отличной от PD-L1 или B7-H3. Например, scFv может связываться с белком 4-1BB человека.

Термин “4-1BB”, относящийся к CD137 или TNFRSF9 (Член 9 Суперсемейства Рецептора TNF 25), представляет собой член суперсемейства TNF-рецептора (TNFRSF) и представляет собой костимулирующую молекулу, которая экспрессируется после активации иммунных клеток, клеток как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Как его используют здесь, 4-1BB может иметь происхождение от млекопитающего, например *Homo sapiens* (человека) (NCBI Accession No. NP_001552).

Использование пептидного линкера для мультиспецифического антитела может приводить к высокой чистоте антитела.

Как его используют здесь, термин “пептидный линкер” может обозначать последовательности, включающие от 1 до 100, особенно от 2 до 50 любых аминокислот, и любые типы аминокислот могут быть включены без ограничений. Пептидный линкер может включать, например, остатки Gly, Asn и/или Ser, и также включать нейтральные аминокислоты, такие как Thr и/или Ala. Аминокислотные последовательности,

подходящие для пептидного линкера, могут представлять собой такие, известные в данной области техники. Между тем, длина пептидного линкера может быть определена по-разному в таких пределах, чтобы функции слитого белка не изменялись. Например, пептидный линкер можно получить путем включения в общей сложности от примерно 1 до примерно 100, от 2 примерно до примерно 50 или от примерно 5 до примерно 25 аминокислот, выбранных из одной или более чем одной из группы, состоящей из Gly, Asn, Ser, Thr, и Ala. В одном воплощении пептидный линкер может быть представлен как (GmSl)_n (m, l и n независимо представляют собой целое число от примерно 1 до примерно 70, в частности целое число от примерно 1 до примерно 64). Например, примеры пептидных линкеров суммированы следующим образом:

Функция линкера	Примеры			
	Слитый белок	Линкер		
		Тип	Последовательность	Ref.
Увеличивает стабильность/ Фолдинг	scFv	гибкий	(GGGGS) ₃	[46]
	G-CSF-Tf	гибкий	(GGGGS) ₃	[20]
	HBsAg preS1	гибкий	(GGGGS) ₃	[85]
	Мус-Est2p	гибкий	(Gly) ₈	[30]
	Альбумин-ANF	гибкий	(Gly) ₆	[31]
	Белок оболочки вируса Бета-глюканаза-ксилаза	жесткий	(EAAAK) ₃	[50]
Увеличивает экспрессию	hGH-Tf и Tf-hGH	жесткий	A(EAAAK) ₄ ALEA(EAAAK) ₄ A	[18]
	G-CSF-Tf и Tf-G-CSF	жесткий	A(EAAAK) ₄ ALEA(EAAAK) ₄ A	[18]
Улучшает Биологическую активность	G-CSF-Tf	гибкий	(GGGGS) ₃	[20]
	G-CSF-Tf	жесткий	A(EAAAK) ₄ ALEA(EAAAK) ₄ A	[20]
	hGH-Tf	жесткий	A(EAAAK) ₄ ALEA(EAAAK) ₄ A	[40]
	HSA-IFN-a2b	гибкий	GGGGS	[17]
	HSA-IFN-a2b	жесткий	PAPAP	[17]
	HSA-IFN-a2b	жесткий	AEAAAKEAAKA	[17]
	PGA-rTHS	гибкий	(GGGGS) _n (n=1,2,4)	[55]
	Интерферон- gp120	жесткий	(Ala-Pro) _n (10-34 а.к.)	[54]
Обеспечивает нацеливание	GSF-S-S-Tf	расщепляемый	дисульфид	[39]
	IFN-a2b-HSA	расщепляемый	дисульфид	[42]
Обеспечивает нацеливание	FIX-альбумин	расщепляемый	VSQTSKLTR AETVFPDV ^b	[59]
	LAP-IFN-	расщепляемый	PLG LWA ^c	[64]
	MazE-MazF	расщепляемый	RVL AEA; EDVVCC SMSY; GGIEGR GS ^c	[68]
	Иммунотоксины	расщепляемый	TRHRQPR GWE; AGNRVRR SVG;	[72]

	Иммунотоксин	расщепля- емый	RRRRRRR R R ^d GFLG ^e	[77]
Изменяет РК	G-CSF-Tf и hGH-Tf	дипептид	LE	[79]
		жесткий расщепля- емый	A(EAAAK) ₄ LEA(EAAAK) ₄ A Дисульфид	

Гетеродимеризацию двух тяжелых цепей в мультиспецифическом антителе (формата 2+2 или формата 1+1) можно облегчить путем применения технологии “выступы-во-впадину”. Например, мутация-“выступ” (T366W) была введена в домен СНЗ тяжелой цепи, и три мутации для образования “впадины” (T366S, L368A и Y407V) были введены в домен СНЗ другой тяжелой цепи.

В другом воплощении как PD-L1-нацеливающая группировка, так и B7-H3-нацеливающая группировка могут представлять собой полноразмерное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий CDR тяжелой цепи, CDR легкой цепи или их комбинацию.

В одном воплощении полноразмерное антитело может находиться в форме полноразмерного иммуноглобулина (например, IgG, IgM, IgA, IgE или IgD, такого как IgG человека, IgM человека, IgA человека, IgE человека или IgD человека), и антигенсвязывающий фрагмент может быть выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv, одноцепочечных антител, sdFv, scFab (одноцепочечный Fab), scFab-Fc (содержащего scFab и Fc-фрагмент), полу-IgG (содержащего одну легкую цепь и одну тяжелую цепь) и им подобного, как описано выше. Например, полноразмерное антитело может быть в форме полноразмерного IgG человека (IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека или IgG4 человека), и антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой scFv.

Например, описанное здесь антитело может содержать гибкую линкерную последовательность или может быть модифицировано с добавлением функциональной группировки (например, PEG (полиэтиленгликоль), лекарственного средства, токсина или метки).

Описанные здесь антитела или варианты могут содержать производные, модифицированные, например, путем ковалентного присоединения любого типа молекулы к антителу, так чтобы ковалентное присоединение не препятствовало связыванию антитела с антигеном (например, эпитопом). Например, но не для ограничения, антитела

могут быть модифицированы, например, по меньшей мере одним способом, выбранным из группы, состоящей из гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации с использованием известных защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления, соединения с клеточным лигандом или другим белком и тому подобного. Любую из многочисленных химических модификаций можно выполнять известными методами, включая специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и так далее, но без ограничения ими. Дополнительно антитела могут содержать одну или более чем одну неклассическую аминокислоту.

Связывающую специфичность и/или афинность мультиспецифического антитела к каждому целевому белку можно определить любым традиционным методом, например методами анализа *in vitro*, такими как иммунопреципитация, радиоиммуноанализ (RIA) или ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), но без ограничения ими.

Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител, имеющие происхождение от антител видов, не являющихся человеком, которые связываются с желаемым антигеном, имеющие одну или более чем одну область, определяющую комплементарность (CDR), от видов, не являющихся человеком, и каркасные области из молекулы иммуноглобулина человека. Часто каркасные остатки человеческих каркасных областей заменены на соответствующие остатки из антитела-донора CDR для изменения, предпочтительно улучшения, связывания с антигеном.

Дополнительно стандартные методики, известные специалисту в данной области техники, можно использовать для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело по настоящему изобретению.

Терапевтическое применение мультиспецифического антитела

Предложенное здесь мультиспецифическое антитело способно одновременно блокировать активности PD-L1 и B7-H3, таким образом оказывая улучшенное действие при иммунотерапиях и/или лечениях рака, например путем активации иммунного ответа. С учетом способности мультиспецифических антител по настоящему изобретению ингибировать связывание молекул PD-L1 к PD-1 и стимулировать ответы антиген-специфических Т-клеток, в изобретении также предложена композиция или способы применения антител по настоящему изобретению *in vitro* и *in vivo* для стимуляции, усиления или повышающей регуляции ответов антиген-специфических Т-клеток.

В одном воплощении предложена фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическое антитело как описано выше. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическую композицию можно использовать для стимуляции иммунного ответа (например, ответа антиген-специфических Т-клеток) и/или лечения и/или предупреждения заболевания, ассоциированного с PD-L1, B7-H3 или ими обоими.

В другом воплощении предложен способ стимуляции иммунного ответа (например, ответа антиген-специфических Т-клеток), и/или лечения, и/или предупреждения заболевания, ассоциированного с PD-L1, B7-H3 или ими обоими, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту фармацевтически эффективного количества указанных мультиспецифического антитела или фармацевтической композиции. Способ может дополнительно включать этап идентификации субъекта, нуждающегося в лечении и/или предупреждении заболевания, ассоциированного с PD-L1, B7-H3 или ими обоими, до стадии введения.

Заболевание, ассоциированное с PD-L1, B7-H3 или ими обоими может быть выбрано из рака (или опухолей), инфекционных заболеваний, аутоиммунных реакций, расстройств нервной системы и им подобных.

В одном воплощении субъект может быть выбран из млекопитающих, включая человека, например млекопитающих (например, человека), страдающих от раковых клеток млекопитающих. В другом воплощении субъект может представлять собой клетку, отделенную от (выделенную из) млекопитающего, например млекопитающего, страдающего от заболевания, выбранного из рака, инфекционных заболеваний, аутоиммунных реакций, расстройств нервной системы и им подобных (например, раковую клетку или клетку, отделенную от (выделенную из) инфицированной области млекопитающего, или Т-клетку, такую как инфильтрующий опухоль Т-лимфоцит, CD4+ Т-клетка, CD8+ Т-клетка или их комбинацию).

В другом воплощении предложено применение указанных мультиспецифического антитела или фармацевтической композиции в лечении и/или предупреждении рака. В другом воплощении предложено применение указанного мультиспецифического антитела в изготовлении фармацевтической композиции для лечения и/или предупреждения рака.

В предложенных здесь фармацевтических композициях, способах и/или применениях заболевание, ассоциированное с PD-L1, B7-H3 или ими обоими, может представлять собой заболевание, связанное с активацией (например, патологической

активацией или сверхактивацией) и/или сверхпродукцией (сверхэкспрессией) PD-L1, B7-Н3 или их обоих. Например, заболевание может представлять собой рак.

Рак может представлять собой солидный рак или рак крови, предпочтительно солидный рак, включая рак молочной железы, рак почки, рак яичника, рак желудка, рак печени, рак легкого, рак легкого, рак ободочной и прямой кишки, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак мочевого пузыря, рак яичка, рак матки, рак предстательной железы, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), нейробластома, рак головного мозга, рак толстой кишки, плоскоклеточную карциному, меланому, миелому, рак шейки матки, рак щитовидной железы, рак головы и шеи и рак надпочечника, но без ограничения ими,

Введение мультиспецифического антитела можно выполнять одним или более чем одним методом, хорошо разработанным в данной области техники.

“Терапевтически эффективная дозировка” антитела по настоящему изобретению предпочтительно приводит к уменьшению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждению ухудшения состояния или недееспособности вследствие поражения, вызванного заболеванием. Например, для лечения субъекта, имеющего опухоль, “терапевтически эффективная дозировка” предпочтительно ингибирует рост опухоли по меньшей мере примерно на 20%, более предпочтительно по меньшей мере примерно на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере примерно на 60% и еще более предпочтительно по меньшей мере примерно на 80% относительно опухолей субъектов, не подвергающихся лечению. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может уменьшать размер опухоли или другим образом улучшать симптомы у субъекта, который обычно является человеком или может представлять собой другое млекопитающее.

Фармацевтические композиции могут содержать эффективное количество мультиспецифического антитела и приемлемый носитель. В некоторых воплощениях композиция дополнительно включает второй противораковый агент (например, ингибитор иммунной контрольной точки).

В определенном воплощении термин “фармацевтически приемлемый” может относиться к одобренному регулирующим ведомством федерального или государственного правительства или перечисленному в Фармакопее США или другой общепринятой фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у человека. Далее “фармацевтически приемлемый носитель” обычно представляет собой нетоксичный(ое)

твердый(ое), полутвердый(ое) или жидкий(ое) наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательное вещество любого типа в композиции.

Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель представляет собой таковой, традиционно используемый в изготовлении композиции.

Диагностическое применение мультиспецифического антитела

Сверхэкспрессия и/или сверхактивация PD-L1 и/или B7-H3 наблюдается в биологическом образце (например, клетках, тканях, крови, сыворотке и так далее) от пациента, страдающего от определенного типа рака (например, опухолевой клетки), и/или пациенты, имеющие клетки, сверхэкспрессирующие PD-L1- и/или B7-H3, вероятно, будут восприимчивы к лечению мультиспецифическим антителом. Соответственно, мультиспецифическое антитело по настоящему изобретению также можно использовать для диагностических и прогностических целей.

В одном воплощении предложена фармацевтическая композиция для диагностики заболевания, ассоциированного с PD-L1, B7-H3 или ими обоими, содержащая указанное мультиспецифическое антитело. В другом воплощении предложено применение указанного мультиспецифического антитела для диагностики заболевания, ассоциированного с PD-L1, B7-H3 или ими обоими.

Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения этих антител

В одном воплощении предложен полинуклеотид, кодирующий указанное мультиспецифическое антитело. В частности, в одном воплощении предложен полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь мультиспецифического антитела в форме IgG X scFv. В другом воплощении предложен полинуклеотид, кодирующий легкую цепь мультиспецифического антитела в форме IgG X scFv. Форма IgG X scFv может относиться к типу мультиспецифического антитела, содержащего полноразмерное антитело IgG, нацеленное на один из (связывающееся с одним из) белков PD-L1 и B7-H3, и scFv-фрагмент, нацеленный на другой (связывающееся с другим) из них, где scFv соединен с C-концом и/или N-концом полноразмерного антитела IgG прямо (без пептидного линкера) или через пептидный линкер.

В одном воплощении, когда мультиспецифическое антитело в форме IgG X scFv содержит полноразмерное антитело IgG к PD-L1 и scFv-фрагмент к B7-H3, полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь мультиспецифического антитела, может кодировать тяжелую

цепь полноразмерного антитела IgG к PD-L1 и scFv-фрагмент к B7-H3, соединенный с C-концом и/или N-концом полноразмерного антитела IgG прямо или через пептидный линкер; и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь мультиспецифического антитела, может кодировать легкую цепь полноразмерного антитела IgG к PD-L1.

В другом воплощении, когда мультиспецифическое антитело в форме IgG X scFv содержит полноразмерное антитело IgG к B7-H3 и scFv-фрагмент к PD-L1, полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь мультиспецифического антитела, может кодировать тяжелую цепь полноразмерного антитела IgG к B7-H3 и scFv-фрагмент к PD-L1, соединенный с C-концом и/или N-концом полноразмерного антитела IgG прямо или через пептидный линкер; и полинуклеотид, кодирующий легкую цепь мультиспецифического антитела, может кодировать легкую цепь полноразмерного антитела IgG к B7-H3.

В частности, в одном воплощении предложен полинуклеотид, кодирующий антитело формы (HC + LC) X scFab-Fc (антитело формата 1+1). Антитело формы (HC + LC) X scFab-Fc может иметь такую структуру, что одна ветвь (VH, CH1 и легкая цепь) антитела IgG заменена на scFab (VL-CL-VH-CH1 в порядке от N-конца к C-концу). C-конец scFab может быть соединен с N-концом цепи Fc через линкер. Термин “scFab-Fc” обозначает структуру, содержащую scFab и связанный с ним Fc. Другими словами, антитело формы (HC + LC) X scFab-Fc может содержать полу-IgG (одна тяжелая цепь и одна легкая цепь) и scFab-Fc.

В частности, в одном воплощении предложен полинуклеотид, кодирующий триспецифическое антитело. Триспецифическое антитело может иметь такую структуру, что scFv соединен с мультиспецифическим антителом формата 1+1 через линкер. scFv может связываться с мишенью, отличной от PD-L1 или B7-H3. Например, scFv может связываться с белком 4-1BB человека.

В другом воплощении предложен рекомбинантный вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь мультиспецифического антитела, полинуклеотид, кодирующий легкую цепь мультиспецифического антитела, или оба таких полинуклеотида. В другом воплощении предложена рекомбинантная клетка (хозяин), трансфицированная рекомбинантным вектором.

В другом воплощении предложен способ получения указанного мультиспецифического антитела, включающий экспрессию полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь мультиспецифического антитела, полинуклеотида, кодирующего легкую цепь мультиспецифического антитела в клетке. Стадию экспрессии полинуклеотида

можно осуществлять путем культивирования клетки, содержащей полинуклеотид (например, в рекомбинантном векторе) в условиях, обеспечивающих экспрессию этого полинуклеотида. Способ может дополнительно включать выделение и/или очистку мультиспецифического антитела из клеточной культуры после стадии экспрессии или культивирования.

ПРИМЕРЫ

Здесь и далее настоящее изобретение будет описано более подробно с помощью примеров.

Следующие примеры предназначены исключительно для иллюстрации изобретения и не предназначены ограничивать объем изобретения.

Пример 1: Получение моноклональных анти-PD-L1 антител

1.1. Получение моноклональных антител мыши к PD-L1 человека и их анализ

Моноклональные антитела мыши к PD-L1 человека были получены с помощью гибридомной технологии, как раскрыто в публикации международной заявки WO2017-215590.

Аминокислотные и полинуклеотидные последовательности переменных областей супернатантов гибридом, получивших название Гибридома HL1210-3, представлены в Таблице ниже.

【Таблица 5】

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
HL1210-3 VH	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYDMSWVRQTPEKS LEWVATISDGGGYIYSDSVKGRFTISRДHKKNLQMSLRSE DTALYICAREFGKRYALDYWGQGTSTVTVSS	63
HL1210-3 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSISCKASQDVTPAVAWYQQKPGQSP KLLIYSTSSRYTGVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLAVYYCQQ HYTTPLTFGAGTKLELK	64
Название	Последовательность нуклеиновой кислоты	SEQ ID NO:
HL1210-3 VH	GAAGTGAAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCT GGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTT TCAGTAGCTATGACATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCGGAGAA GAGTCTGGAGTGGGTTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTGGTTAC ATCTACTATTTCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTTACCATCTCCAG AGACAATGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCT GAGGTCTGAGGACACGGCCTTGTATATTTGTGCAAGAGAATTT	65

	GGTAAGCGCTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	
HL1210-3 VL	GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCGGTAGGAGACAGGGTCAGCATCTCCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGACTCCTGCTGTGCGCCTGGTATCAACAGAAGCCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTACTCCACATCCTCCCGGTACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAACATTATACTACTCCGCTCACGTTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	66

1.2. Гуманизация mAb мыши HL1210-3

Гены варибельной области mAb HL1210-3 использовали для создания гуманизованного Mab методами, обычно используемыми в данной области техники, и как раскрыто в публикации международной заявки WO 2017-215590.

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности некоторых из полученных в результате гуманизованных антител представлены в SEQ ID NO. 67 - SEQ ID NO. 120.

Гены гуманизованных VH и VK (VL каппа) получали синтетическим путем и затем соответственно клонировали в векторы, содержащие константные домены гамма 1 человека и каппа человека. Составление пар VH человека и VK человека привело к созданию 40 гуманизованных антител (см. Таблицы 6 - 9).

【Таблица 6】

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

【Таблица 7】

VH VK	Hu1210 VH.3	Hu1210 VH.3a	Hu1210 VH.4	Hu1210 VH.4a	Hu1210 VH.4b
Hu1210 VK.1	Hu1210-13	Hu1210-14	Hu1210-15	Hu1210-16	Hu1210-17

Hu1210 VK.1a	Hu1210-18	Hu1210-19	Hu1210-20	Hu1210-21	Hu1210-22
-------------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

【Таблица 8】

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

【Таблица 9】

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

1.3. Получение полноразмерного анти-PD-L1 антитела человека

Также осуществляли скрининг фаговой библиотеки в отношении полноразмерного анти-PD-L1 антитела человека.

Антиген: белок внеклеточного домена PD-L1 человека (ECD), меченный avi-His-biotin (B3568B, Biointron).

Получение полностью человеческой “наивной” фаговой библиотеки: фаговую библиотеку конструировали с использованием фагмидных векторов, состоящих из фрагментов генов антител, амплифицированных из РВМС (моноклеарные клетки периферической крови) здоровых субъектов-людей. Она была сконструирована как Fab-фаговая библиотека. Размер библиотеки составил 2×10^{11} .

Пэннинг раствора фаговой библиотеки к белку PD-L1 ECD. Сначала фаговые библиотеки подвергали отрицательному скринингу путем инкубирования с покрытыми BSA (бычий сывороточный альбумин) стрептавидиновыми “Dynabeads”. Полученные в

результате фаги инкубировали с белком PD-L1-ECD-avi-his-biotin и промывали с помощью системы магнитных частиц “Kingfisher”. Связывающие вещества элюировали трипсином. Затем элюированные фаги (выход 1) тестировали на предмет их титра связывания антигена и совместно культивировали с *E. coli*. Осуществляли три раунда пэннинга и скрининга. Титры выхода 2 и выхода 3 были значительно увеличены.

Отбирали самые лучшие единичные клоны из выхода 2 и 3 и затем культивировали их в 96-луночном планшете с глубокими лунками. Культуральный супернатант подвергали концентрированию IgG и оценке титра связывания антигена. Было отобрано и секвенировано 277 положительных клонов. Последующий анализ последовательностей выявил 128 уникальных последовательностей. Все эти клоны были подвергнуты анализу связывания ELISA. Было выявлено 17 лучших последовательностей, и был выбран клон B12. Шесть (6) последовательностей CDR B12 показаны в Таблице 10, и последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи B12 показаны в Таблице 11.

【Таблица 10】

B12	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR1	SYWMS	294
VH CDR2	NIKQDGSEKYYVDSVKG	295
VH CDR3	VALWDDAFDI	296
VL CDR1	RASRGISWLA	297
VL CDR2	KASSLES	298
VL CDR3	QQSSSIPLT	299

【Таблица 11】

B12	Последовательность	SEQ ID NO:
Вариабельная область тяжелой цепи (VH)	QVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYW MSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSV KGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RVALWDDAFDIWGQGTMTVSS	211
Вариабельная область легкой цепи (VL)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIITCRASRGISWLA WYQQKPGKAPNLLISKASSLES GVP SRFS GSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQSSSIPLTFGGGTK VEIK	209

1.4. Идентификация эпитопа PD-L1

Это исследование проводили для идентификации аминокислотных остатков антител по настоящему изобретению, вовлеченных в связывание с PD-L1.

