

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391538** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.04.03

(22) Дата подачи заявки
2018.08.27

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛО ПРОТИВ PD-L1 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **201810309302.5**

(32) **2018.04.09**

(33) **CN**

(62) **202092420; 2018.08.27**

(71) Заявитель:
**ОРИСЕЛЛ ТЕРАПЬЮТИКС КО.,
ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:

**Ли Бохуа, Ван Хуацзин, Хэ Сяовэнь
(CN)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, способному связываться с белком PD-L1, биспецифическому антителу, которое содержит первый нацеливающий фрагмент, который специфически связывается с белком PD-L1, и второй нацеливающий фрагмент, который специфически связывается с белком CD137. Также предложены фармацевтическая композиция на их основе, а также применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, биспецифического антитела или фармацевтической композиции в производстве лекарственного средства для лечения опухолей.

A1

202391538

202391538

A1

АНТИТЕЛО ПРОТИВ PD-L1 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящая заявка относится к области биомедицины, в частности, к антителу против PD-L1, и дополнительно относится к способу лечения злокачественных новообразований посредством использования такого антитела в комбинации с антителом против CD137 и дополнительно относится к биспецифическому антителу, образованному таким антителом и антителом против CD137.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Белок программируемой гибели клеток-1 (PD-1, также известный как CD279) и его лиганды PD-L1 (также известный как B7-H1, CD274) и PD-L2 (также известный как B7-DC, CD273) взаимодействуют, что приводит к возникновению отрицательного костимуляторного сигнала для регуляции активации Т-клеток. В отсутствие костимуляторного сигнала Т-клеткам трудно воспринимать антигенную стимуляцию, они не могут обеспечивать эффективный иммунный ответ, и это также может приводить к истощению или толерантности к гетерогенным антигенам. PD-1 может экспрессироваться в Т-клетках, В-клетках, естественных киллерных Т-клетках, активированных мононуклеарных клетках и дендритных клетках (DC). PD-1 может экспрессироваться активированными, но не стимулированными CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками, В-клетками и клетками костного мозга человека. PD-L1 и PD-L2 отличаются друг от друга профилями своей экспрессии. PD-L1 может экспрессироваться не только в гемопоэтических клетках, но также и в различных негемопоэтических клетках, где экспрессия PD-L2, главным образом, ограничена дендритными клетками и макрофагами. В7.1 (CD80) также является рецептором PD-L1, экспрессирующимся в активированных В-клетках, Т-клетках, макрофагах и дендритных клетках. Как лиганд PD-1 и В7.1, PD-L1 также селективно экспрессируется в различных опухолевых клетках. Ингибирование передачи сигнала PD-L1 включает блокирование взаимодействия между PD-L1 и PD-1 и В7.1 или и тем, и другим, и, таким образом, предотвращение отправки PD-L1 отрицательного костимуляторного сигнала в Т-клетки и другие антигенпрезентирующие клетки. Это может усиливать иммунный ответ на инфекцию (например, острую или хроническую) и противоопухолевый иммунитет.

[0003] CD137 (также известный как 4-1BB, TNFRSF9, и т.д.) является трансмембранным белком суперсемейства фактора некроза опухоли (TNFRS). Исследования показывают, что CD137-активирующее моноклональное антитело повышает экспрессию костимуляторных молекул во множестве моделей, что значительно повышает ответ цитолитических Т-лимфоцитов и играет противоопухолевую роль. Противоопухолевый ответ CD137-направленных способов терапии показан в исследованиях, включающих противоопухолевый терапевтический эффект активирующего моноклонального антитела против CD137 мыши у мышей.