Была сконструирована библиотека аланинового сканирования PD-L1. Коротко, 217 мутантных клонов PD-L1 было создано на платформе для белковой инженерии Integral Molecular. Определяли связывание Fab Hu1210-41 с каждым вариантом в библиотеке мутаций PD-L1 в двойных повторах методом высокопроизводительной проточной цитометрии. В каждой точке сырых данных вычитали фоновую флуоресценцию и нормализовали к реактивности PD-L1 дикого типа (WT). Для каждого варианта PD-L1 среднее значение связывания наносили на график как функцию экспрессии. Для идентификации предварительных критических клонов (круги, отмеченные крестиками) применяли пороговые уровни (штриховые линии) $>70\%$ WT связывания с контрольным МАb (MН1 Mab, изготовленными авторами изобретения) и $<30\%$ WT реактивности к Fab Hu1210-41 (Фиг. 3). Y134, K162 и N183 PD-L1 идентифицировали как требуемые остатки для связывания Hu1210-41. Низкая реактивность клона N183A в отношении Fab Hu1210-41 позволяет предположить, что он делает основной энергетический вклад в связывание с Hu1210-41, вклад Y134 и K162 меньше.

В структуре 3D PD-L1 были идентифицированы ключевые остатки (сферы), как показано на Фиг. 4. Следовательно, эти остатки, Y134, K162 и N183, составляют эпитопы PD-L1, ответственные за связывание с антителами согласно различным воплощениям настоящего изобретения.

Интересно отметить, что все из Y134, K162 и N183 расположены в пределах домена IgC белка PD-L1. Внеклеточные части как PD-1, так и PD-L1 имеют домен IgV и домен IgC. Общеизвестно, что PD-L1 связывается с PD-1 путем связывания между их доменами IgV. Однако в отличие от такого стандартного антитела Hu1210-41 связывается с доменом IgC, который, как ожидали, будет неэффективным в ингибировании связывания PD-1/PD-L1. Неожиданно оказалось, что этот отличный эпитоп Hu1210-41 вероятно вносит вклад в превосходную активность Hu1210-41.

1.5. Конструирование анти-PD-L1 антитела

Задача примеров 1.5 заключалась в выявлении дополнительно улучшенных антител на основе Hu1210-41 с использованием мутагенеза.

Было сконструировано четыре суб-библиотеки для конструирования

моноклонального анти-PD-L1 антитела с использованием любой из следующих стратегий. Согласно стратегии 1 мутагенез вариабельного домена тяжелой цепи VH CDR3 или VL-CDR3 выполняли путем в высокой степени случайной мутации. Согласно стратегии 2 две библиотеки комбинаций CDR, составленных из (VH-CDR3, VL-CDR3 и VL-CDR1) или (VH-CDR1, VH-CDR2 и VL-CDR2) были созданы путем прогулок по CDR с контролируемым уровнем мутаций.

Био-пэннинг: Методы фагового пэннинга адаптировали путем укорачивания времени инкубации/связывания до помещения в условия грубой промывки. Коротко, 100 мкл магнитных стрептавидиновых бусин (Invitrogen, USA) блокировали 1 мл MPBS в течение 1 ч при комнатной температуре. В другой пробирке осуществляли предварительную инкубацию библиотечного фага ($5 \times 10^{11-12}$ на каждый раунд) со 100 мкл магнитных стрептавидиновых бусин в 1 мл MPBS для удаления нежелательных связывающих веществ. Концентратор магнитных частиц использовали для разделения фага и бусин. Биотинилированный белок PD-L1 добавляли к фагу и инкубировали 2 ч при комнатной температуре и осторожно перемешивали с использованием переворачивающей мешалки. Бусины, несущие фаг из раствора, отделяли в концентраторе магнитных частиц и супернатант отбрасывали. Бусины промывали свежим промывочным буфером, десять раз PBST (забуференный фосфатом физиологический раствор с твином) и десять раз PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор (pH7,4). Добавляли 0,8 мл 0,25% трипсина в PBS (Sigma, USA) и инкубировали в течение 20 мин при 37°C для элюции фага. Фаг на выходе титровали и отбирали для следующего раунда пэннинга, уменьшая концентрацию антигена от раунда к раунду.

Скрининг ELISA и ранжирование по уровню On/off

Клоны собирали и индуцировали исходя из желаемого выхода пэннинга; фаговый анализ ELISA осуществляли для первичного скрининга; положительные клоны анализировали путем секвенирования; были обнаружены уникальные “горячие точки”.

В Таблице ниже показаны идентифицированные мутации. Как показано ниже, остатки мутаций в “горячих точках” и/или их замены подчеркнуты.

【Таблица 12】

	CDR-H1 (SEQ ID No.)	CDR-H2 (SEQ ID No.)	CDR-H3 (SEQ ID No.)
WT (H12)	SYDMS (1)	TISDAGGYIYYSDSVKG (2)	EFGKRYALDY (4)
B3	SYDMS (1)	TISDAGGYIYYRDSVKG (3)	EFGKRYALDY (4)

C4	SYDMS (1)	TISDAGGYIYYRDSVKG (3)	EFGKRYALD <u>S</u> (6)
B1	SYDMS (1)	TISDAGGYIYYRDSVKG (3)	E <u>I</u> FNRYALDY (7)
B6	SYDMS (1)	TISDAGGYIYYRDSVKG (3)	E <u>L</u> PWRYALDY (5)
C3	SYDMS (1)	TISDAGGYIYYRDSVKG (3)	E <u>LH</u> FRYALDY (8)
C6	SYDMS (1)	TISDAGGYIYYRDSVKG (3)	E <u>LY</u> FRYALDY (9)
A1	SYDMS (1)	TISDAGGYIYYRDSVKG (3)	E <u>LLH</u> RYALDY (10)
A2	SYDMS (1)	TISDAGGYIYYRDSVKG (3)	E <u>LRGR</u> RYALDY (11)
A3	SYDMS (1)	TISDAGGYIYYRDSVKG (3)	EFGKRYALDY (4)
	CDR-L1 (SEQ ID No.)	CDR-L2 (SEQ ID No.)	CDR-L3 (SEQ ID No.)
WT	KASQDVTPAVA (12)	STSSRYT (15)	QQHYTTPLT (16)
B3	KA <u>K</u> QDVTPAVA (13)	STSSRYT (15)	<u>M</u> QHYTTPLT (17)
C4	KASQDV <u>W</u> PAVA (14)	STSSRYT (15)	QQH <u>S</u> TTPLT (18)
B1	KASQDVTPAVA (12)	STSSRYT (15)	QQHYTTPLT (16)
B6	KASQDVTPAVA (12)	STSSRYT (15)	QQHYTTPLT (16)
C3	KASQDVTPAVA (12)	STSSRYT (15)	QQHYTTPLT (16)
C6	KASQDVTPAVA (12)	STSSRYT (15)	QQHYTTPLT (16)
A1	KASQDVTPAVA (12)	STSSRYT (15)	QQHYTTPLT (16)
A2	KASQDVTPAVA (12)	STSSRYT (15)	QQHYTTPLT (16)
A3	KASQDVTPAVA (12)	STSSRYT (15)	QQH <u>S</u> DAPLT (19)

Аминокислотные последовательности переменных областей этих антител показаны в Таблице ниже.

【Таблица 13】

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
WT-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKS LEWVATISDAGGYIYSDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRDE DTAVYICAREFGKRYALDYWGQGTITVTVSS	121
WT-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQQKPGKAP KLLIYSTSSRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQH YTTPLTFGQGTKLEIK	122
B3-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKS LEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRDE DTAVYICAREFGKRYALDYWGQGTITVTVSS	123
B3-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAKQDVTPAVAWYQQKPGKAP KLLIYSTSSRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCMQH YTTPLTFGQGTKLEIK	124

C4-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKS LEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRDE DTAVYICAREFGKRYALDSWGQGTTVTVSS	125
C4-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVWPAVAWYQQKPGKAP KLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQH STPLTFGQGTKLEIK	126
B1-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSL EWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRDED TAVYICAREIFNRYALDYWGQGTTVTVSS	127
B1-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQQKPGKAPK LLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQHYT TPLTFGQGTKLEIK	128
B6-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSL EWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRDED TAVYICARELPWRYALDYWGQGTTVTVSS	129
B6-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQQKPGKAPK LLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQHYT TPLTFGQGTKLEIK	130
C3-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSL EWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRDED TAVYICARELHFRYALDYWGQGTTVTVSS	131
C3-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQQKPGKAPK LLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQHYT TPLTFGQGTKLEIK	132
C6-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSL EWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRDED TAVYICARELYFRYALDYWGQGTTVTVSS	133
C6-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQQKPGKAPK LLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQHYT TPLTFGQGTKLEIK	134
A1-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSL EWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRDED TAVYICARELLHRYALDYWGQGTTVTVSS	135
A1-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQQKPGKAPK LLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQHYT TPLTFGQGTKLEIK	136
A2-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSL EWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRDED TAVYICARELRGRYALDYWGQGTTVTVSS	137
A2-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQQKPGKAPK LLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQHYT TPLTFGQGTKLEIK	138
A3-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSL EWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRDED TAVYICAREFGKRYALDYWGQGTTVTVSS	139
A3-VK	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTPAVAWYQQKPGKAPK	140

LLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLQPEDIATYYCQQHSD APLTFGQGTKLEIK
--

【Таблица 14】

№. антитела	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO:
H12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGK SLEWVATISDAGGYIYYSDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLR DEDTAVYICAREFGKRYALDYWGQGTTVTVSS	141
B6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGK SLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSL RDEDTAVYICARELPWRYALDYWGQGTTVTVSS	142

【Таблица 15】

№. антитела	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO:
H12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTTPAVAWYQQKPGKA PKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLQPEDIATYYCQ QHYYTTPPLTFGQGTKLEIK	143
B6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVTTPAVAWYQQKPGKA PKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLQPEDIATYYCQ QHYYTTPPLTFGQGTKLEIK	144

1.6. Кинетика белка для PD-L1

В этом примере осуществляли ранжирование по аффинности с использованием Вiasore для анализа кинетики связывания гуманизированного антитела. Как показано в Таблице ниже, H12 и B6.

【Таблица 16】

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

Как показано в Таблице выше, протестированные анти-PD-L1 антитела демонстрировали высокую аффинность связывания с PD-L1.

Пример 2. Получение моноклональных анти-В7-Н3 антител

2.1. Получение моноклональных анти-В7-Н3 антител и их анализ

2.1.1. Получение антигена

Антиген, используемый для выполнения фагового дисплея для получения анти-В7-Н3 антитела приобретали и использовали. В случае В7-Н3 человека содержались аминокислоты в положениях 1-461 аминокислотной последовательности NP_001019907.1, и использовали рекомбинантный белок В7-Н3, с С-концом которого соединена гистидиновая метка (His tag) (2318-B3/CF, R&D Systems).

Антиген, сипользуемый для анализа ELISA, анализа SPR или анализа активности Т-клетки в следующих примерах, приобретали и использовали следующим образом. В случае В7-Н3 человека он содержал аминокислоты в положениях 1-461 аминокислотной последовательности NP_001019907.1, и использовали рекомбинантный белок В7-Н3, с С-концом которого соединена гистидиновая метка (His tag), и белок, в котором Fc-фрагмент IgG1 человека соединен с С-концом (Sino Biological, 11188-H02H).

2.1.2: Выполнение сортинга антител путем скрининга фаговой библиотеки

Получение фаговой библиотеки

После культивирования 2×10^{10} *E. coli*, имеющей ген из библиотеки scFv (одноцепочечный переменный фрагмент) человеческого происхождения (Mol. Cells OT, 225-235, February 28, 2009), способного к разнообразному связыванию с разнообразными антигенами, в среде, содержащей 2X YT (Amresco, J902-500G), 100 мкг/мл ампициллина и 2% глюкозы (sigma, G7021), при 37°C в течении от 2 часов до 3 часов значение OD600 составило от 0,5 до 0,7. После инфицирования культивируемой *E. coli* фагом-помощником, его культивировали в среде 2X YT [2X YT, 100 мкг/мл ампициллин, 1 mM IPTG (изопропилтиогалактозид) (Duchefa, I1401)] при 30°C в течение 16 часов и таким образом индуцировали упаковку фага. Затем после центрифугирования культивируемых клеток в условиях 4°C, 4500 об/мин в течение 20 минут к супернатанту добавляли 4% PEG 8000 (sigma, P2139) и 3% NaCl (Samchun, S2097) и хорошо растворяли, и затем осуществляли реакцию на льду в течение 1 часа. После повторного центрифугирования в условиях 4°C, 8000 об/мин к осадку добавляли PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор, Gibco 10010-023) и ресуспендировали его. После этого суспензию центрифугировали в условиях 4°C, 1200 об/мин в течение 10 минут, супернатант помещали в новую пробирку и

хранили его при 4°C до использования.

Пэннинг посредством фагового дисплея

Для сортировки антител, связывающихся с белком В7-Н3 человека, с использованием рекомбинантного белка В7-Н3, соединенного с гистидиновой меткой (His tag), из Примера 2, пэннинг осуществляли в общей сложности 3 раза следующим образом.

Более подробно, белок абсорбировали на поверхности тестовой пробирки в условиях 37°C, 200 об/мин в течение 1 ч путем добавления 1 мл рекомбинантного белка В7-Н3 человека с концентрацией 2 мкг/мл в иммунологическую пробирку (maxisorp 444202). Затем супернатант удаляли и в тестовую пробирку добавляли раствор, содержащий 3% обезжиренного молока, и осуществляли реакцию при комнатной температуре в течение 1 ч. При этом обезжиренное молоко адсорбировалось на поверхности иммунологической пробирки, на которой не адсорбировался рекомбинантный белок В7-Н3 человека, тем самым блокируя неспецифическое связывание. После удаления супернатанта 1012 КОЕ (колониеобразующих единиц) фаговой библиотеки, полученной в Примере 2.1.2, перемешивали в растворе, содержащем 3% обезжиренного молока, и брали в иммунологический тест, и осуществляли реакцию в условиях 37°C, 150 об/мин в течение 1 ч, так чтобы фаги, специфические к белку В7-Н3 человека, связались с антигеном.

Затем, неспецифически связавшиеся фаги отмывали раствором PBS-T (забуференный фосфатом физиологический раствор-0,05% Tween 20) и удаляли, и оставшиеся антигенспецифические фаговые антитела собирали путем добавления 1 мл раствора 100 mM триэтиламина. После нейтрализации собранных фагов раствором 1M трис-буфера (pH 7,4), поскольку pH раствора триэтиламина был низким, ими инфицировали ER2537 *E. coli*, выращенную до OD₆₀₀ 0,8~1 в условиях 37°C, 120 об/мин в течение 1 часа и 30 минут. Культуральный раствор центрифугировали в условиях 4°C, 4500 об/мин в течение 15 мин и супернатант удаляли, и погруженные клетки культивировали при 37°C в течение 16 ч или более путем нанесения инфицированной *E. coli* на агаровую среду 2X YT, содержащую ампициллин. На следующие сутки всю культивированную *E. coli* отскабливали и ресуспендировали в 5 мл культурального раствора 2X YT с ампициллином и добавляли 505 глицерин, и часть хранили при -80°C, а другую часть использовали для получения фага для следующего эксперимента. После инокуляции 20 мкл культивированной *E. coli* в 2X TB, содержащий ампициллин, и выращивания ее, осуществляли инфицирование фагом-помощником и пэннинг повторяли

еще два раза, таким образом амплифицируя и концентрируя пул фага, специфичного к белку В7-Н3 человека.

Скрининг одиночных клонов

Для сортировки моноклональных антител, специфически связывающихся с белком В7-Н3 человека из фагового пула, полученного путем пэннинга, проводили следующий эксперимент.

Для выделения моноклонов из концентрированного пула после нанесения фагового пула на LB-ампициллин агаровую среду и культивирования сохраняли единственную колонию. Затем после инокуляции моноклонов в 96-луночный планшет с глубокими лунками, в которые помещали по 200 мкл среды “super broth (SB)” на лунку и культивировали в течение ночи, часть переносили на другой планшет для получения запаса клеток. 1 mM IPTG помещали в оставшийся раствор клеточной культуры и культивировали его при 30°C в течение 16 ч для индуцирования продукции scFv. После этого культивируемый культуральный раствор центрифугировали в условиях 4°C, 6000 об/мин, супернатант отбрасывали и получали только клетки, и затем клетки лизировали с использованием раствора TES и затем снова центрифугировали, таким образом получая только супернатант для использования.

Затем клоны, экспрессирующие растворимый моноклональный scFv, который связывается с антигеном В7-Н3-His (2318-B3/CF, R&D Systems), отбирали с помощью метода ELISA следующим образом (Steinberger, Rader и Barbas III. 2000. Phage display vectors. In: Phage Display Laboratory Manual. 1sted. ColdSpringHarborLaboratoryPress. NY. USA. pp.11.9-11.12). Более точно, рекомбинантный белок В7-Н3-his человека, полученный в Примере 2, по 100 нг на лунку, помещали в лунки 96-луночного планшета (Nunc-Immuno Plates, NUNC, Rochester, NY, USA) и оставляли его адсорбироваться при 4°C в течение ночи. На следующие сутки, после промывки белка PBST (забуференный фосфатом физиологический раствор-0,05% Tween 20) для предупреждения неспецифического связывания, в лунки помещали буферный раствор PBS, содержащий 3% BSA, по 200 мкл на лунку, и осуществляли реакцию при 37°C в течение 2 часов. Затем после еще одной отмывки PBST, супернатант, содержащий фаги, отцентрифугированный и подготовленный заранее, помещали, по 100 мкл на лунку, и осуществляли реакцию при 37°C в течение примерно 1 ч. Затем после промывки PBST для выявления фагов, связанных с В7-Н3 человека, антитело анти-НА, связывающееся с HRP (пероксидаза хрена) (Roche, 12 013 819 001), разводили в PBS, содержащем 1% BSA 1:5000, и помещали, по 100 мкл на лунку,

и осуществляли реакцию при 37°C в течение примерно 1 ч. После еще одной промывки PBST добавляли 100 мкл ТМВ (тетраметилбензидин, Thermo, 34028) для развития окраски. После проведения реакции при RT в течение 5~10 мин добавляли 50 мл 1 н. H₂SO₄ для остановки реакции. Измеряли поглощение при 450 нм для сортировки клонов, для которых значение составило 1,0 или более.

На основании этого было выделено 7 клонов антител, связывающихся с рекомбинантным белком B7-H3 человека (B5, C4I, D8G, F6V, 10F11, D8G M1 и D8G M3), и аминокислотные последовательности и последовательности CDR переменных областей тяжелых цепей и переменных областей легких цепей каждого антитела были такими, как в следующей таблице.

【Таблица 17】

Клон	Последовательности CDR переменных областей тяжелых цепей (VH)						VH
	CDRH1		CDRH2		CDRH3		
	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO	SEQ ID NO
B5	DYAMS	20	SISSGSGSIYYADSVKG	24	NLIPLDY	30	51
C4I	GYYSMS	21	LISPSSGSIYYADSVKG	25	GLTKFDY	31	52
D8G	SYSMS	22	GIYSDGSNTYYADSVKG	26	MLHRFDY	32	53
F6V	DYAMS	20	GISPGGSNTYYADSVKG	27	DAWIARLLLFDY	33	54
10F11	SYGMS	23	GIYSGGSSKYYADSVKG	28	NRLRFDY	34	55
D8G M1	SYSMS	22	GIYSDASNTYYADSVKG	29	MLHRFDY	32	56
D8G M3	SYSMS	22	GIYSDASNTYYADSVKG	29	MLHRFDY	32	56

【Таблица 18】

Клон	Последовательности CDR переменных областей легких цепей (VL)						VL
	CDRL1		CDRL2		CDRL3		
	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO	Последовательность	SEQ ID NO	SEQ ID NO
B5	SGSSNIGSNAVS	35	YNSHRPS	40	GSWDASLNAYV	46	57
C4I	TGSSNIGSNDVS	36	ANSHRPS	41	GSWDDSLSGYV	47	58

D8G	SGSSSNIGSNSVT	37	ADSQRPS	42	GTWDSSSLNAYV	48	59
F6V	SGSSSNIGSNAVT	38	YNNKRPS	43	GTWDDSLSGYV	49	60
10F11	TGSSSNIGSNSVT	39	SDSHRPS	44	GTWDASLNAYV	50	61
D8G M1	SGSSSNIGSNSVT	37	ADSQRPS	42	GTWDSSSLNAYV	48	59
D8G M3	SGSSSNIGSNSVT	37	ADVQRPS	45	GTWDSSSLNAYV	48	62

Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные области и последовательности CDR, содержались в следующих полноразмерных последовательностях нуклеиновой кислоты в порядке B5, C4I, D8G, F6V, 10F11, D8G M1 и D8G M3: SEQ ID NO: 145 (тяжелая цепь) и 151 (легкая цепь); SEQ ID NO: 146 (тяжелая цепь) и 152 (легкая цепь); SEQ ID NO: 147 (тяжелая цепь) и 153 (легкая цепь); SEQ ID NO: 148 (тяжелая цепь) и 154 (легкая цепь); SEQ ID NO: 149 (тяжелая цепь) и 155 (легкая цепь); SEQ ID NO: 150 (тяжелая цепь) и 153 (легкая цепь) и SEQ ID NO: 150 (тяжелая цепь) и 156 (легкая цепь), соответственно. В последовательностях нуклеиновой кислоты последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей константные области, представляли собой SEQ ID NO: 158-160 (тяжелая цепь) и SEQ ID NO: 161-163 (легкая цепь).

Пример 2.2. Конверсия анти-B7-H3 scFv в форму полноразмерного IgG и его получение

2.2.1. Клонирование анти-B7-H3 scFv в форму полноразмерного IgG

Для конвертирования каждого моноклонального фагового антитела, специфичного к B7-H3 человека, раскрытого в Примере 2.1, в форму полноразмерного IgG, были синтезированы нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные области тяжелой цепи и легкой цепи каждого клона, полученные в Примере 2.1 (Genotech, Korea). Гены, кодирующие белки константных областей тяжелой цепи и легкой цепи подтипа IgG1 человека (SEQ ID NO: 157 и 161, соответственно) (константные области тяжелой цепи SEQ ID NO: 158 (клон C4I, D8G, 10F11, D8G M1, D8G M3), 159 (клон B5), 160 (клон F6V) и константные области легкой цепи 162 (клон C4I, D8G, 10F11, D8G M1, D8G M3), 163 (клон B5) и 164 (клон F6V)) синтезировали и соединяли с нуклеиновой кислотой, кодирующей каждую переменную область тяжелой цепи и легкой цепи. Нуклеиновые кислоты, кодирующие легкую цепь и тяжелую цепь каждого антитела клонировали в экспрессионный вектор на основе pcDNA 3.1, соответственно, и получали вектор, кодирующий нуклеиновую кислоту антитела, в клетках клеточной линии млекопитающих

СНО-S и так далее. Дополнительно для использования традиционного анти-В7-Н3 антитела, Эноблитузумаба, в качестве антитела группы сравнения была получена последовательность вариабельной области этого антитела из патента (US 8802091) и ген был получен, и он был клонирован вышеописанным способом и получил название 84D для применения.

Форма IgG антител раскрыта как следующие полноразмерные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи в порядке B5, C4I, D8G, F6V, 10F11, D8G M1 и D8G M3: SEQ ID NO: 145 (тяжелая цепь) и 151 (легкая цепь); SEQ ID NO: 146 (тяжелая цепь) и 152 (легкая цепь); SEQ ID NO: 147 (тяжелая цепь) и 153 (легкая цепь); SEQ ID NO: 148 (тяжелая цепь) и 154 (легкая цепь); SEQ ID NO: 149 (тяжелая цепь) и 155 (легкая цепь); SEQ ID NO: 150 (тяжелая цепь) и 153 (легкая цепь) и SEQ ID NO: 150 (тяжелая цепь) и 156 (легкая цепь), соответственно.

2.2.2. Экспрессия анти-В7-Н3 антитела

Для экспрессии анти-В7-Н3 антитела использовали клетки ExpiCHO-S™ (Thermo Fisher, A29127), разработанные компанией Thermo, и выполняли экспрессию антител, следуя протоколу изготовителя набора системы экспрессии ExpiCHO™ (Thermo Fisher, A29133).

Кратко описывая способ получения, клетки ExpiCHO-S культивировали в условиях 120 об/мин в инкубаторе со встряхиванием в условиях 8% CO₂, 37°C. В день трансфекции клетки ExpiCHO-S разводили путем добавления экспрессионной среды ExpiCHO™ (Thermo Fisher, A2910001) при концентрации клеток 6×10^6 клеток/мл и подготавливали.

Затем каждый вектор, экспрессирующий тяжелую цепь и легкую цепь из Примера 2.2.1, разводили в среде SFM OptiPRO™ (Thermo Fisher, 12309050), 1 мкг на мл среды, соответственно, и 3,2 мкл на мл ExpiFectamine™CHO, включенного в систему экспрессии ExpiCHO, разводили в среде SFM OptiPRO™. Вектор и смесь CHO ExpiFectamine™ смешивали друг с другом и осуществляли реакцию при комнатной температуре в течение 5 мин, и затем эту смесь добавляли к полученным клеткам и культивировали их в условиях 8% CO₂, 37°C, 120 об/мин в течение 20 ч. Через 20 ч, после добавления 2,2 мкл/мл и 240 мкл/мл Enhancer1, ExpiCHO™ Feed, которые оба включены в набор системы экспрессии ExpiCHO™ (Thermo Fisher, A29133), добавляли к клеткам, соответственно, их культивировали в условиях 8% CO₂, 37°C, 120 об/мин в течение примерно от 7 суток до 10 суток.

После культивирования раствор клеточной культуры центрифугировали в

условиях 4°C, 6000 об/мин в течение 30 мин и затем супернатант выделяли и хранили на холоде.

2.2.3. Выделение и очистка анти-В7-Н3 антитела

После пропускания уравнивающего буферного раствора (50 мМ Трис-НСl, рН7,5, 100 мМ NaCl) через “Mab selectsure” (GE healthcare, 5 мл) для его уравнивания культуральный раствор из Примера 2.2.2 пропускали через колонку (Mab selectsure (GE healthcare, 5 мл)) для обеспечения возможности связывания экспрессированного антитела с колонкой. Затем после его элюирования раствором 50 мМ цитрата Na (рН 3,4), 100 мМ NaCl его нейтрализовали с помощью 1 М Трис-НСl (рН 9,0), так чтобы конечный рН составил 7,2. Буферный раствор заменяли на PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор, рН 7,4).

2.3. Анализ специфичности связывания анти-В7-Н3 антитела с В7-Н3

2.3.1. Анализ специфичности связывания анти-В7-Н3 антитела IgG с рекомбинантным антигеном В7-Н3 (ELISA)

Для подтверждения способности анти-В7-Н3 антител IgG, отобранных и полученных в Примерах 2.1 и 2.2, специфически связываться с антигеном В7-Н3 осуществляли тест связывания в растворе на основе ELISA.

Более подробно, после разведения рекомбинантного белка В7-Н3 человека до концентрации 1 мкг/мл и помещения его в лунки 96-луночного планшета (Nunc-Immuno Plates, NUNC), по 100 мкл на лунку, осуществляли реакцию при 4°C в течение 16 ч для покрытия. Здесь применяли рекомбинантный белок В7-Н3 человека, используемый в Примере 2.1.

Затем после удаления белка и промывки его PBST добавляли буфер PBS, содержащий 1% BSA (бычий сывороточный альбумин), по 200 мкл на лунку, и осуществляли реакцию при 37°C в течение 2 ч для блокирования неспецифического связывания. Затем после разведения анти-В7-Н3 антител, полученных в Примере 2.2, до концентрации 10 мкг/мл на 96-луночном планшете, 100 мкл помещали в каждую лунку и осуществляли реакцию при 37°C в течение 1 ч. После этого лунки промывали PBST. Для выявления антител, связавшихся с В7-Н3 человека, антитело к F(ab')₂ IgG человека, связанное с HRP (кросс-адсорбированное вторичное антитело козы к F(ab')₂ IgG человека, HRP, Pierce, 31414) разводили 1:10000 в PBS, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA), и помещали по 100 мкл в каждую лунку и осуществляли реакцию при 37°C в течение примерно 1 ч. После еще одной промывки лунок PBST в лунки добавляли

по 100 мкл ТМВ (Тетраметилбензидин, Sigma, T0440) для развития окраски. После проведения реакции при RT в течение 5~10 мин добавляли по 50 мкл 1 н. H₂SO₄ для остановки реакции и измеряли поглощение при 450 нм и 650 нм с помощью считывателя микропланшетов (молекулярное устройство).

Результат представлен на Фиг. 5а и 5б. В результате измерения связывающей способности методом ELISA было подтверждено, что анти-В7-Н3 антитела связываются с внеклеточным доменом В7-Н3 зависимым от концентрации образом.

2.3.2. Анализ связывающей способности анти-В7-Н3 антитела в отношении других белков семейства В7

Белки семейства В7 между собой содержат 20-40% идентичных аминокислот и имеют структурное соответствие, такое как повторяемость иммуноглобулинового домена. Следовательно, было проанализировано, связываются ли анти-В7-Н3 антитела по настоящему изобретению специфически с белком В7-Н3, а не с другими белками семейства В7, следующим образом.

Для подтверждения иммуноспецифической связывающей способности приобретали белки - компоненты семейства В7, имеющие структурное сходство: В7-1(Sino Biological, Cat #: 10698-H08H), В7-2(Sino Biological, Cat #: 10699-H08H), В7-DC(Sino Biological, Cat #: 10292-H08H), В7-Н1(Sino Biological, Cat #: 10084-H08H), В7-Н2(Sino Biological, Cat #: 11559-H08H), В7-Н4(Sino Biological, Cat #: 10738-H08H), В7-Н5(Sino Biological, Cat #: 13482-H08H), В7-Н6(Sino Biological, Cat #: 16140-H08H), В7-Н7(Sino Biological, Cat #: 16139-H02H) и использовали их.

Более подробно, после разведения рекомбинантных белков семейства В7 человека в концентрации 1 мкг/мл и помещения их в лунки 96-луночного планшета (Nunc-Immuno Plates, NUNC), по 100 мкл на лунку, осуществляли реакцию при 4°C в течение 16 ч для покрытия. Использовали рекомбинантные белки, используемые в Примере 2.1.

Затем после удаления белков и промывки их PBST в лунки добавляли по 200 мкл буфера PBS, содержащего 1% BSA (бычий сывороточный альбумин), и осуществляли реакцию при 37°C в течение 2 ч для блокирования неспецифического связывания. Затем после разведения анти-В7-Н3 антител, полученных в Примере 2.2, до 10 мкг/мл в лунках 96-луночного планшета, наносили по 100 мкл на лунку и осуществляли реакцию при 37°C в течение 1 ч. Затем их промывали PBST. Для выявления антител, связавшихся с антигеном, антитело к F(ab')₂ IgG человека, связанное с HRP (кросс-адсорбированное вторичное антитело козы к F(ab')₂ IgG человека, HRP, Pierce, 31414) разводили в PBS,

содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA), 1:10000. Помещали его по 100 мкл на лунку и осуществляли реакцию при 37°C в течение примерно 1 ч. После еще одной промывки лунок PBST в лунки добавляли по 100 мкл ТМВ (Тетраметилбензидин, Sigma, T0440) для развития окраски. После проведения реакции при RT в течение 5~10 мин добавляли по 50 мкл 1 н. H₂SO₄ для остановки реакции, и измеряли поглощение при 450 нм и 650 нм с помощью считывателя микропланшетов (молекулярное устройство).

Результаты представлены на Фиг. 6. В результате измерения связывающей способности методом ELISA было подтверждено, что анти-В7-Н3 антитело специфически связывается только с В7-Н3, не с другими белками семейства В7.

2.3.3. Анализ межвидовой реактивности анти-В7-Н3 антител в отношении В7-Н3 человека, обезьяны и мыши

Для оценки эффективности и иммунорегуляторной активности анти-В7-Н3 антитела до перехода к клинической фазе исследований на человеке важной является оценка на моделях грызунов и приматов. Последовательность В7-Н3 человека на 90% или более чем 90% идентична таковой обезьяны и мыши. Перекрестная реактивность анти-В7-Н3 антител по настоящему изобретению, полученных в Примере 2.2, в отношении В7-Н3 мыши или обезьяны анализировали методом ELISA следующим образом.

Для подтверждения межвидовой перекрестной реактивности антигена рекомбинантного белка В7-Н3 мыши, на С-конце которого присоединена гистидиновая метка (His tag) (Sino Biological, Cat #: 50973-M08H), и рекомбинантного белка В7-Н3 обезьяны, на С-конце которого присоединен Fc-фрагмент IgG1 человека (Sino Biological, Cat #: 90806-C02H), приобретали и использовали.

После разведения рекомбинантного белка В7-Н3 человека, белков В7-Н3 мыши и В7-Н3 обезьяны в концентрации 1 мкг/мл и помещения их в лунки 96-луночного планшета (Nunc-Immuno Plates, NUNC) по 100 мкл на лунку осуществляли реакцию при 4°C в течение 16 ч и покрывали. Для используемых рекомбинантных белков использовали продукт, приобретенный для анализа в Примере 2.1.

Затем после удаления белков и промывки их PBST, наносили по 200 мкл буфера PBS, содержащего 1% BSA (бычий сывороточный альбумин), на лунку и осуществляли реакцию при 37°C в течение 2 ч для блокирования неспецифического связывания. Затем после разведения анти-В7-Н3 антител, полученных в Примере 2.2, до определенных концентраций, варьирующих от 10 мкг/мл, наносили в лунки 96-луночного планшета, по 100 мкл на лунку, и осуществляли реакцию при 37°C в течение 1 ч. Затем после промывки

их PBST для выявления антител, связавшихся с В7-Н3 человека, В7-Н3 мыши и В7-Н3 обезьяны, антитело к F(ab')₂ IgG человека, связанное с HRP (кросс-адсорбированное вторичное антитело козы к F(ab')₂ IgG человека, HRP, Pierce, 31414) разводили в PBS, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA), 1:10000, и по 100 мкл помещали в каждую лунку и осуществляли реакцию при 37°C в течение примерно 1 ч. После еще одной промывки лунок PBST в лунки добавляли по 100 мкл ТМВ (Тетраметилбензидин, Sigma, T0440) для развития окраски. После проведения реакции при RT в течение 5~10 мин добавляли по 50 мкл H₂SO₄ для остановки реакции и измеряли поглощение при 450 нм и 650 нм с помощью считывателя микропланшетов (молекулярное устройство).

Результаты представлены на Фиг. 7 и Фиг. 8. По результату измерения связывающей способности методом ELISA было подтверждено, что анти-В7-Н3 антитело специфически связывается с В7-Н3 человека, обезьяны и мыши. Было показано, что степени связывания анти-В7-Н3 антител по настоящему изобретению с В7-Н3 человека и обезьяны похожи, но степень связывания с В7-Н3 мыши является относительно низкой (Фиг. 7). Было обнаружено, что степени связывания анти-В7-Н3 антител с В7-Н3 мыши варьировали между клонами, и антитело 84D, используемое в качестве антитела сравнения, не связывалось с белком В7-Н3 мыши (Фиг. 8).

2.3.4. Измерение связывающей способности анти-В7-Н3 антитела с антигеном В7-Н3, экспрессированным на клеточной поверхности

Затем, путем анализа FACS (сортировка флуоресцентно-активированных клеток) измеряли способность анти-В7-Н3 антитела по настоящему изобретению, полученного в Примере 2.2, связываться с В7-Н3 человека, экспрессированным на поверхности клетки.

Для этого эксперимента использовали линии раковой клетки, экспрессирующие В7-Н3 человека, MCF-7 (клеточная линия аденокарциномы молочной железы, ATCC[®] HTB-22[™]), DLD1 (клеточная линия колоректальной аденокарциномы, ATCC[®] CCL-221[™]), HCC1954 (TNM стадия ПА, степень 3, протоковая карцинома, ATCC[®] CRL-2338[™]) и HCT116 (клетки рака толстой кишки, ATCC[®] CCL-247[™]) и линию раковых клеток, не экспрессирующих В7-Н3 человека, Jurkat (острая лейкемия Т-клеток, ATCC[®] TIB-152[™]).

Более точно, после отделения каждой клеточной линии и промывки клеток буфером PBS, число клеток подсчитывали и доводили до 2x10⁵ клеток на лунку, и подготавливали путем добавления 200 мкл PBS. Осуществляли реакцию каждого из анти-В7-Н3 антител из Примера 2.2 и антитела группы сравнения (84D) с клетками,

полученными заранее, разведенными в определенной концентрации, 10 мкг/мл или более, в PBS, содержащем 1% BSA, при 4°C в течение 1 ч. После двукратной промывки лунок буфером PBS меченные FITC антитела к Fc человека (конъюгат антител козы к IgG человека с FITC, специфичный к Fc, Sigma, F9512, концентрация: 2,0 мг/мл) разводили 1:500 и наносили по 100 мкл на лунку и осуществляли реакцию при 4°C в течение 1 ч. Группу отрицательного контроля обрабатывали только мечеными FITC антителами к Fc человека. После следующей двукратной промывки лунок буфером PBS измеряли степень связывания анти-V7-N3 IgG с помощью устройства FACSCalibur.

Результат сдвига пика для связывания моноклонального антитела к V7-N3 человека-FITC в экспериментальных группах, обработанных каждым моноклональным антителом к V7-N3, сравнивали со связыванием в группе отрицательного контроля. Результат представляли как значение сдвига пика в экспериментальных группах, обработанных моноклональным антителом к V7-N3, разделенное на значение сдвига пика в группе отрицательного контроля (Среднее отношение интенсивности флуоресценции), и он показан на Фиг. 9 и Фиг. 10. В результате измерения связывающей способности методом FACS было подтверждено, что анти-V7-N3 антитело специфически связывается с V7-N3 человека, экспрессированным на клеточной поверхности, зависимым от концентрации образом.

2.3.5. Измерение связывающей способности анти-V7-N3 антитела IgG в отношении антигена V7-N3, экспрессированного на клеточной поверхности, в различных типах рака

Затем посредством FACS анализа подтверждали, связываются ли анти-V7-N3 антитела по настоящему изобретению с V7-N3, экспрессированным на клеточной поверхности, в клетках различных типов линий раковых клеток.

Используя различные типы раковых клеток, A2780 (рак яичника человека, ECACC, 93112519), SKOV-3 (аденокарцинома яичника человека, ATCC® HTB-77™), OVCAR-3 (аденокарцинома яичника человека, ATCC® HTB-161™), HCT116 (клетки рака толстой кишки, ThermoFisher Sci), HT29 (колоректальная аденокарцинома, ATCC® HTB-38™), DLD-1 (линия клеток колоректальной аденокарциномы, ATCC® CCL-221™), Calu-6 (немелкоклеточная карцинома легкого, ATCC® HTB-56™), HCC1954 (TNM стадия IIA, степень 3, протоковая карцинома, ATCC® CRL-2338™), HCC1187 (TNM стадия IIA, ATCC® CLC-2322™), линия клеток рака почки 786-0 (аденокарцинома клеток почки, ATCC® CRL-1932™), A498 (карцинома почки, ATCC® HTB-44™), Panc-1 (эпителиоидная карцинома

поджелудочной железы, TCC[®] CRL-1469[™]), NCI-N87 (карцинома желудка, TCC[®] CRL-5822[™]), HeLa (аденокарцинома шейки матки, ATCC[®] CCL-2[™]), JeKo-1 (лимфома, ATCC[®] CRL-3006[™]), и устройство FACSCalibur (BD Biosciences) степень связывания анти-B7-H3 антитела с B7-H3 измеряли следующим образом.

После отделения каждой клеточной линии и промывки клеток буфером PBS число клеток подсчитывали и доводили до 2×10^5 клеток /200 мкл PBS, и затем обрабатывали 10 мкг/мл моноклональных антител B7-H3, полученных в Примере 2.2. Реакцию осуществляли при 4°C в течение 1 ч. После промывки реагирующих клеток PBS, меченное FITC антитело, специфичное к константному фрагменту (Fc) (конъюгат антител козы к IgG человека с FITC, Fc-специфичный, Sigma, F9512, концентрация: 2,0 мг/мл), разводили 1:500 и добавляли по 100 мкл на лунку. И реакцию осуществляли при 4°C в течение 1 ч. После реакции клетки промывали PBS и анализировали с помощью устройства FACSCalibur. Группу отрицательного контроля обрабатывали только FITC-меченным антителом, специфичным к константному фрагменту (Fc). Для сравнения уровней экспрессии B7-H3 среди различных линий раковых клеток значение сдвига пика в экспериментальных группах, обработанных моноклональным антителом к B7-H3, делили на значение сдвига пика в группе отрицательного контроля (MFI Ratio, Mean Fluorescence Intensity Ratio). Результат представлен в Таблице 19 ниже.

【Таблица 19】

Линия раковых клеток		Соотношение MFI					
		B5	C4I	D8G	F6V	10F11	84D
Рак яичника	A2780	26,6	18,3	21,6	25,2	25,5	13,1
	SKOV-3	29,5	20,4	23,3	27,7	28,5	11,9
	OVCAR-3	33,1	22,4	26,7	33,1	35,6	13,7
Рак прямой кишки	HCT116	11,9	6,8	7,9	10,8	12	5,9
	HT29	17,6	12,7	11,9	15,9	18,7	8,9
	DLD-1	24,9	14,9	18,5	25,6	24,6	10,7
NSCLC	Calu-6	47,9	45,5	43,2	N/D	47,8	23,2
TNBC	MDA-MB-231	11,4	6,2	8,5	11,3	12,4	5,4
	MDA-MB-468	16,2	9,7	11,4	17,6	17,2	8,6
Рак молочной	MCF-7	154	109	136	151	152	78

железы	HCC1954	29	21	25	30	35	14
	HCC1187	21,8	11,2	13,3	18,4	22	14,9
Рак почки	786-0	32	24	22	33	34	20
	A-498	35	26	25	37	35	24
Рак поджелудочной железы	Panc-1	18	12	12	19	18	9
Рак желудка	NCI-N87	27,3	17,6	21,5	33,4	31,7	12,8
Рак шейки матки	Hela	38,7	26,1	30,2	42,7	40,6	23,5
MCL	JeKo-1	1,5	7,9	3,1	N/D	1,7	2,9

(Соотношение MFI: MFI анти-B7-H3 / MFI 2-го Ab)

(N/D: не определяли)

В результате измерения связывающей способности методом FACS было подтверждено, что анти-B7-H3 антитело по настоящему изобретению связывается с клетками различных линий раковых клеток, имеющих происхождение от рака яичника, рака прямой и ободочной кишки, немелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака почки, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака шейки матки и лимфомы. Дополнительно было подтверждено, что анти-B7-H3 антитело по настоящему изобретению демонстрирует более высокую связывающую способность по сравнению с антителом, используемым в качестве группы сравнения, 84D, в такой же концентрации, и следовательно, степень связывания с B7-H3, экспрессируемым на клеточной поверхности, была превосходной.

2.3.6. Измерение связывающей способности анти-B7-H3 антитела (FACS) с антигеном B7-H3 мыши раковых клеток мышиноного происхождения

Затем путем анализа FACS измеряли способность анти-B7-H3 антитела по настоящему изобретению связываться с B7-H3, экспрессированным на поверхности клеток мыши. Методом ELISA в Примере 2.3.3 было подтверждено, что анти-B7-H3 антитело связывается с рекомбинантными белками как B7-H3 человека, так и B7-H3 мыши. Для подтверждения того, что анти-B7-H3 антитело по настоящему изобретению связывается с B7-H3 мыши, экспрессированным на поверхности клеток линии раковых клеток мыши, использовали линии раковых клеток мышиноного происхождения, CT26 (карцинома толстой кишки *Mus mesculus*, ATCC[®] CRL-2638[™]), B16F10 (меланома кожи *Mus musculus*, ATCC[®] CRL-6475[™]), TC-1 (опухоль легкого *Mus musculus*, ATCC[®] CRL-

2493™).

Для каждой линии клеток клетки отделяли и промывали буфером PBS. Число клеток подсчитывали и доводили до 2×10^5 клеток на лунку. Добавляли по 200 мкл PBS. Клетки получали в концентрации 10 мкг/мл или больше в PBS, содержащем 1% BSA. Осуществляли реакцию между каждым из анти-B7-H3 антител, полученных в Примере 2.2, и антителом сравнения (84D) и клетками, полученными как описано выше, при 4°C в течение 1 ч.

После промывки клеток буфером PBS FITC-меченные антитела к Fc человека FITC (Sigma, F9512), разведенные 1:500 добавляли по 100 мкл на лунку и реакцию осуществляли при 4°C в течение 1 ч. Контрольную группу обрабатывали только FITC-меченными антителами к Fc человека FITC. После новой двукратной промывки буфером PBS измеряли степень связывания анти-B7-H3 антител IgG с помощью устройства FACSCalibur.

Значение для сдвига пика в экспериментальных группах, обработанных моноклональным антителом к B7-H3, сравнивали со значением для сдвига пика в группе отрицательного контроля. Результат представлен на Фиг. 11. В результате измерения методом FACS было подтверждено, что анти-B7-H3 антитела по настоящему изобретению специфически связываются с B7-H3 мыши, экспрессированным на клеточной поверхности.

2.4. Измерение аффинности анти-B7-H3 антител к B7-H3

Аффинность связывания антигена B7-H3 и анти-B7-H3 антитела измеряли методом SPR (поверхностный плазмонный резонанс). Сначала анти-B7-H3 антитело, разведенное 1-кратным буфером HBS-EP, 50 RU (единиц ответа), сажали на чип Белка А (GE healthcare, Cat. No. 29127556) при времени контакта 60 сек, периоде стабилизации 60 сек и скорости потока 30 мкл/мин. С 1-кратным буфером HBS-EP получали серийные двукратные разведения антигена B7-H3 (R&D systems, 2318-B3-050/CF), начиная от 100 нМ до 3,125 нМ. В этой точке 1-кратный буфер HBS-EP дополнительно готовили в качестве отрицательного контроля. Антиген B7-H3, полученный на чипе, на котором были захвачены анти-B7-H3 антитела, пропускали со скоростью потока 30 мкл/мин при времени связывания 60 сек и времени диссоциации 180 сек. Регенерацию осуществляли 10 мМ Глицин-HCl pH1,5 (GE healthcare, Cat. No. BR100354) при скорости потока 30 мкл/мин и времени контакта 30 сек. Результат описан в Таблице 20 ниже.

【Таблица 20】 Результат измерения аффинности анти-B7-H3 антитела к B7-H3

Ab	Ka (1/Ms, X10 ⁵)	Kd (1/c, X10 ⁻³)	K _D (M, X10 ⁻⁹)	R _{max} (RU)	Chi ²
10F11	3,57	3,70	10,36	12,25	0,02
B5	3,72	1,12	3,02	20,39	0,03
C4I	4,44	3,41	7,69	14,59	0,07
D8G	2,06	3,81	18,46	10,46	0,02
F6V	1,10	0,88	8,03	11,64	0,01

2.5. Анализ противораковой эффективности при совместном введении анти-В7-Н3 антитела и антитела анти-PD-1 в модели изогенной опухолевой трансплантации мыши

Для подтверждения эффективности ингибирования иммунной контрольной точки антителом на животной модели можно использовать модель изогенной опухолевой трансплантации мыши, когда антитело обладает межвидовой перекрестной реактивностью между человеком и мышью.

Как подтверждено в Примерах 2.3.3 и 2.3.6, анти-В7-Н3 антитело по настоящему изобретению обладает межвидовой перекрестной реактивностью в отношении антигена В7-Н3 мыши. Эффективность анти-В7-Н3 антитела по настоящему изобретению по ингибированию пролиферации опухоли была подтверждена путем совместной обработки этой опухоли антителом к PD-1 мыши, RMP1-14 (BioXCell, BE0146), в модели изогенной опухоли мыши следующим образом.

СТ26 представляет собой карциному толстой кишки, имеющую происхождение от мыши (BALB/c), и клеточную линию, сверхэкспрессирующую В7-Н3 мыши. Было подтверждено, что анти-В7-Н3 антитело, полученное в Примере 2, связывается с В7-Н3 мыши, экспрессированным на поверхности клеток линии раковых клеток мыши СТ26 в Примере 2.3.3-2.3.6 (Фиг. 11).

Для подробного объяснения экспериментального способа, после разъединения клеток линии СТ26 (происхождения BALB/c) и промывки их PBS число клеток подсчитывали и доводили до 5×10^5 клеток на лунку. Полученные клетки вводили мышам путем подкожной инъекции (BALB/c, возраст 6 недель, Samtako), и когда размер опухоли составлял 50~100 мм³, вводили по 200 мкг каждого антитела, пять раз с интервалом в 3 суток, в общей сложности 1 мг. Соответствующие размеры опухоли для контрольной группы, группы обработки только антителом анти-PD-1 (RMP1-14) и группы совместной обработки антителом анти-PD-1 и антителом анти-В7-Н3 рассчитывали с помощью

кронциркуля путем измерения самого большого диаметра опухоли (D1) и диаметра, вертикального к нему (D2), для получения объема ($0,5 \cdot D1 \cdot D2^2$) (Фиг. 15).

Когда размер опухоли составлял больше 2000 мм³, или при наблюдении опухоли возникала язва, соответствующих мышей умерщвляли. Выживаемость и размер опухоли измеряли в течение в общей сложности 30 суток периода наблюдения после завершения введения антитела.

Результат представлен на Фиг. 15. В результате эффект ингибирования пролиферации опухоли и повышения выживаемости был подтвержден в группе, которой совместно вводили антитела анти-PD-1 и анти-B7-H3, по сравнению с группой, которая получала обработку только антителом анти-PD-1 (RMP1-14). Этот результат обозначает, что противораковый терапевтический эффект был более интенсивным, когда анти-B7-H3 антитело по настоящему изобретению демонстрировало эффективность по ингибированию иммунной контрольной точки и антитело анти-PD-1 активировало иммуноциты путем другого механизма в качестве другого иммуно-ингибитора. Данные из Примера 2.3.3 могут служить подтверждением того, что связывающая способность анти-B7-H3 антитела по настоящему изобретению в отношении B7-H3 мыши является относительно низкой по сравнению с таковой в отношении B7-H3 человека. Несмотря на низкую связывающую способность в отношении B7-H3 мыши анти-B7-H3 антитела по настоящему изобретению демонстрировали отчетливую эффективность по ингибированию ракового роста и усилению выживаемости при совместном введении с антителом анти-PD-1 в модели изогенной опухолевой трансплантации по сравнению с одиночным введением антитела анти-PD-1. Предполагается, что анти-B7-H3 антитело по настоящему изобретению обладает более сильным ингибирующим действием на иммунную контрольную точку у человека вследствие более сильного связывания с B7-H3 человека, чем результат, полученный на модели изогенной опухолевой трансплантации мыши.

2.6. Анализ изменения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL) при совместном введении анти-B7-H3 антитела и антитела анти-PD-1 в модели изогенной опухолевой трансплантации мыши

Инфильтрующие опухоль лимфоциты (TIL) относятся к белым клеткам крови, которые покидают кровоток и двигаются в направлении опухоли. Инфильтрующие опухоль лимфоциты могут включать Т-клетки и В-клетки и включать одноядерные и полиморфноядерные иммуноциты, отличаются в зависимости от типов и стадий опухоли и

имеют отношение к прогнозу заболевания. В частности, механизм иммунного противоракового антитела можно исследовать путем анализа инфильтрирующих опухоль лимфоцитов.

Для анализа механизма противоракового действия при совместном (комби) введении анти-B7-H3 антитела (F6V) и антитела анти-PD-1 (RMP-14-1) анализировали инфильтрирующие опухоль лимфоциты. Этот эксперимент осуществляли таким же способом как в Примере 2.8. Опухоль была выделена из мыши после завершения трехкратного введения каждого антитела для получения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов.

Собранные инфильтрирующие опухоль клетки рестимулировали 50 нг/мл РМА и 1 мкМ лономицином и анализировали изменения в иммуноцитах (Фиг. 16). Репрезентативные иммуноциты, играющие главную роль в противораковой иммунной реакции, представляют собой цитотоксические Т-клетки и регуляторные Т-клетки. В результате эксперимента в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах, выделенных из мыши, которой совместно вводили анти-B7-H3 антитело и антитело анти-PD-1 по настоящему изобретению, наблюдали явную активацию цитотоксических Т-клеток и ингибирование пролиферации регуляторных Т-клеток.

В инфильтрирующих опухоль лимфоцитах, выделенных из мыши, которой совместно вводили анти-B7-H3 антитело и антитело анти-PD-1 по настоящему изобретению, уровни $IFN\gamma$ +ГранзимВ+ среди CD8+ Т-клеток были значительно повышены, и наблюдали увеличение высвобождения Гранзима В среди CD8+ Т-клеток.

В инфильтрирующих опухоль лимфоцитах, выделенных из мыши, которой совместно вводили анти-B7-H3 антитело и антитело анти-PD-1 по настоящему изобретению, частоту регуляторных Т-клеток и число клеток подтверждали с помощью антитела анти-Foxp3 (eBioscience, FJK-16s), и пролиферативную способность регуляторных Т-клеток подтверждали с помощью антитела анти-Ki67 (BD, B56).

Результат описан на Фиг. 16. В результате эксперимента было подтверждено, что в группе, которой совместно вводили анти-B7-H3 антитела и анти-PD-1, не только уменьшалось количество регуляторных Т-клеток, но также была снижена частота Ki67+, что показывает, что пролиферативная способность регуляторных Т-клеток была понижена. Такой результат означает, что совместное введение анти-B7-H3 антитела и антитела анти-PD-1 индуцирует повышение активности цитотоксических Т-клеток и одновременно ингибирование регуляторных Т-клеток, тем самым демонстрируя противораковое действие путем иммунной активации.

Пример 3. Получение биспецифических анти-PD-L1/анти-B7-H3 антител

Клоны анти-PD-L1 B6 и B12, полученные в Примере 1, и клоны B5 и C4I среди клонов анти-B7-H3, полученных в Примере 2, были выбраны в качестве примеров для получения биспецифических анти-PD-L1/анти-B7-H3 антител (биспецифические антитела PD-L1xB7-H3) в формах полноразмерного IgG X scFv и (HC + LC) X scFab-Fc. Клоны анти-PD-L1 B6 и B12 содержат легкую цепь типа kappa.

3.1. Биспецифическое антитело формы IgG X scFv (формата 2+2)

Для получения биспецифического антитела формата 2+2, когда PD-L1 или B7-H3 помещали в качестве части полноразмерного IgG, использовали IgG1.

ДНК-сегмент 1, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь антитела IgG биспецифического антитела PD-L1xB7-H3, вставляли в pcDNA 3.4 (Invitrogen, A14697; плаزمида 1), и ДНК-сегмент 2, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь антитела IgG биспецифического антитела PD-L1xB7-H3 вставляли в pcDNA 3.4 (Invitrogen, A14697; плазмида 2). После этого ДНК-сегмент 3, кодирующий scFv, сливали с частью ДНК-сегмента 1, соответствующего C-концу Fc-фрагмента антитела IgG, вставленного в плазмиду 1, с использованием ДНК-сегмента 4, кодирующего линкерный пептид длиной 15 аминокислот, состоящий из (GGGGS)₃, для конструирования векторов для экспрессии биспецифических антител. Кроме этого, для стабилизации scFv применяли дополнительную модификацию для создания дисульфидного мостика, обеспечивающего слияние VL100-VH44 с вариабельной областью легкой цепи и вариабельной областью тяжелой цепи, соответственно. Другими словами, аминокислоты в положениях VL100 и VH44 scFv в результате мутации были заменены на цистеин.

Последовательности тяжелой цепи, легкой цепи, scFv и ДНК-сегментов суммированы в Таблицах 21 - 24 ниже: (жирным шрифтом выделены CDR)

【Таблица 21】

ABLPNB.01: биспецифическое антитело, содержащее клон анти-B7-H3 B5 в форме IgG и клон анти-PD-L1 B6 в форме scFv	
Аминокислотная последовательность (SEQ ID No.)	
Тяжелый компонент	Тяжелая цепь B5
	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDYAMSWVR QAPGK GLEWSSISSGSGSIYYADSVKGR FTISRDN SKN TLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKNLIPLDYWGQ GT LVTS SASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQ

		TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 165)
	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 166)
	scFv B6	VL DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVTPAVAWYQQKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYYCQQHYTTPPLTFGCGTKLEIKR (SEQ ID NO. 167)
	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 168)
	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRDEDТАVYICARELPWRYALDYWGQGTТVTVSS (SEQ ID NO. 169)
Легкий компонент	Легкая цепь B5	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNAVSWYQQLPGTAPKLLIYYNSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDASLNAYVFGGGTKLTVLGPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYCSQVTHEGSTVEKTVAPAEC (SEQ ID NO. 170)
SEQ ID No.		
Тяжелый компонент	SEQ ID NO. 171	
Легкий компонент	SEQ ID NO. 172	

【Таблица 22】

ABLPNB.02: биспецифическое антитело, содержащее клон анти-B7-H3 C4I в форме IgG и клон анти-PD-L1 B6 в форме scFv		
		Аминокислотная последовательность (SEQ ID No.)
Тяжелый компонент	Тяжелая цепь C4I	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYYMSWVRQAPGKGLEWVSLISPSSGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKGLTKFDYWGQGTЛVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA

		LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 173)
	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 174)
	scFv B6	VL DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVTPAVAWYQQK PGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSRFRSGSGSGTDFTFITISLQP EDIATYYCQQHYTTPLTFGCGTKLEIKR (SEQ ID NO. 175)
	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 176)
	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVR QAPGKCLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRДНKK NSLYLQMNSLRDEDТАVYICARELPWRYALDYWGQGT TVVSS (SEQ ID NO. 177)
Легкий компонент	Легкая цепь C4I	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNДVSWYQQ PGTAPKLLIYANSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCGSWDDSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPAEC (SEQ ID NO. 178)
SEQ ID No.		
Тяжелый компонент	SEQ ID NO. 179	
Легкий компонент	SEQ ID NO. 180	

【Таблица 23】

ABLPNB.03: биспецифическое антитело, содержащее клон анти-PD-L1 B6 в форме IgG и клон анти-B7-H3 B5 в форме scFv		
		Аминокислотная последовательность (SEQ ID No.)
Тяжелый компонент	Тяжелая цепь B6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVR QAPGKSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRДНKK NSLYLQMNSLRDEDТАVYICARELPWRYALDYWGQGT TVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKКVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 181)
	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 182)
	scFv B5	VL QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNAVSWYQQ PGTAPKLLIYNSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR

		SEDEADYYCGSWDASLNAYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO. 183)
	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 184)
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVR QAPGKCLEWVSSISSGSGSIYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNLIPLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 185)
Легкий компонент	Легкая цепь В6	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVTPAVAWYQQK PGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSTRFSGSGTDFSTISSLQP EDIATYYCQQHYTTPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGN SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO. 186)
SEQ ID No.		
Тяжелый компонент	SEQ ID NO. 187	
Легкий компонент	SEQ ID NO. 188	

【Таблица 24】

ABLPNB.04: биспецифическое антитело, содержащее клон анти-PD-L1 В6 в форме IgG и клон анти-B7-H3 С4I в форме scFv		
		Аминокислотная последовательность (SEQ ID No.)
Тяжелый компонент	Тяжелая цепь В6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVR QAPGKSLEWVATISDAGGYIYRDSVKGRFTISRDNK NSLYLQMNSLRDEDTAVYICARELPWRYALDYWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO. 189)
	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 190)
	scFv C4I	VL QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNVSWYQQL PGTAPKLLIYANSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCGSWDDSLSGYVFGCGTKLTVL (SEQ ID NO. 191)
	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 192)
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYYMSWVR

			QAPGKCLEWVSLISPSSGSIYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLTKFDYWGGTLVTVSS (SEQ ID NO. 193)
Легкий компонент	Легкая цепь В6		DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVTPAVAWYQQK PGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTFTISLQP EDIATYYCQQHYTTPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGN SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO. 194)
SEQ ID No.			
Тяжелый компонент	SEQ ID NO. 195		
Легкий компонент	SEQ ID NO. 196		

3.2. Биспецифическое антитело формы (HC + LC) X scFab-Fc (формат 1+1)

Биспецифическое антитело формата 1+1 было получено на основе изотипа IgG1 человека. Биспецифическое антитело PD-L1xB7-H3 содержит Fc-фрагмент и две связывающие ветви. Одна ветвь содержит типичную легкую цепь и тяжелую цепь. Другая цепь содержит одноцепочечный Fab-фрагмент (scFab), в котором С-конец легкой цепи присоединен к N-концу домена VH через линкер (GS)⁹ (G4S)⁶ (GS)⁸ (длиной 64 аминокислоты). С-конец этого scFab соединен с N-концом Fc-домена так, что образуется структура scFab-Fc. Следовательно структура scFab-Fc содержит тяжелую цепь и легкую цепь, присоединенную на N-конце тяжелой цепи через линкер. Дополнение структуры scFab-Fc представляет собой типичную структуру тяжелая цепь (HC)+легкая цепь (LC) (см. Фиг. 1б).

Гетеродимеризации двух тяжелых цепей биспецифического антитела формата 1+1 достигали путем применения технологии выступы-во-впадину. Мутацию “выступ” (T366W) вводили в домен CH3 тяжелой цепи, и три мутации для образования “впадины” (T366S, L368A и Y407V) вводили в домен CH3 scFab-Fc.

ДНК-сегмент 1, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую типичную тяжелую цепь IgG биспецифического антитела, вставляли в pcDNA 3.4 (Invitrogen, A14697; плазмида 1), и ДНК-сегмент 2, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую типичную легкую цепь IgG биспецифического антитела, вставляли в pcDNA 3.4 (Invitrogen, A14697; плазмида 2). ДНК-сегмент 3, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую структуру scFab-Fc биспецифического

антитела, вставляли в pcDNA3.4 (Invitrogen, A14697; плазмида 3).

Последовательности тяжелой цепи, легкой цепи, scFab-Fc и ДНК-сегментов суммированы в Таблицах 25 - 29 ниже: (жирным шрифтом выделены CDR)

【Таблица 25】

ABLPNB.05: биспецифическое антитело, содержащее клон анти-B7-H3 B5 в форме (HC + LC) и клон анти-PD-L1 B6 в форме scFab-Fc		Аминокислотная последовательность (SEQ ID No.)
(HC+LC) B5	Тяжелая цепь	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAP GKGLEWVSS ISSGSGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAK NLIPLDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 197)
	Легкая цепь	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSN AVSWYQQ LPGT APKLLIYNS HRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEAD YYCGSWDASLNAYVFGGGTKLTVLGQPKAAPS VTLFPPS SEE LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TT PSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQV THEGSTVEKTVAP AEC (SEQ ID NO. 198)
scFab-Fc B6	Полная последовательность	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVT PAVAWYQQKPGK APKLLIYSTSSRYTGVPSR FSGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIATYY CQH YTTPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLN NFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQ SKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC GSGSGSGSGSGSGSGSGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GSGGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTF SSYDMSWVRQAPGKSLEWVATISDAGGYIYY RDSVKGRFTISR ДHKKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICARELPW RYALDYWGQGT TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHT FPAVLQSSGLYSLSSV VTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISK AKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 199)
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVT PAVAWYQQKPGK APKLLIYSTSSRYTGVPSR FSGSGSGTDFTFTIS SLQPEDIATYY CQH YTTPLTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO. 200)

		CAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYV DSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVALWD DAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO. 208)
	VL	DIQMTQSPSTLSASVGRVITCRASRGISWLAWYQQKPGK APNLLISKASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSSSIPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO. 209)
	Линкер	GSGSGSGSGSGSGSGSGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO. 210)
	VH	QVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAP GKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQ MNLSLRAEDTAVYYCARVALWDDAFDIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO. 211)
		SEQ ID No. нуклеотидной последовательности
(HC+LC)	Тяже- лая цепь	SEQ ID NO. 212
	Легкая цепь	SEQ ID NO. 213
scFab-Fc B12		SEQ ID NO. 214

【Таблица 27】

ABLPNB.07: биспецифическое антитело, содержащее клон анти-B7-H3 C4I в форме (HC + LC) и клон анти-PD-L1 B6 в форме scFab-Fc		
		Аминокислотная последовательность (SEQ ID No.)
(HC+L C) C4I	Тяжелая цепь	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYYMSWVRQAPG KGLEWVSLISPSSGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSL RAEDTAVYYCAKGLTKFDYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL

		HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 215)
	Легкая цепь	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNDVSWYQQLPGTA PKLLIYANSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CGSWDDSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNN KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC (SEQ ID NO. 216)
scFab-Fc B6	Полная последовательность	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVTPAVAWYQQKPGKA PKLLIYSTSSRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQ QHYYTTPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFNRGECGSGS GSGSGSGSGSGSGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGG GSGSGSGSGSGSGSGSGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYDMSWVRQAPGKSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGR FTISRДHKKNSLYLQMNSLRDEDTAVYICARELPWRYALDYW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 217)
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVTPAVAWYQQKPGKA PKLLIYSTSSRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQ QHYYTTPITFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO. 218)
	Линкер	GSGSGSGSGSGSGSGSGSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGGG SGGGGGSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO. 219)
	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPG KSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNS LRDEDTAVYICARELPWRYALDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO. 220)
SEQ ID No. нуклеотидной последовательности		
(HC+L C) C4I	Тяжелая цепь	SEQ ID NO. 221
	Легкая цепь	SEQ ID NO. 222
scFab-Fc B6		SEQ ID NO. 223

【Таблица 28】

ABLPNB.08: биспецифическое антитело, содержащее клон анти-B7-H3 C4I в форме (HC + LC) и клон анти-PD-L1 B12 в форме scFab-Fc		
		Аминокислотная последовательность (SEQ ID No.)
(HC+LC) C4I	Тяжелая цепь	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYM SWVRQAP GKGLEWVSLISPSSGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKGLTKFDYWGQGLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 224)
	Легкая цепь	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGSNDVSWYQQLPGT APKLLIYANSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEAD YYCGSWDDSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEE LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP AECS (SEQ ID NO. 225)
scFab-Fc B12	Полная последовательность	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASRGISSWLAWYQQKPGKA PNLLISKASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSSSIPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGS GSGSGSGSGSGSGSGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSQVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYV DSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARVALWD DAFDIWGQGMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDK KKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLN NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK (SEQ ID NO. 226)
	VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCRASRGISSWLAWYQQKPGK APNLLISKASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQSSSIPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO. 227)
	Линкер	GSGSGSGSGSGSGSGSGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO. 228)
	VH	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYWMSWVRQAP GKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVALWDDAFDIWGQGMVTVSS (SEQ ID NO. 229)

SEQ ID No. нуклеотидной последовательности		
(HC+LC) C4I	Тяжелая цепь	SEQ ID NO. 230
	Легкая цепь	SEQ ID NO. 231
scFab-Fc B12		SEQ ID NO. 232

【Таблица 29】

ABLPNB.09: биспецифическое антитело, содержащее клон анти-PD-L1 B6 в форме (HC + LC) и клон анти-B7-H3 C4I в форме scFab-Fc		
Аминокислотная последовательность (SEQ ID No.)		
(HC+LC) B6	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMN SLRDEDTAVYICARELPWRYALDYWGQGT TTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 233)
	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVT PAVAWYQQKPGKAPKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLPEDIATYY CQHHTTPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO. 234)
scFab-Fc C4I	Полная последовательность	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLIYANSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDDSLSGYVFGGGTKLTVLGQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYYMSWVRQAPGKGLEWVSLISSGSIY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGLTKFDYWGQGT LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL

		NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO. 235)
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNDVSWYQQLPGT APKLLIYANSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEAD YYCGSWDDSLSGYVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO. 236)
	Линкер	GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO. 237)
	VH	EVQLLES GGGLVQP GGLRLSCAASGFTFSGYYMSWVRQAP GKGLEWVSLISPSSGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKGLTKFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 238)
SEQ ID No. нуклеотидной последовательности		
(HC+LC) B6	Тяжелая цепь	SEQ ID NO. 239
	Легкая цепь B6	SEQ ID NO. 240
scFab-Fc C4I		SEQ ID NO. 241

3.3. Получение и выделение биспецифических антител

Выполняли временную экспрессию со сконструированных векторов с использованием (ExpiFectamine™ CHO Kit, Thermo, A29129) в клетках ExpiCHO-S™ (Thermo Fisher, A29127), культивируемых в экспрессионной среде ExpiCHO™ (Thermo, A29100-01) в условиях от 30 до 37°C в течение от 7 до 15 суток в инкубаторе CO₂, оборудованном ротационным шейкером. Плазмидную ДНК (250 мкг) и ExpiFectamin CHO Reagent (800 мкл) смешивали со средой Opti-MEM® I (конечный объем 20 мл) и оставляли при комнатной температуре на 5 мин. Смешанный раствор добавляли ко клеткам ExpiCHO 6 x 10⁶, культивированным в экспрессионной среде ExpiCHO и осторожно перемешивали в инкубаторе со встряхиванием при 37°C в увлажненной атмосфере 8% CO₂ на воздухе. Через 18 часов после трансфекции в каждый флакон добавляли по 1,5 мл ExpiFectamin CHO Transfection Enhancer 1 и по 60 мл ExpiFectamin CHO Transfection Feed.

Каждое BsAb очищали от супернатанта клеточной культуры путем аффинной хроматографии на рекомбинантном Белке А (Hitrap Mabselect Sure, GE Healthcare, 28-4082-55) и хроматографии-гель-фильтрации на колонке HiLoad 26/200 Superdex200 prep grade (GE Healthcare, 28-9893-36). SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) (NuPage 4-12% Bis-Tris gel, NP0321) и анализ эксклюзионной

HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография) (Agilent, 1200 series) на колонке SE-HPLC (колонка SWXL SE-HPLC, TOSOH, G3000SWXL) выполняли для детектирования и подтверждения размера и чистоты каждого BsAb. Очищенные белки концентрировали в PBS путем ультрацентрифугирования с использованием устройства Amicon Ultra 15 30K (Merck, UFC903096), и концентрации белка оценивали с использованием nanodrop (Thermo, Nanodrop One). В случае биспецифического антитела формата 2+2, когда применяли двухвекторную систему, соотношение между легкой и тяжелой цепью могло составлять от 1:1 до 1:3 по массе. Альтернативно, в случае биспецифического антитела формата 1+1, когда применяли трехвекторную систему, соотношение между легкой цепью, тяжелой цепью и scFab-Fc могло составлять от 1:1:2 до 1:1:5 по массе.

Полученные биспецифические антитела PD-L1xB7-H3 были такими, как описано ниже:

【Таблица 30】

	IgG	scFv	Название
IgG X scFv (формат 2+2)	B7-H3	PD-L1	B5xB6
			C4IxB6
	PD-L1	B7-H3	B6xB5
			B6xC4I

【Таблица 31】

	HC+LC	scFab-Fc	Название
(HC+LC) X scFab-Fc (формат 1+1)	B7-H3	PD-L1	B5xB6
			B5xB12
			C4IxB6
			C4IxB12
	PD-L1	B7-H3	B6xC4I

Пример 4. Характеризация биспецифических антител PD-L1xB7-H3

4.1. Анализ связывания с клеткой (FACS) для сравнения форматов

Для оценки антигенсвязывающей способности антитела-кандидаты анализировали на их связывание как с B7-H3, так и с PD-L1, экспрессированными на клетках

млекопитающих, методом FACS. Коротко, клетки RKO инкубировали с биспецифическими антителами. После промывки буфером FACS (1% BSA в PBS) в каждую лунку добавляли антитело против IgG человека-FITC и инкубировали при 4°C в течение 1 часа. MFI FITC оценивали с помощью FACS Caliber. Результаты описаны на Фиг. 17.

Как показано на Фиг. 17, протестированные биспецифические антитела демонстрировали способность связываться с PD-L1 и B7-H3, экспрессируемыми на клеточной поверхности, и могли эффективно связываться с PD-L1 и B7-H3, экспрессируемыми на клетках RKO. Дополнительно биспецифические антитела формата 1+1 демонстрировали даже превосходящую силу связывания по сравнению с биспецифическими антителами формата 2+2 как в клонах B5xB6, так и C4IxB6.

4.2. Анализ связывания с клетками (FACS) для сравнения клонов

Для оценки антигенсвязывающей способности биспецифические антитела формата 1+1 анализировали на их связывание как с B7-H3, так и с PD-L1, экспрессируемыми на клетках млекопитающих, методом FACS по сравнению с моноспецифическими антителами. Коротко, клетки RKO (клеточная линия карциномы толстой кишки человека) инкубировали с антителами. После промывки буфером FACS (1% BSA в PBS) в каждую лунку добавляли антитело против IgG человека-FITC и инкубировали при 4°C в течение 1 часа. MFI FITC оценивали с помощью FACS Caliber. Результаты описаны на Фиг. 18.

Как показано на Фиг. 18, все протестированные биспецифические антитела формата 1+1 демонстрировали превосходящую аффинность связывания по сравнению с моноспецифическими антителами.

4.3. Функциональный анализ на основе клеток для сравнения форматов

Для оценки способности Т-клеток IG4 TCR убивать опухолевые клетки *in vitro* антитела-кандидаты анализировали путем анализа, основанного на IG4 TCR-сконструированных Т-клетках. В частности, был сконструирован лентивирусный вектор IG4 TCR, распознающий HLA-A*02-ограниченный(restricted) антиген меланомы NY-ESO-1. Для трансдукции был получен лентивирус, экспрессирующий IG4 TCR, в клеточной линии Lenti-Pac 293Ta (GeneCopoeia), и Т-клетки человека были активированы Dyna beads Human T-Activator CD3/CD28 (Gibco). Через 72 ч после активации Т-клетки человека трансдуцировали лентивирусом, экспрессирующим IG4 TCR, и выращивали в течение 7 суток с hIL-2.

Меченные люциферазой опухолевые клетки A2-ESO+ высевали на 96-луночный планшет с плоским дном с определенной плотностью на лунку в тройных повторах. Через 24 ч выполняли совместное культивирование Т-клеток человека, экспрессирующих IG4 TCR, при обозначенных соотношениях эффектор:мишень (E:T) в присутствии образцов. Планшет инкубировали в течение 48 ч при 37°C и 5% CO₂ и относительную активность люциферазы измеряли в системе анализа люциферазы One-Glo (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Результаты описаны на Фиг. 19.

Как показано на Фиг. 19, протестированные биспецифические антитела демонстрировали большую уничтожающую способность Т-клеток, чем моноспецифические антитела, и биспецифические антитела формата 1+1 демонстрировали даже лучшую уничтожающую способность, чем биспецифические антитела формата 2+2.

4.4. Функциональный анализ на основе клеток для сравнения клонов

Для оценки антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) анализировали антитела-кандидаты формата 1+1. Способность биспецифических анти-PD-L1/анти-B7-H3 антител к ADCC была подтверждена с использованием набора ADCC Reporter Bioassay (Promega, G7018). Экспериментальный способ выполняли в соответствии с протоколом производителя, и в этом анализе использовали клетки RKO (B7-H3/PD-L1-положительная клеточная линия) и клетки KatoIII (B7-H3/PD-L1-отрицательная клеточная линия). Его результаты описаны на Фиг. 20.

Как показано на Фиг. 20, среди биспецифических антител формата 1+1 биспецифическое антитело C4IxV6 демонстрировало самую превосходную активность ADCC по сравнению с другими клонами, и биспецифическое антитело B5xB6 было следующим.

4.5. Функциональный анализ на основе клеток для характеристики C4IxV6 и B5xB6

Способность биспецифического антитела B7-H3xPD-L1 в формате 1+1 к ADCC была подтверждена с использованием набора ADCC Reporter Bioassay (Promega, G7018). Экспериментальный способ выполняли в соответствии с протоколом производителя, и в этом анализе использовали клетки RKO и клетки KatoIII.

4.6. Функциональный анализ на основе клеток для характеристики C4IxV6 и B5xB6

Для оценки способности Т-клеток IG4 TCR убивать опухолевые клетки *in vitro*

биспецифические антитела C4IxB6 и B5xB6 в формате 1+1 анализировали путем анализа, основанного на IG4 TCR-сконструированных Т-клетках. В частности, был сконструирован лентивирусный вектор IG4 TCR, распознающий HLA-A*02-ограниченный (restricted) антиген меланомы NY-ESO-1. Для трансдукции был получен лентивирус, экспрессирующий IG4 TCR, в клеточной линии Lenti-Pac 293Ta (GeneCopoeia) и Т-клетки человека были активированы Dyna beads Human T-Activator CD3/CD28 (Gibco). Через 72 ч после активации Т-клетки человека трансдуцировали лентивирусом, экспрессирующим IG4 TCR, и выращивали в течение 7 суток с hIL-2.

Меченные люциферазой опухолевые клетки A2-ESO+ (B7-H3/PD-L1-положительная клеточная линия A375-PD-L1) высевали на 96-луночный планшет с плоским дном с определенной плотностью на лунку в тройных повторях. Через 24 ч выполняли совместное культивирование Т-клеток человека, экспрессирующих TCR IG4, при обозначенных соотношениях эффектор:мишень (E:T) в присутствии образцов. Планшет инкубировали в течение 48 ч при 37°C и 5% CO₂ и относительную активность люциферазы измеряли в системе анализа люциферазы One-Glo (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Результаты описаны на Фиг. 21.

Как показано на Фиг. 21, биспецифическое антитело C4IxB6 демонстрировало лучшую способность убивать опухолевые клетки, чем биспецифическое антитело B5xB6.

4.7. Тест эффективности *in vivo* для характеристики C4IxB6 и B5xB6

Для оценки ингибирования опухолевого роста биспецифическими антителами в формате 1+1 выполняли тест эффективности *in vivo* с использованием гуманизированной мышинной модели RKO-PBMC. В частности, мышей NSG (в возрасте 6-8 недель) приобретали в Jackson Laboratory. Каждому животному вводили с.с. (подкожно) в нижнюю часть правого бока 5x10⁶ клеток RKO. В сутки деления на группы 1x10⁷ клеток PBMC человека (Stem express, USA) доставляли внутривенно через боковую хвостовую вену. Мышам вводили интраперитонеально Q3D 6 раз со следующими антителами: контроль изотипа (G1, 10 мг/кг), моноспецифическое анти-PD-L1 антитело (G2 - B6, 5 мг/кг), моноспецифическое анти-B7-H3 антитело (G3 - C4I, 5 мг/кг), комбинация моноспецифических анти-PD-L1 антител (B6, 5 мг/кг) и анти-B7-H3 (C4I, 5 мг/кг) (G4) и биспецифическое антитело B7-H3xPD-L1 (G5 - C4IxB6, 10 мг/кг). Результаты описаны на Фиг. 22.

Как показано на Фиг. 22, группа обработки биспецифического антитела C4IxB6 была наиболее эффективной среди других групп обработки. Обработка биспецифическим

антителом приводила к ингибированию роста опухоли даже лучше, чем комбинация из каждого из моноклональных антител.

Пример 5. Получение триспецифических анти-PD-L1/анти-B7-H3 антител/anti-4-1BB

Биспецифическое антитело C4IxB6 и биспецифическое антитело C4IxB12, полученные в Примере 3, дополнительно модифицировали для получения триспецифических анти-PD-L1/анти-B7-H3 антител/anti-4-1BB в форме (HC + LC) X scFab-Fc X scFv. Это триспецифическое антитело содержит фрагмент scFv, связывающийся с белком 4-1BB, дополнительно к биспецифическому антителу формата 1+1, и фрагмент scFv, связывающийся с белком 4-1BB (клон 1A10), соединен с С-концом каждого из Fc-доменов этого биспецифического антитела через линкер.

ДНК-сегмент 1, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую типичную тяжелую цепь IgG биспецифического антитела вставляли в pcDNA 3.4 (Invitrogen, A14697; плазида 1), и ДНК-сегмент 2, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую типичную легкую цепь IgG биспецифического антитела, вставляли в pcDNA 3.4 (Invitrogen, A14697; плазида 2). ДНК-сегмент 3, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую структуру scFab-Fc биспецифического антитела, вставляли в pcDNA3.4 (Invitrogen, A14697; плазида 3). После этого ДНК-сегмент 4, кодирующий scFv, сливали с частью ДНК-сегмента 1 и 3, соответствующего С-концу Fc-фрагмента антитела IgG, вставленного в плазмиду 1 и 3, с использованием ДНК-сегмента 5, кодирующего линкерный пептид длиной 15 аминокислот, состоящий из (GGGGS)₃, для конструирования векторов для экспрессии триспецифических антител. Кроме этого, для стабилизации scFv применяли дополнительные модификации для создания дисульфидного мостика, сшивающего VL100-VH44 с вариабельной областью легкой цепи и вариабельной областью тяжелой цепи, соответственно. Другими словами, аминокислоты в положениях VL100 и VH44 scFv были заменены на цистеин путем мутации.

Получение, продукцию и выделение триспецифического антитела осуществляли в согласно способам, описанным в Примере 3.

Последовательности тяжелой цепи, легкой цепи, scFab-Fc, scFv и ДНК-сегментов суммированы в Таблицах 32 и 33 ниже:

【Таблица 32】

Триспецифическое антитело 01: Триспецифическое антитело, содержащее клон анти-В7-Н3 С4I в форме (НС+LC), клон анти-PD-L1 В6 в форме scFab-Fc и анти-4-1BB 1A10 в форме scFv

		Аминокислотная последовательность (Seq ID No.)
(НС+LC) С4I + scFv 1A10	Полная последовательность: НС С4I + scFv 1A10	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFT FSGYYMSWVRQAP GKGLEWVSLISPSSGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGLTKFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQS VLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFT FSSYDMSWVRQAP GKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCARD AQRNSMREFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO. 300)
	Тяжелая цепь С4I	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFT FSGYYMSWVRQAP GKGLEWVSLISPSSGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCAKGLTKFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO. 242)
	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 243)
	scFv 1A10	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFT FSSYDMSWVRQA PGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN NSLRAEDTAVYYCARD AQRNSMREFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO. 244)
	Легкая цепь С4I	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLIYANSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDDSLSGYVFGGGTKLTVLGGQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS (SEQ ID NO. 245)
scFab-Fc	Полная	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVT PAVAWYQQKPGK

В6 + scFv 1A10	последовательность	APKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLQPEDIATYY CQQHYTTPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDS YLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKLEWVATISDAGGYIYYR DSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMNLSLRDEDТАVYICARELPWR YALDYWGQGTТVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQSVLTQPPSASGTPGQRV TISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYCATWDYSLSGYVFGC GTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQP GGSRLS CAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSG GSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCA RDAQRNSMREFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 246)
	Легкая цепь В6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVT PAVAWYQQKPGK APKLLIYSTSSRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLQPEDIATYY CQQHYTTPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDS TYLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO. 247)
	Линкер	GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO. 248)
	Тяжелая цепь В6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYDMSWVRQAPG KSLEWVATISDAGGYIYYRDSVKGRFTISRДHKKNSLYLQMN SLRDEDТАVYICARELPWR YALDYWGQGTТVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPV LDDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO. 249)
	Линкер	GGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO. 250)
scFv 1A10		QSVLTQPPSASGTPGQRV TISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGT APKLLIYADSHRPSGVPDR FSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY YCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYDMSWVRQA PGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ

		MNSLRAEDTAVYYCARDARNSMREFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 251)
SEQ ID No. нуклеотидной последовательности		
(HC+LC) C4I + scFv 1A10	Полная последовательность: HC C4I + scFv 1A10	SEQ ID: 301
	Тяжелая цепь C4I	SEQ ID NO. 252
	Линкер	SEQ ID NO. 253
	scFv 1A10	SEQ ID NO. 254
	Легкая цепь C4I	SEQ ID NO. 255
scFab-Fc B6 + scFv 1A10	Полная последовательность	SEQ ID NO. 256
	Легкая цепь B6	SEQ ID NO. 257
	Линкер	SEQ ID NO. 258
	Тяжелая цепь B6	SEQ ID NO. 259
	Линкер	SEQ ID NO. 260
	scFv 1A10	SEQ ID NO. 261

【Таблица 33】

Триспецифическое антитело 02: Триспецифическое антитело, содержащее клон анти-B7-H3 C4I в форме (HC+LC), клон анти-PD-L1 B12 в форме scFab-Fc и анти-4-1BB 1A10 в форме scFv		
Аминокислотная последовательность (Seq ID No.)		
(HC+LC) C4I + scFv 1A10	Полная последовательность: HC C4I + scFv 1A10	EVQLLES GGGLVQP GGSRLR LSCAASGFT FSGYYMSWVRQAP GKGLEWVSLISPSSGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGLTKFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVKDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW

		ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSQS VLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAP KLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAP GKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDARNSMREFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 302)
	Тяжелая цепь С4I	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYYMSWVRQAP GKGLEWVSLISPSSGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKGLTKFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 262)
	Линкер	GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 263)
	scFv 1A10	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGT APKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY YCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQA PGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDARNSMREFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 264)
	Легкая цепь С4I	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNVSWYQQLPGT APKLLIYANSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEAD YYCGSWDDSLSGYVFGGGTKLTVLQPKAAPSVTLPFPPSSEE LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSK QSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP AECS (SEQ ID NO. 265)
scFab-Fc B12 + scFv 1A10	Полная последо- ватель- ность	DIQMTQSPSTLSASVGRVITCRASRGISSWLAWYQQKPGKA PNLLISKASSLESGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSSSIPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGS GSGSGSGSGSGSGSGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSQVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYV DSVKGRFTISRДHKNSLYLQMNLSLRAEDTAVYYCARVALWD DAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

		<p>WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSSQSVLTQPPSASGTPGQRV TISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVFGC GTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVSWISYSG GSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RDAQRNSMREFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 266)</p>
	Легкая цепь В12	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRIITCRASRGISSWLAWYQQKPGK APNLLISKASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSSSIPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDSK DST YSLSSLTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO. 267)</p>
	Линкер	<p>GSGSGSGSGSGSGSGSGSGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS (SEQ ID NO. 268)</p>
	Тяжелая цепь В12	<p>QVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAP GKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRДHKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVALWDDAFDIWGQGMVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO. 269)</p>
	Линкер	<p>GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 270)</p>
	scFv 1A10	<p>QSVLTQPPSASGTPGQRV TISCSGSSSNIGNNYVTWYQQLPGT APKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY YCATWDYSLSGYVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQA PGKCLEWVSWISYSGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARD AQRNSMREFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 271)</p>
SEQ ID No. нуклеотидной последовательности		
(HC+LC) C4I + scFv 1A10	Полная последовательность: HC C4I + scFv 1A10	SEQ ID NO. 303
	Тяжелая цепь C4I	SEQ ID NO. 272

	Линкер	SEQ ID NO. 273
	scFv 1A10	SEQ ID NO. 274
	Легкая цепь С4I	SEQ ID NO. 275
scFab-Fc B12 + scFv 1A10	Полная последовательность	SEQ ID NO. 276
	Легкая цепь В12	SEQ ID NO. 277
	Линкер	SEQ ID NO. 278
	Тяжелая цепь В12	SEQ ID NO. 279
	Линкер	SEQ ID NO. 280
	scFv 1A10	SEQ ID NO. 281

Пример 6. Активность триспецифических антител *in vitro*

Для оценки способности триспецифических антител стимулировать сигнал 4-1BB выполняли основанный на клетках анализ 4-1BB. В этом исследовании клеточную линию GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat (Promega, cat# CS196004) использовали в качестве эффекторных клеток и PD-L1 и B7-H3-экспрессирующую линию раковых клеток использовали в качестве клеток-мишеней. Клеточная линия GloResponse™ NFκB-luc2/4-1BB Jurkat была генетически модифицирована для стабильной экспрессии 4-1BB и люциферазы ниже по ходу транскрипции от элемента ответа. Экспрессия люциферазы индуцировалась при связывании антитела с рецептором 4-1BB. Экспериментальный способ выполняли в соответствии с протоколом изготовителя. Результаты описаны на Фиг. 23.

Как показано на Фиг. 23, триспецифические антитела C4IxB6x1A10 и C4IxB12x1A10 демонстрировали превосходную активацию сигнала 4-1BB.

Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными описанными воплощениями, которые предназначены исключительно для иллюстрации отдельных аспектов изобретения, и любые функционально эквивалентные композиции или способы включены в объем настоящего изобретения. Специалисту в данной области техники очевидно, что различные модификации и вариации могут быть сделаны в способах и композициях по настоящему изобретению без отступления от основной идеи или объема настоящего изобретения. Таким образом, подразумевается, что настоящее изобретение

включает модификации и вариации объектов, предложенных в описании и формуле, при условии, что они попадают в объем прилагаемой формулы и эквивалентов ее пунктов.

Все публикации и патентные заявки, упоминаемые в настоящем изобретении, включены сюда посредством ссылки в такой же степени, как если бы было специально и индивидуально указано, что каждая индивидуальная публикация или патентная заявка включена посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мультиспецифическое анти-PD-L1(лиганд программируемой гибели клетки 1)/анти-B7-H3(гомолог 3 B7) антитело, содержащее анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и анти-B7-H3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

где анти-PD-L1 антитело или его фрагмент содержит: (1) VH CDR1 (область 1, определяющая комплементарность, вариабельной области тяжелой цепи), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 294; (2) VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3 и 295; (3) VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 296; (4) VL CDR1 (область 1, определяющая комплементарность, вариабельной области легкой цепи), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 13, 14 и 297; (5) VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и 298, и (6) VL CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19 и 299; и

анти-B7-H3 антитело или его фрагмент содержит: (1) VH CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 21, 22 и 23; (2) VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28 и 29, и (3) VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33 и 34; (4) VL CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 36, 37, 38 и 39; (5) VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40, 41, 42, 43, 44 и 45, и (6) VL CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 47, 48, 49 и 50.

2. Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 1,

где анти-PD-L1 антитело или его фрагмент содержит: (1) VH CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1

и 294; (2) VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3 и 295; (3) VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 5 и 296; (4) VL CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12 и 297; (5) VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и 298, и (6) VL CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16 и 299; и

анти-B7-H3 антитело или его фрагмент содержит: (1) VH CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20 и 21; (2) VH CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24 и 25, и (3) VH CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30 и 31; (4) VL CDR1, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35 и 36; (5) VL CDR2, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40 и 41, и (6) VL CDR3, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46 и 47.

3. Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 1, где анти-PD-L1 антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140 и 209, или пептид, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140 и 209.

4. Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 1, где анти-B7-H3 антитело или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 57, 58, 59, 60, 61 и 62, или пептид, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 57, 58, 59, 60, 61 и 62.

5. Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 1, где анти-PD-L1 антитело или его фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139 и 211, или пептид, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139 и 211.

6. Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 1, где анти-B7-H3 антитело или его фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55 и 56, или пептид, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 51, 52, 53, 54, 55 и 56.

7. Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 1, где анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью связываться с по меньшей мере одним из аминокислотных остатков, выбранных из Y134, K162 и N183 белка PD-L1.

8. Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 1, где анти-B7-H3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент восстанавливает активность Т-клетки, ингибированную иммунной контрольной точкой B7-H3.

9. Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 1, где каждое из анти-PD-L1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и анти-B7-H3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента независимо представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело.

10. Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 1, где каждое из анти-PD-L1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и анти-B7-H3 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента независимо выбрано из группы, состоящей из полноразмерного IgG, Fab, Fab', F(ab')₂, scFab, dsFv, Fv, scFv, scFv-Fc, scFab-Fc, диатела, миниантитела, scAb, dAb, полу-IgG и их комбинаций.

11. Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 1, которое представлено в форме IgG X форма scFv.

12. Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 1, которое представлено в форме (HC + LC) X форма scFab-Fc.

13. Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 1, дополнительно содержащее антитело анти-4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент.

14. Мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 13, где антитело анти-4-1BB или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из полноразмерного IgG, Fab, Fab', F(ab')₂, scFab, dsFv, Fv, scFv, scFv-Fc, scFab-Fc, диатела, миниантитела, scAb, dAb, полу-IgG и их комбинаций.

15. Биспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело, содержащее анти-PD-L1-часть, обладающую специфичностью связывания в отношении белка PD-L1 человека, и анти-B7-H3-часть, обладающую специфичностью связывания в отношении белка B7-H3 человека.

16. Биспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 15, содержащее Fc-фрагмент.

17. Биспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 16, где анти-PD-L1-часть содержит сайт связывания с PD-L1, расположенный на N-концевой стороне Fc-фрагмента, и анти-B7-H3-часть содержит сайт связывания с B7-H3, расположенный на N-концевой стороне Fc-фрагмента.

18. Биспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 17, где каждый из сайта связывания с PD-L1 и сайта связывания с B7-H3 независимо выбран из группы, состоящей из Fab-фрагмента, одноцепочечного Fab-фрагмента (scFab), однодоменного антитела (sdAb), scFv и связывающей группировки.

19. Биспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 18, где сайт связывания с PD-L1 представляет собой Fab-фрагмент и сайт связывания с B7-H3 представляет собой scFab-фрагмент.

20. Биспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 18, где сайт связывания с PD-L1 представляет собой scFab-фрагмент и сайт связывания с B7-H3 представляет собой Fab.

21. Биспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по любому из п.п. 15-20, которое является моновалентным в отношении связывания с PD-L1 и моновалентным в отношении связывания с B7-H3.

22. Биспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по любому из п.п. 15-21, где анти-PD-L1-связывающая часть может специфически связываться с доменом иммуноглобулина С (Ig C) белка PD-L1 человека, где домен Ig C состоит из аминокислотных остатков 133-225.

23. Биспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по п. 22, где анти-PD-L1-связывающая часть может специфически связываться с аминокислотными остатками Y134, K162 и N183 белка PD-L1 человека.

24. Фармацевтическая композиция, содержащая мультиспецифическое анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитело по любому из п.п. 1-23 и фармацевтически приемлемый носитель.

25. Фармацевтическая композиция по п. 24 для лечения или предупреждения заболевания, ассоциированного с PD-L1, B7-H3 или ими обоими.

26. Фармацевтическая композиция по п. 25, где заболевание, ассоциированное с PD-L1, B7-H3 или ими обоими, представляет собой рак.

27. Способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества мультиспецифического анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитела по любому из п.п. 1-23.

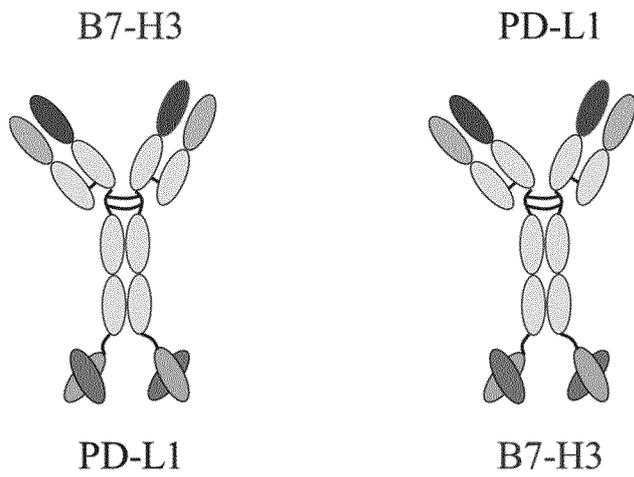
28. Способ по п. 27, где рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака почки, рака яичника, рака желудка, рака печени, рака легкого, рака ободочной и прямой кишки, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака мочевого пузыря, рака яичка, рака матки, рака предстательной железы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), нейробластомы, рака головного мозга, рака толстой кишки, плоскоклеточной карциномы, меланомы, миеломы, рака шейки матки, рака щитовидной железы, рака головы и шеи и рака надпочечника.

29. Применение мультиспецифического анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитела по любому из п.п. 1-23 в изготовлении лекарственного средства для лечения или предупреждения заболевания, ассоциированного с PD-L1, B7-H3 или ими обоими.

30. Применение мультиспецифического анти-PD-L1/анти-B7-H3 антитела по любому из п.п. 1-23 для лечения или предупреждения заболевания, ассоциированного с PD-L1, B7-H3 или ими обоими.

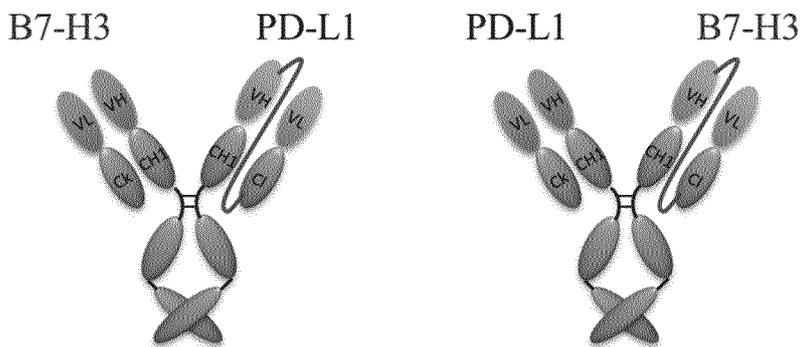
Фиг. 1а

“формат 2+2”

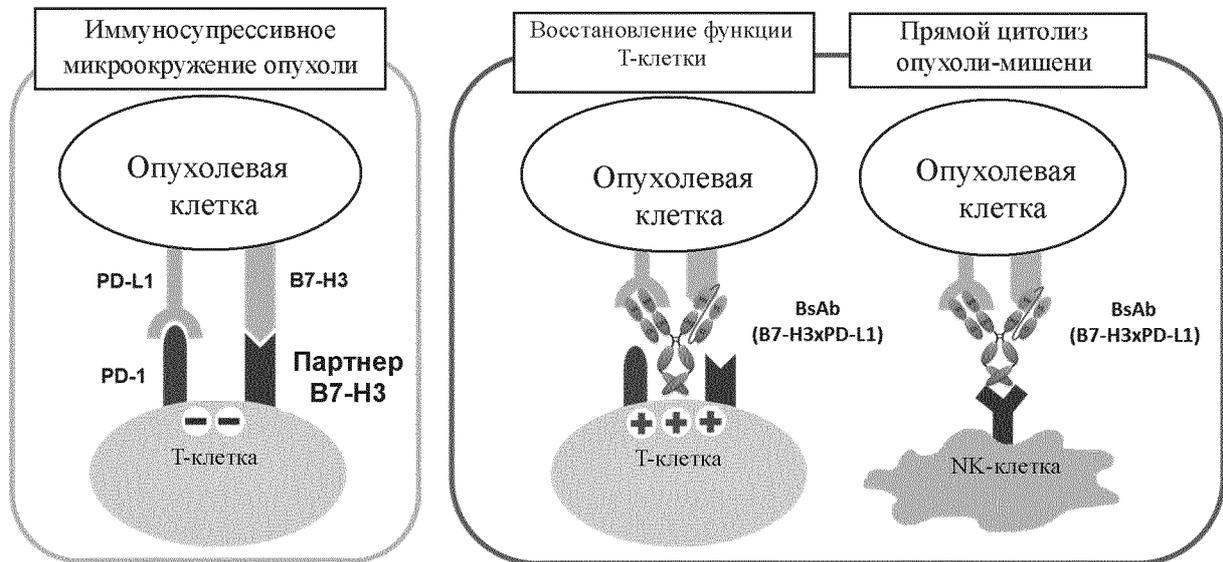


Фиг. 1б

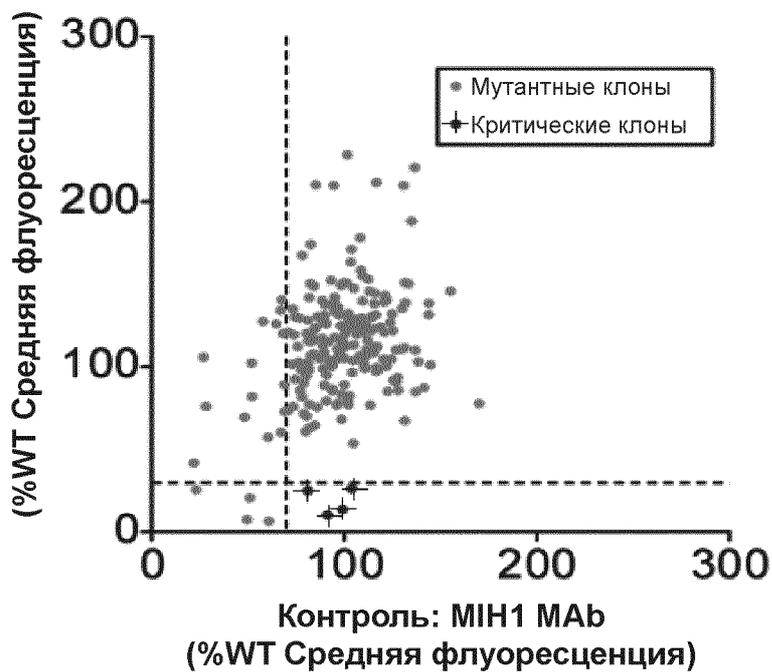
“формат 1+1”



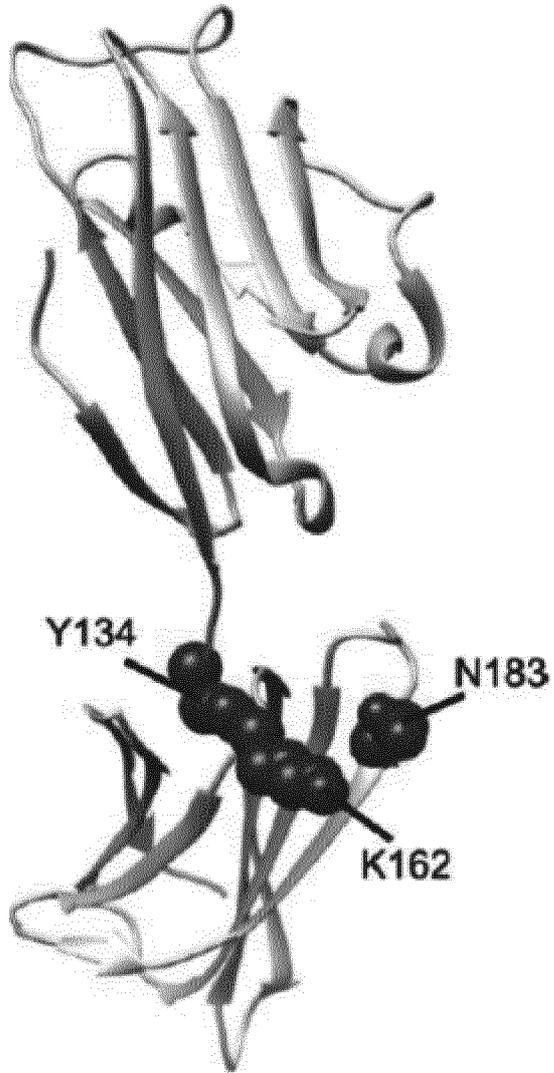
Фиг. 2

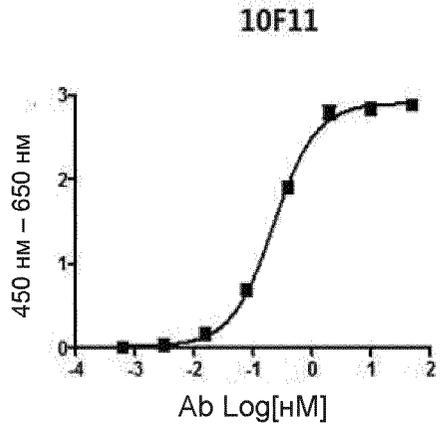
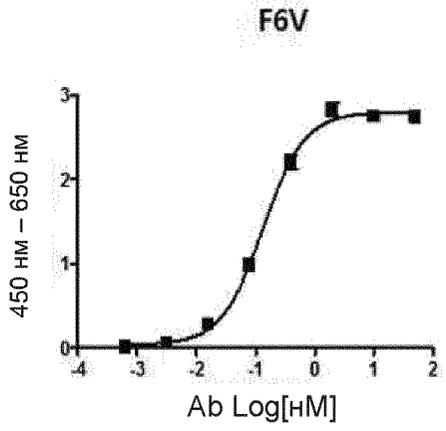
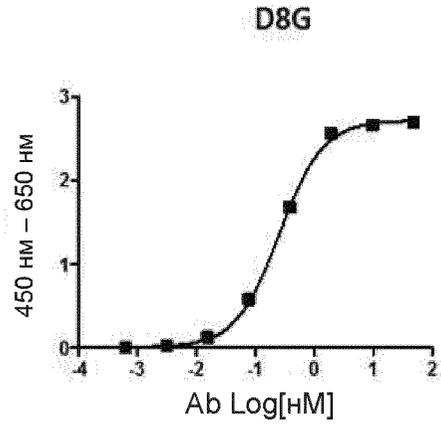
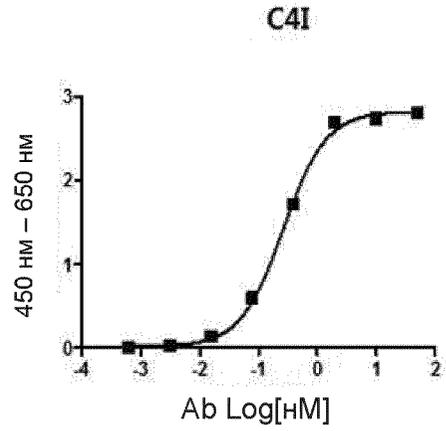
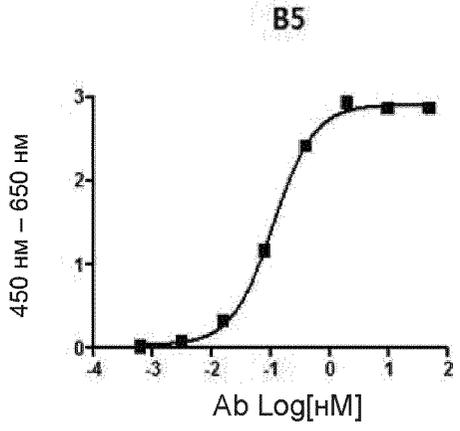


Фиг. 3



Фиг. 4

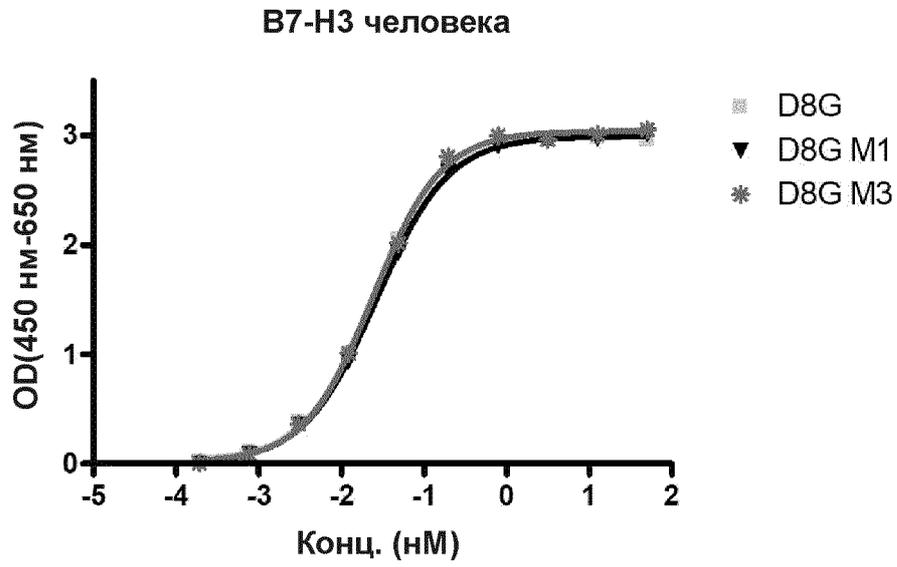


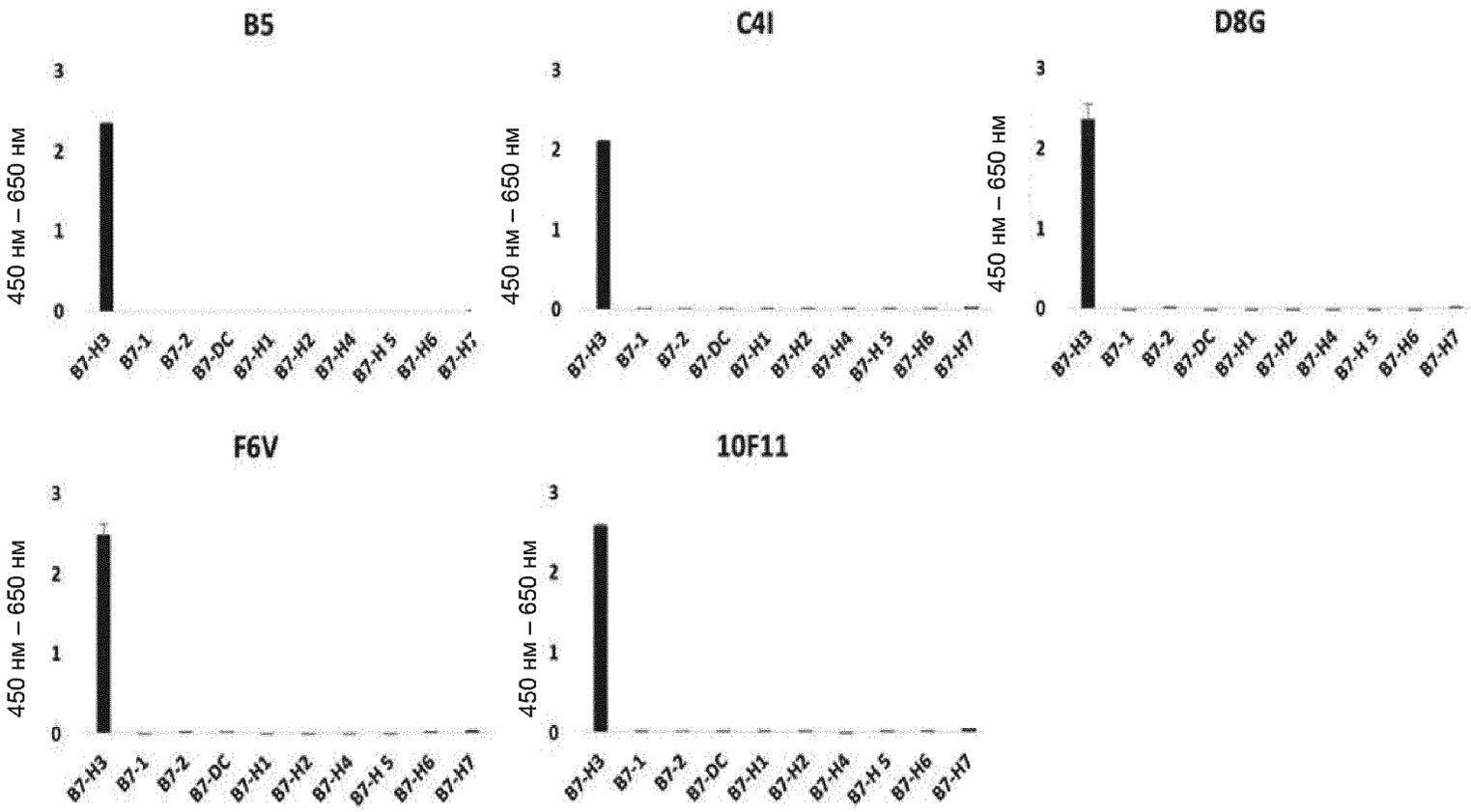


Фиг. 5а

Мультиспецифические
анти-RD-L1/анти-B7-H3 антитела
и их применения

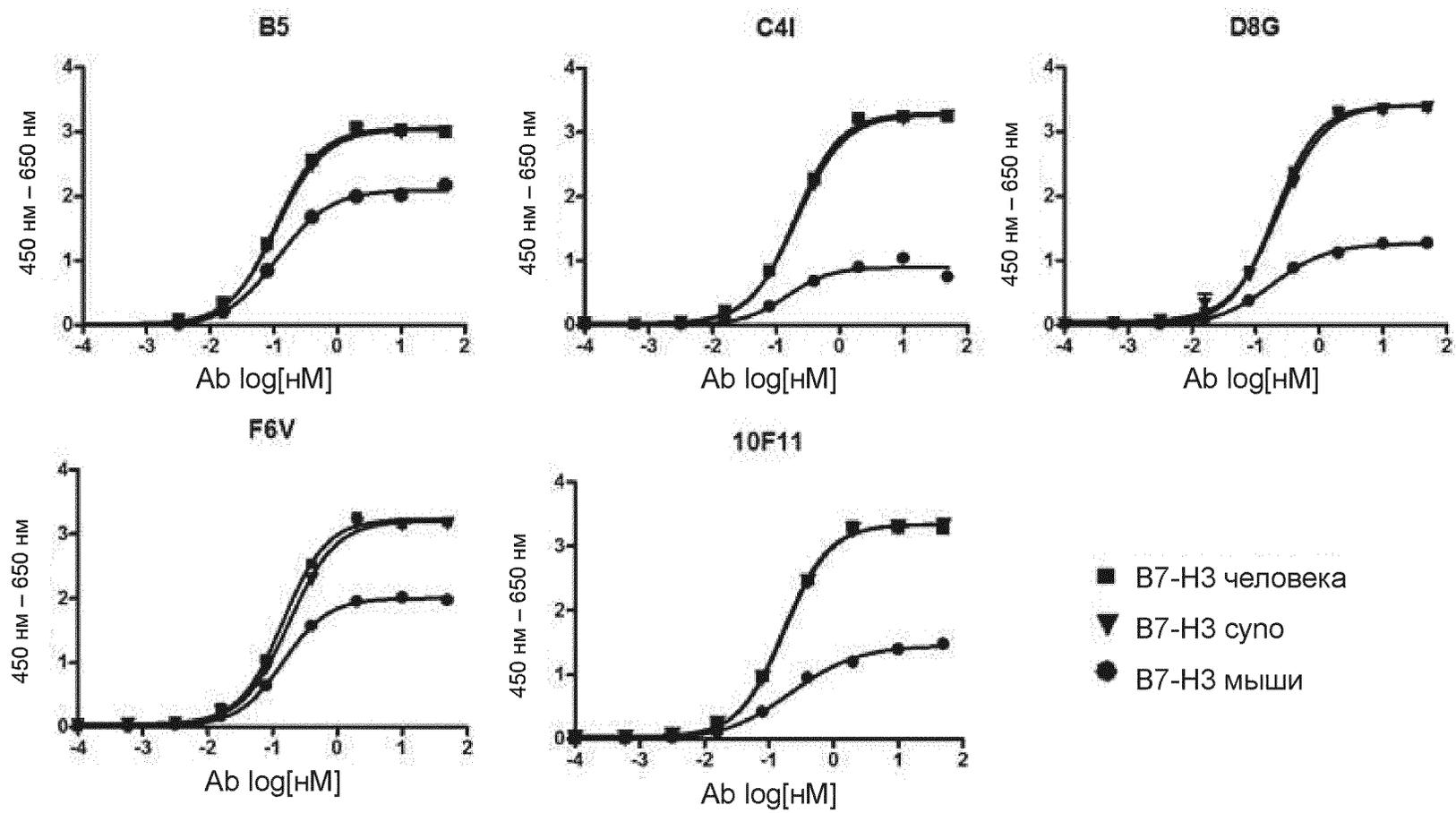
Фиг. 5б





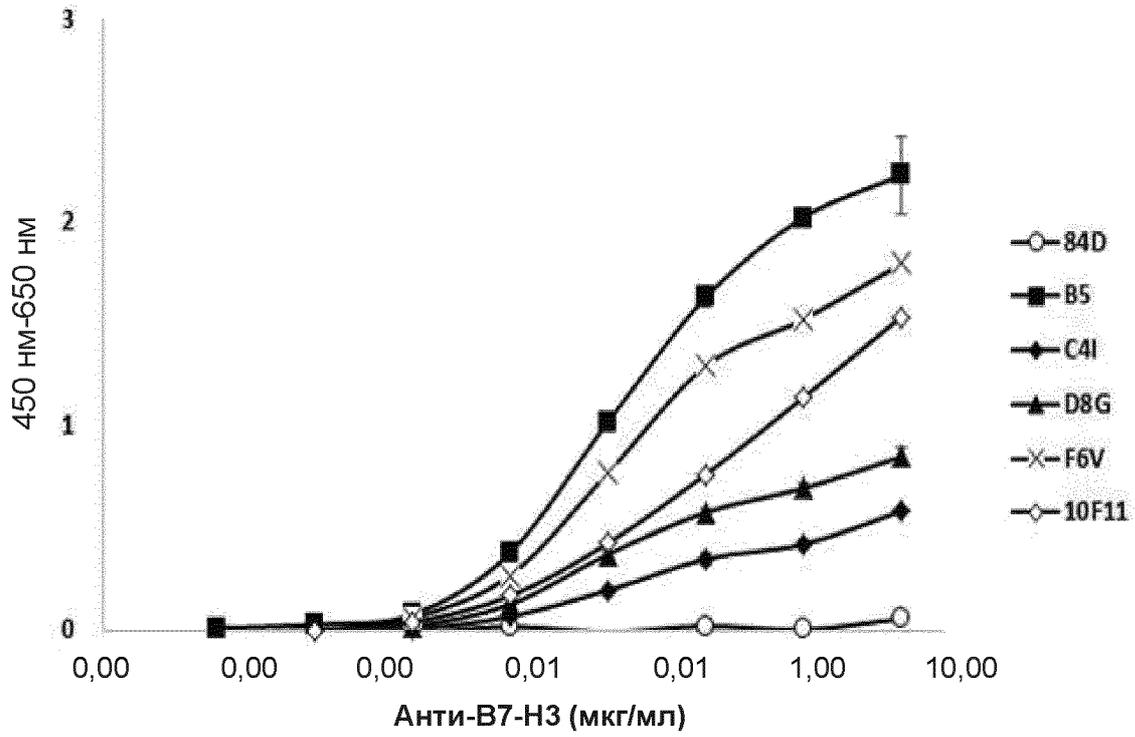
Фиг. 6

Мультиспецифические
анти-RD-L1/анти-B7-H3 антитела
и их применения

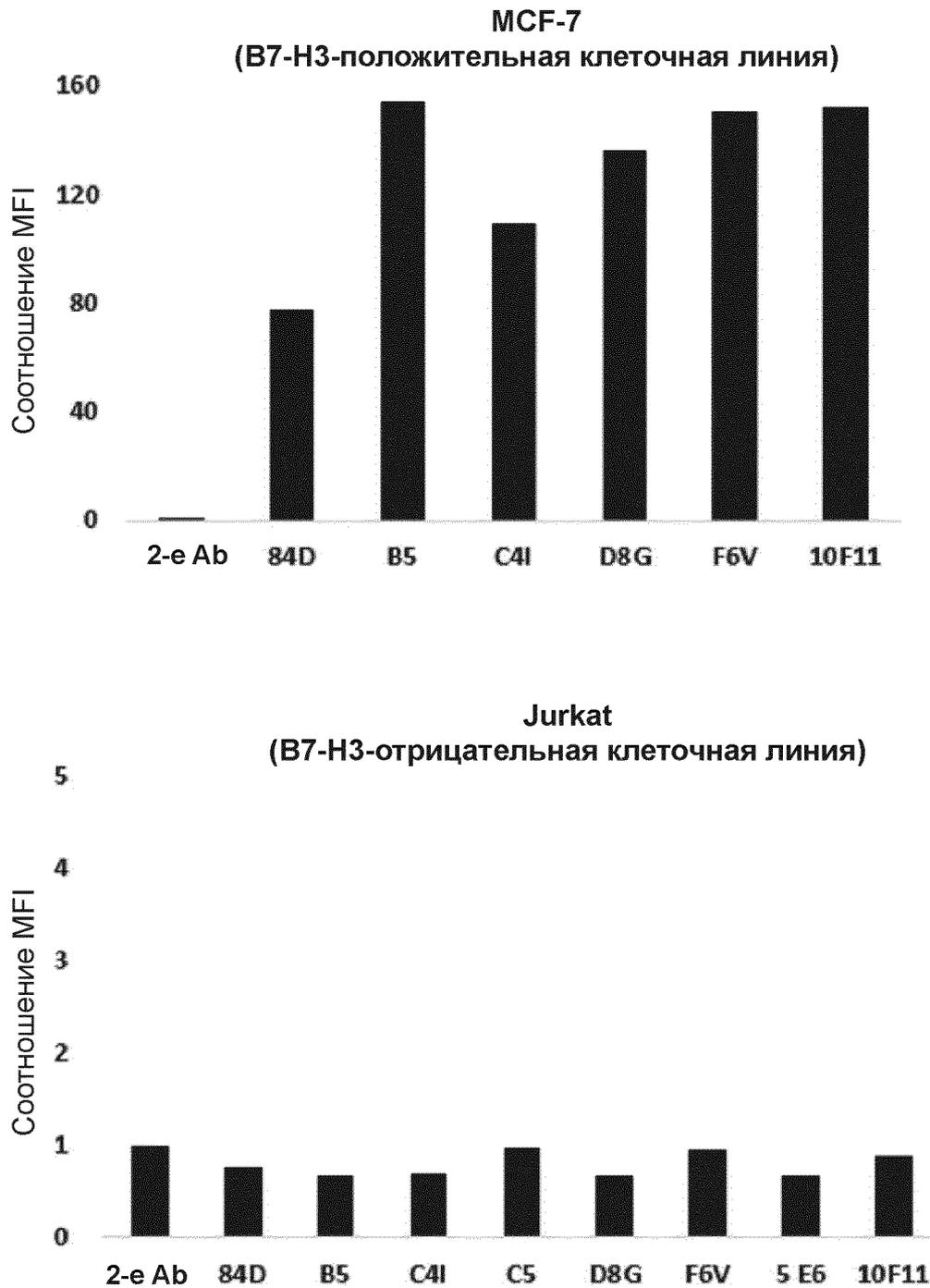


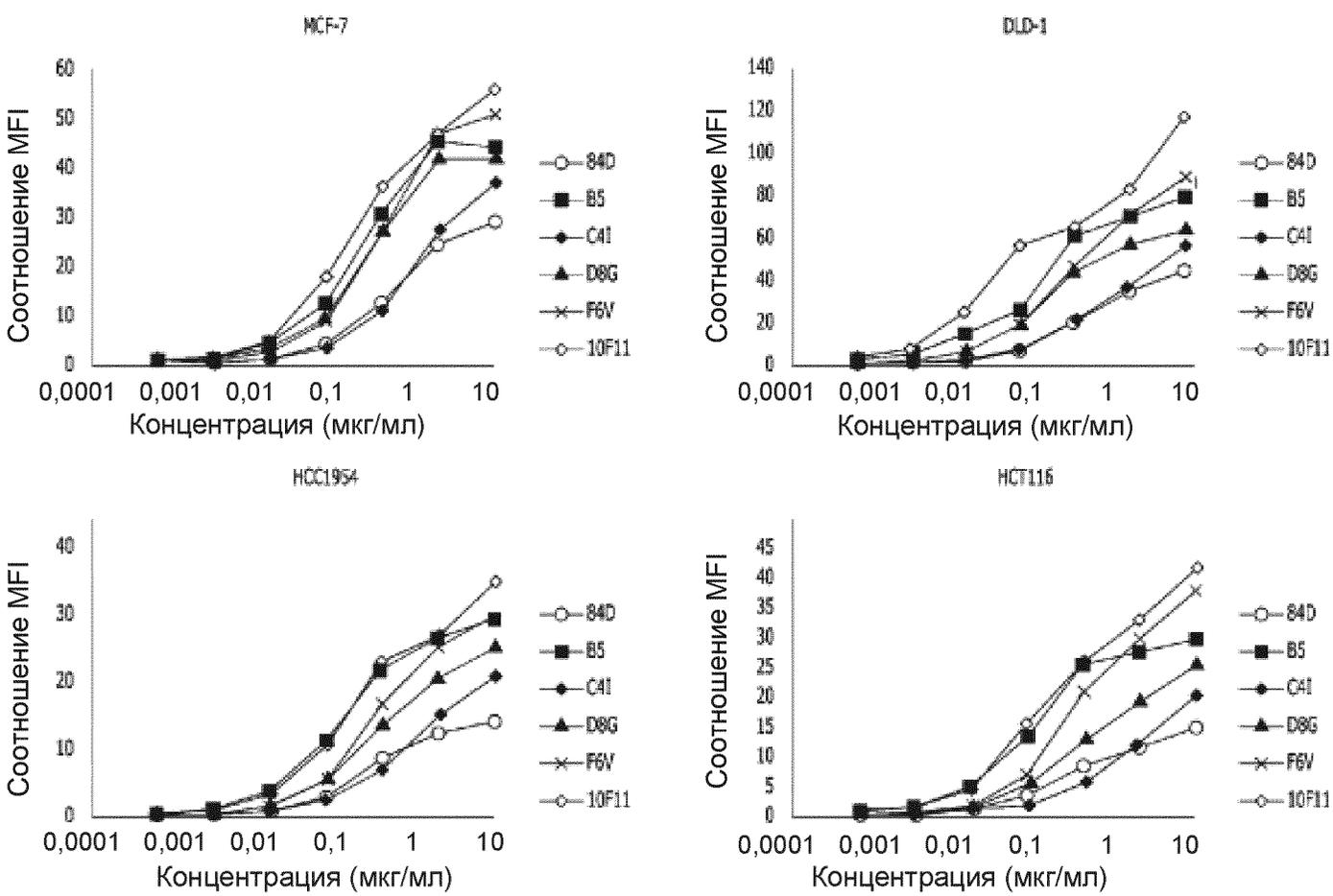
Фиг. 7

Фиг. 8



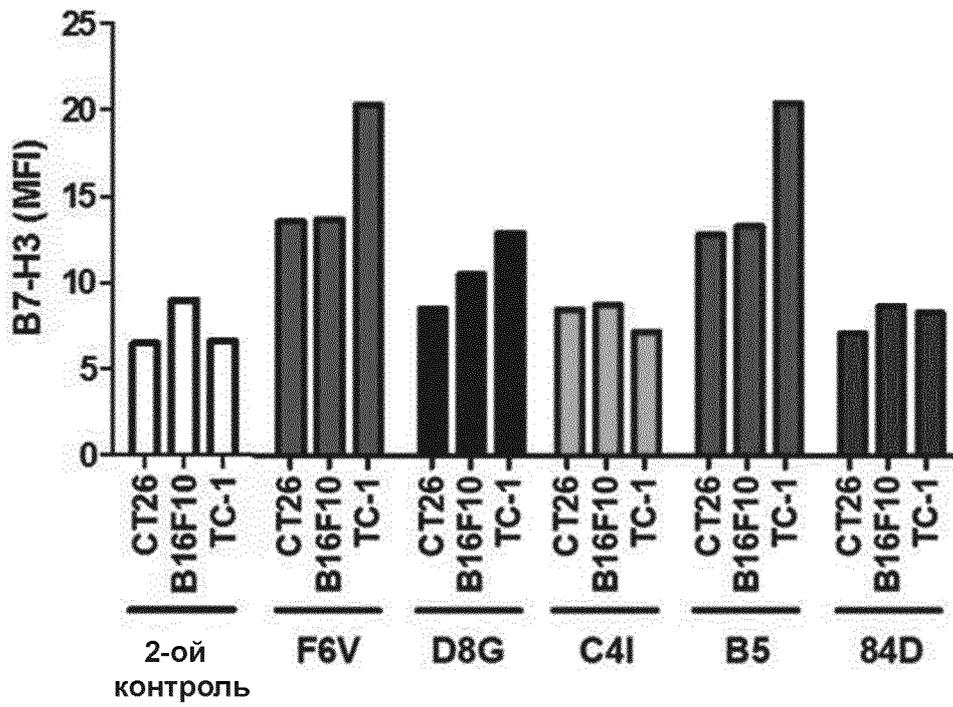
Фиг. 9



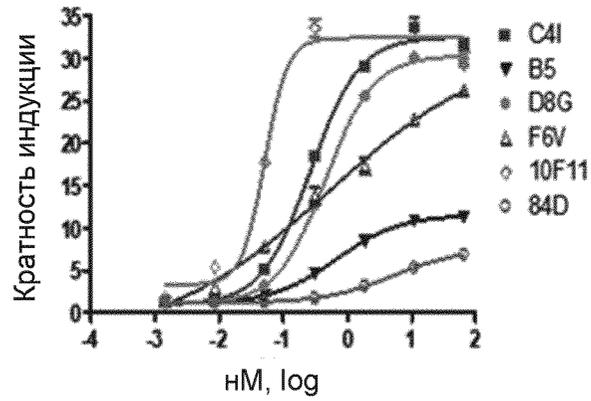


Фиг. 10

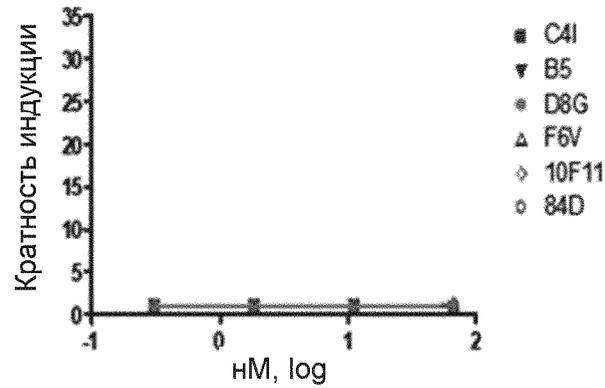
Фиг. 11



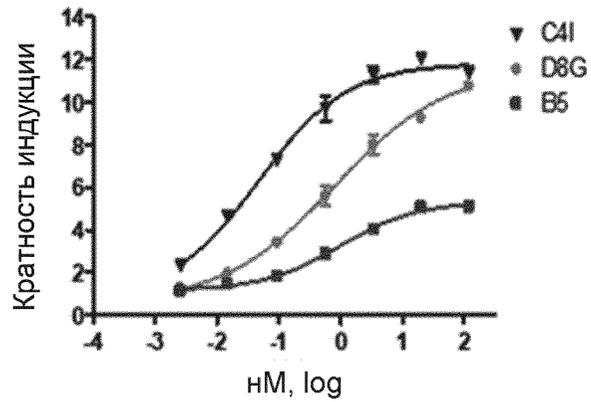
MCF-7 (B7-H3-положительная клеточная линия)



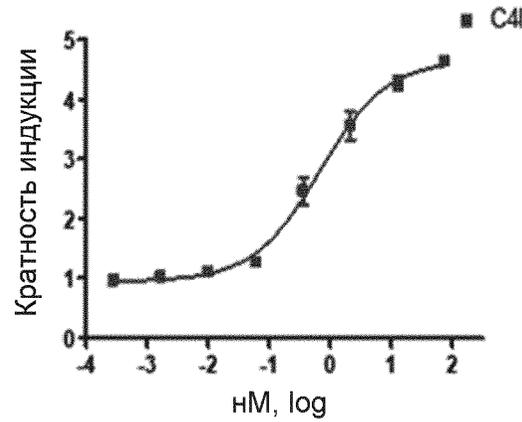
Jurkat (B7-H3-отрицательная клеточная линия)



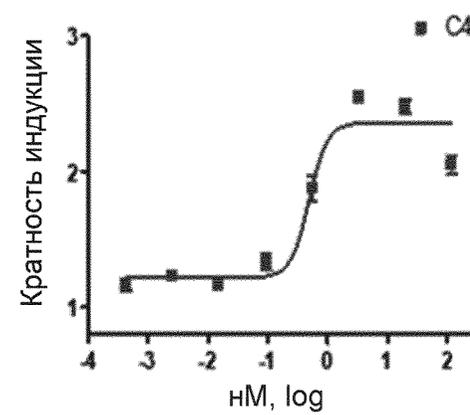
Calu-6 (B7-H3-положительная клеточная линия)



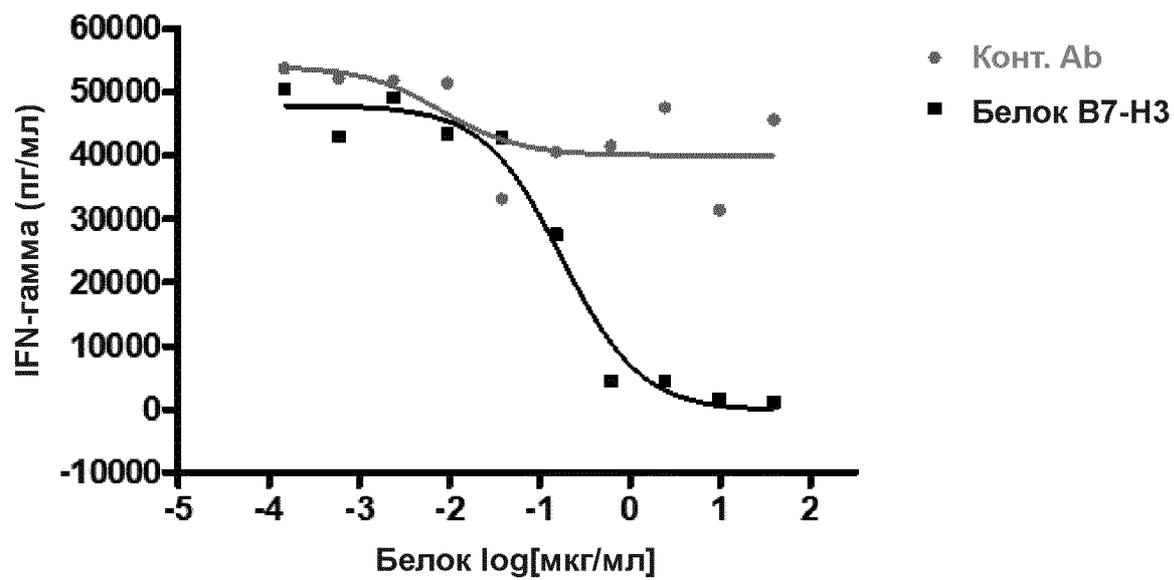
DLD-1 (B7-H3-положительная клеточная линия)



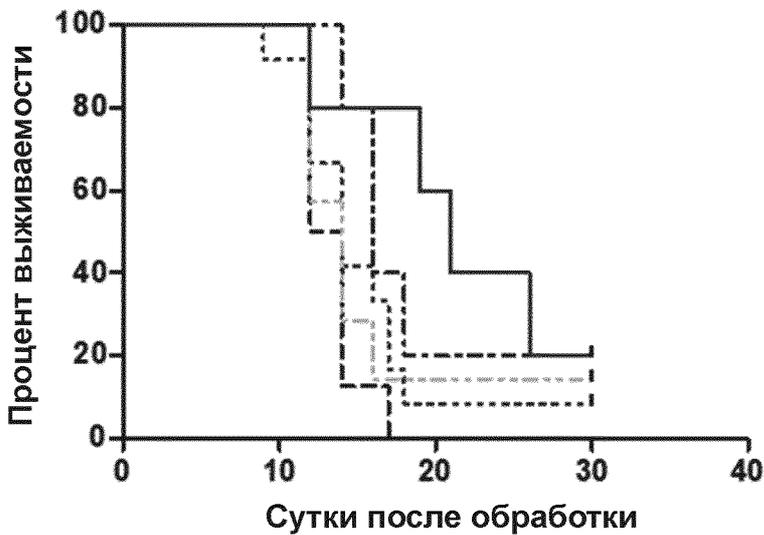
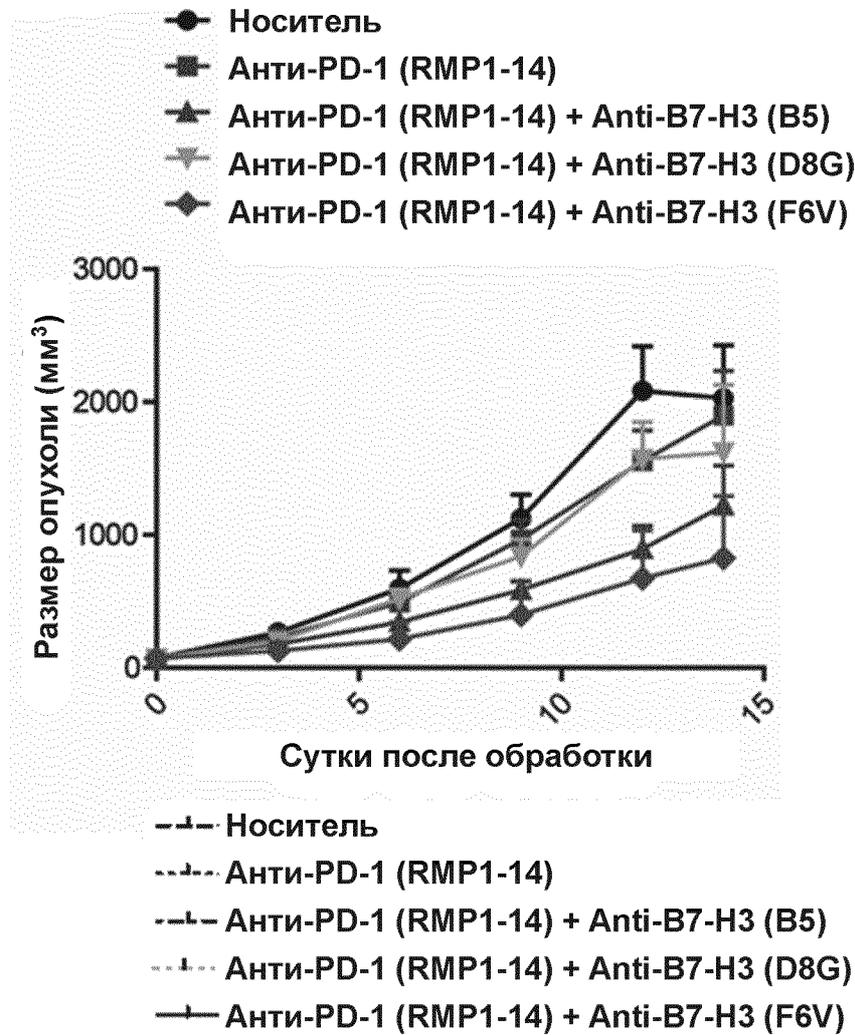
Mino (B7-H3-положительная клеточная линия)



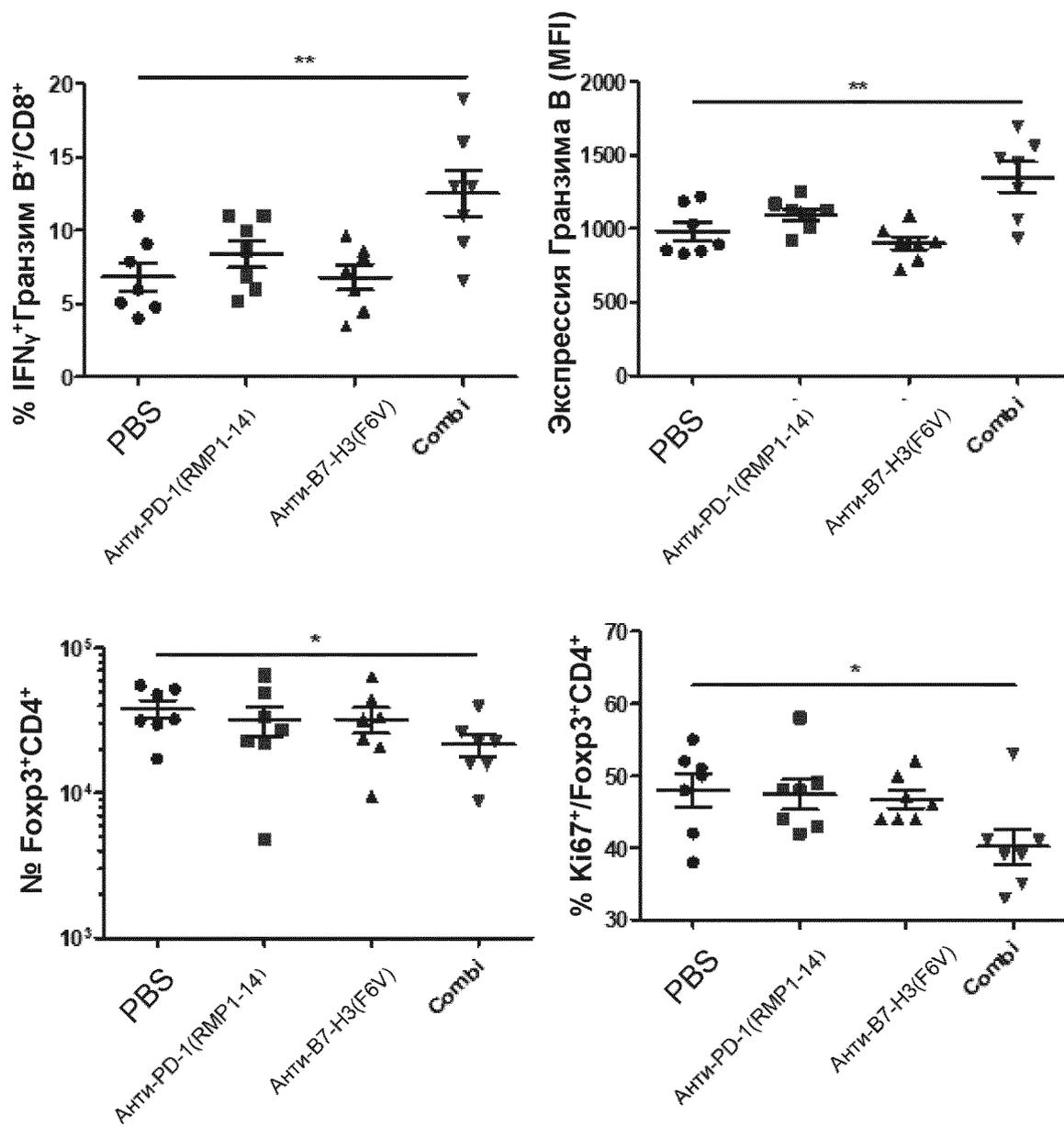
Фиг. 13а



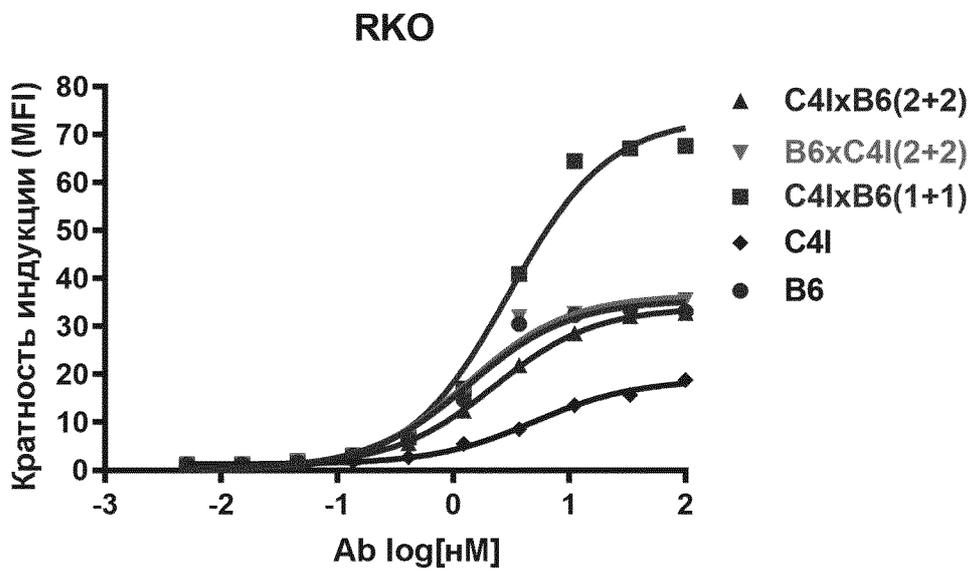
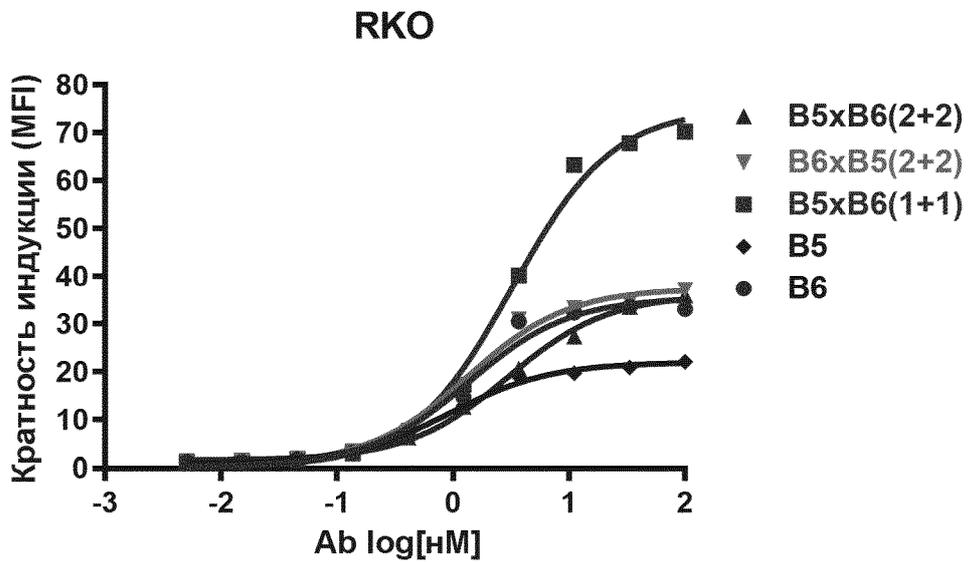
Фиг. 15



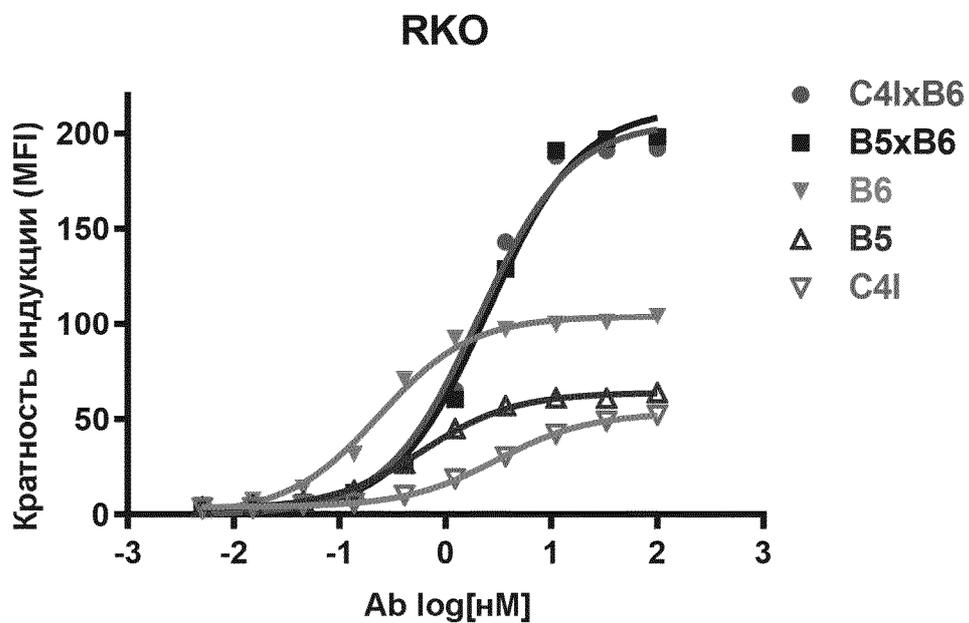
Фиг. 16



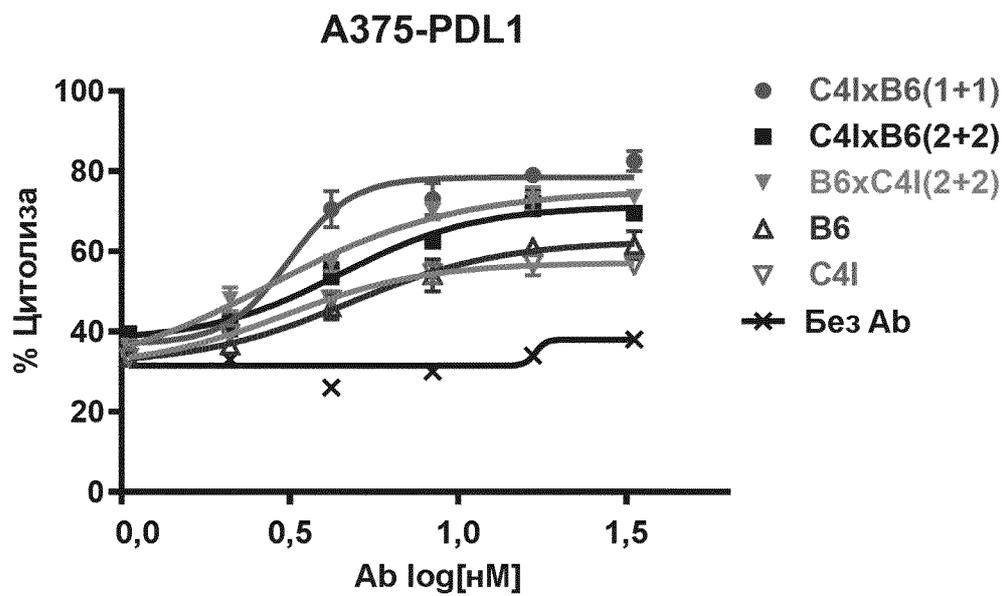
Фиг. 17



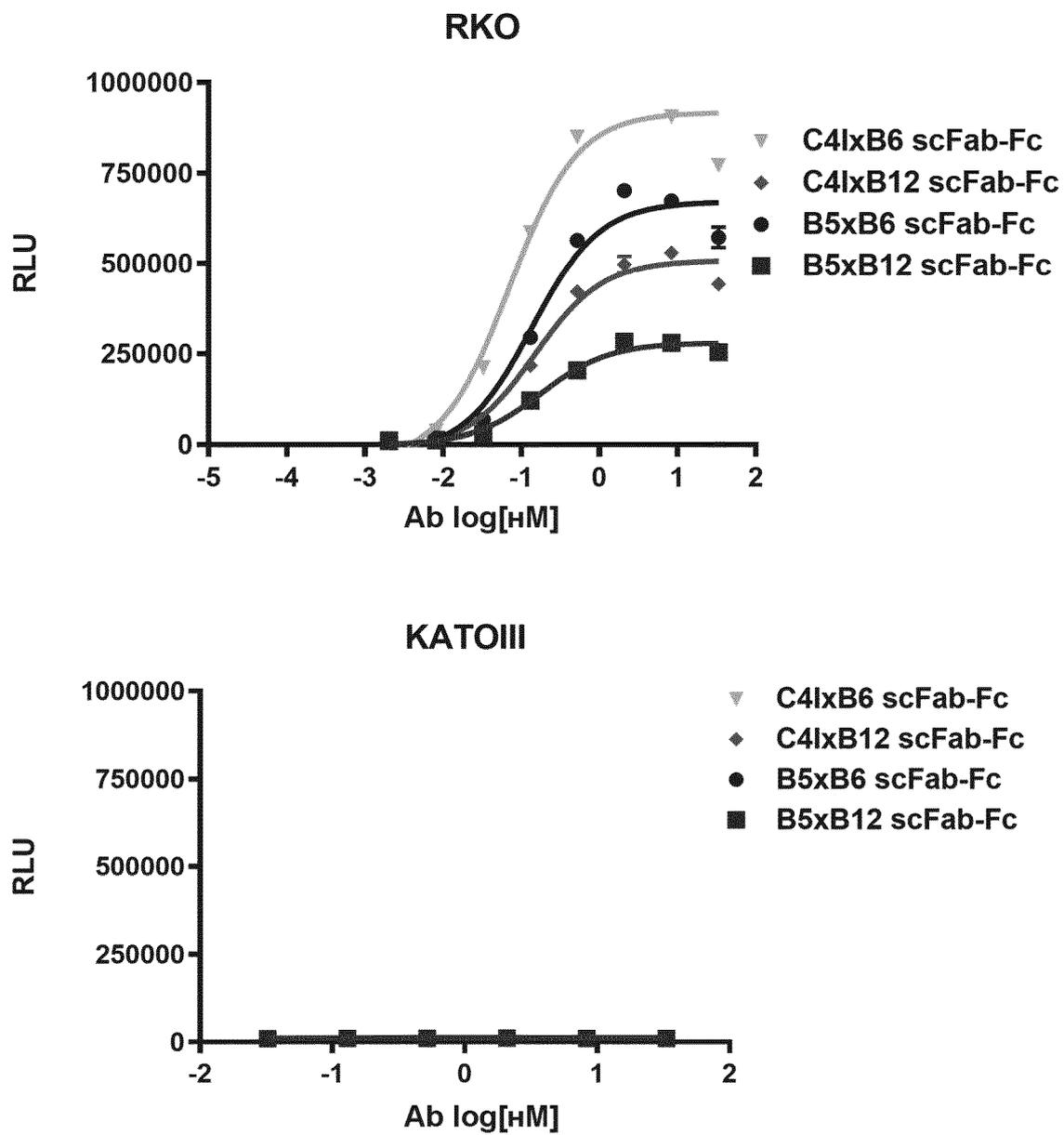
Фиг. 18



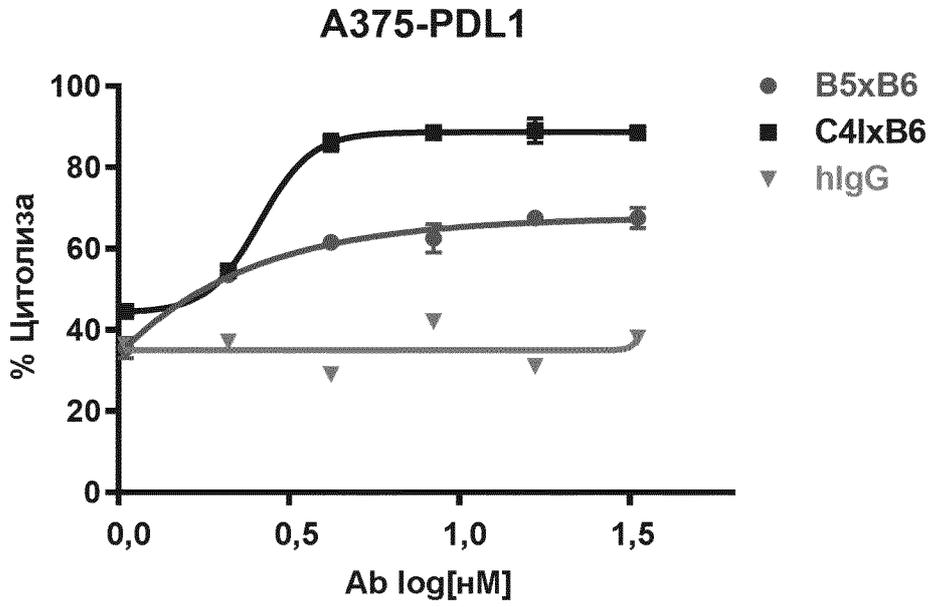
Фиг. 19



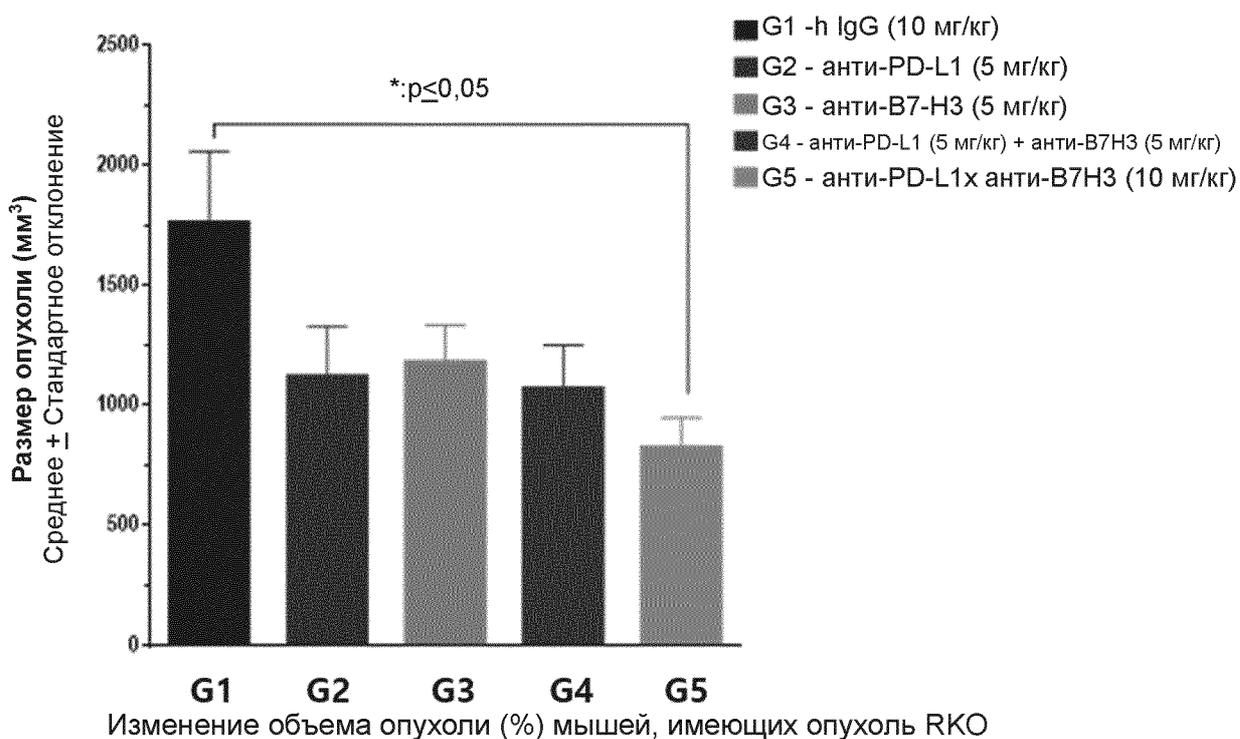
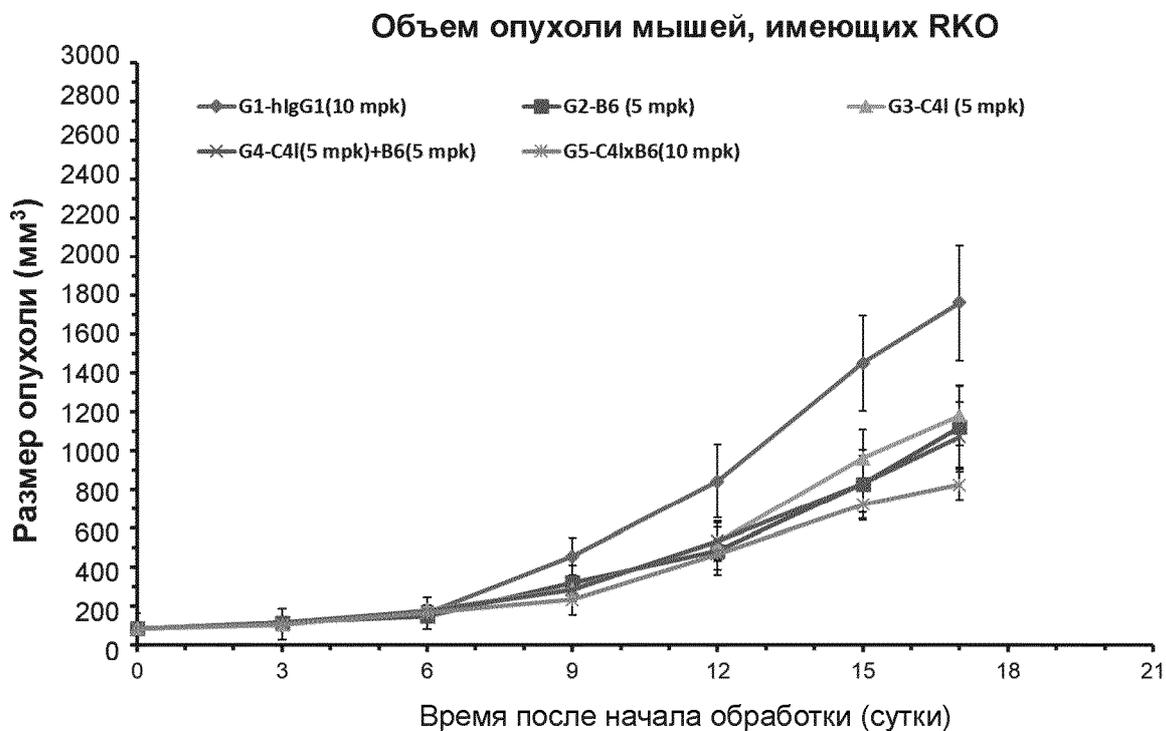
Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23