[0004] В настоящее время, антитела против PD-L1 одобрены для использования в

лечении некоторых злокачественных новообразований, и существующие антитела против CD137 потенциально можно использовать в лечении различных опухолей. Сообщают, что исследовали противоопухолевый терапевтический эффект антитела против PD-1 в комбинации с антителом против CD137 посредством использования модели мышей, несущих опухоли. Результаты показали, что два антитела, используемые в комбинации, демонстрируют значительно усиленную ингибирующую опухоль активность по сравнению с их использованием по отдельности, но с точки зрения комплаентности и боли, комбинированное лечение доставляет неудобство пациентам и повышает затраты на лечение. Разработка биспецифического антитела (BsAb) из двух моноклональных антител может помочь решить указанную выше проблему благодаря наличию двух специфических антигенсвязывающих участков в биспецифическом антителе. Таким образом, существует острая необходимость в разработке нового антитела против PD-L1, имеющего лучшую фармацевтическую эффективность и более низкую иммуногенность, и биспецифического антитела PD-L1/CD137 для достижения лучшего противоопухолевого эффекта.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Настоящая заявка относится к антителу против PD-L1, его антигенсвязывающему фрагменту или варианту, имеющему одно или более из следующих свойств: 1) может связываться с белком PD-L1 с высокой аффинностью и специфичностью; 2) может ингибировать связывание белка PD-1 с белком PD-L1; и 3) может приводить к облегчению симптомов или лечению опухолей. Настоящая заявка также относится к биспецифическому антителу, имеющему одно или более из следующих свойств: 1) может связываться с белком PD-L1 с высокой аффинностью и специфичностью; 2) может связываться с белком CD137 с высокой аффинностью и специфичностью; 3) может усиливать функции Т-клеток; и 4) может приводить к облегчению симптомов или лечению опухолей. Настоящая заявка также относится к способу получения и применению антитела против PD-L1, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта, биспецифическому антителу.

[0006] В одном из аспектов настоящая заявка относится к антителу, его антигенсвязывающему фрагменту или варианту, связывающемуся с белком PD-L1 с KD 3×10^{-9} М или менее.

[0007] В некоторых вариантах осуществления антитело включает легкую цепь антитела или ее фрагмент, включающую LCDR1, и LCDR1 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53: TGTX1SX2VGGYX3X4VS; где X1 является S, R или V; X2 является D, E или S; X3 является N или R; X4 является Y или E, и где LCDR1 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat.

[0008] В некоторых вариантах осуществления LCDR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54-58. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела или ее фрагмент включает LCDR2, включающую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59: X1NSX2RPS, где X1 является G или E; X2 является N или I, и где LCDR2 определяют в

соответствии с индексом нумерации антител Kabat. В некоторых вариантах осуществления LCDR2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60-61. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела или ее фрагмент включает LCDR3, включающую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62: QSYDSSLGSGX1V, где X1 является S или T, и где LCDR3 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat.

[0009] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает каркасные области L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4. В некоторых вариантах осуществления каркасные области выбраны из группы, состоящей из консенсусных каркасных последовательностей человека и последовательностей зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления С-конец L-FR1 прямо или косвенно связан с N-концом LCDR1, и L-FR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления L-FR2 находится между LCDR1 и LCDR2, и L-FR2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления L-FR3 находится между LCDR2 и LCDR3, и L-FR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73-75. В некоторых вариантах осуществления N-конец L-FR4 прямо или косвенно связан с С-концом LCDR3, и L-FR4 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 76.

[0010] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела или ее фрагмент включает переменную область легкой цепи VL, и переменная область легкой цепи VL включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 41.

[0011] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает константную область человека, и константная область человека включает константную область Ig λ человека.

[0012] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела или ее фрагмент включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 42.

[0013] В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, включающую HCDR1, и HCDR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 45: X1YAIS, где X1 является S или T, и где HCDR1 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает HCDR2, HCDR2 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48, и где HCDR2 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat. В некоторых

вариантах осуществления тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает HCDR3, и HCDR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из приведенных в SEQ ID NO: 49: TMX1X2YX3X4GNX5DY, где X1 является D, E или G, X2 является G или E, X3 является S или G, X4 является Y или F, X5 является F или Y, и где HCDR3 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat. В некоторых вариантах осуществления HCDR3 включает аминокислотную последовательность, приведенную в группе SEQ ID NO: 50-52.

[0014] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает каркасные области H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4. В некоторых вариантах осуществления каркасные области выбраны из группы, состоящей из консенсусных каркасных последовательностей человека и последовательностей зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления С-конец H-FR1 прямо или косвенно связан с N-концом HCDR1, и H-FR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 65-67. В некоторых вариантах осуществления H-FR2 находится между HCDR1 и HCDR2, и H-FR2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 68. В некоторых вариантах осуществления H-FR3 находится между HCDR2 и HCDR3, и H-FR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 69. В некоторых вариантах осуществления N-конец H-FR4 прямо или косвенно связан с С-концом HCDR3, и H-FR4 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70.

[0015] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает переменную область тяжелой цепи VH, и переменная область тяжелой цепи VH включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 35.

[0016] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает константную область человека, и константная область человека включает константную область IgG1 человека.

[0017] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 36.

[0018] В некоторых вариантах осуществления белок PD-L1 выбран из группы, состоящей из белка PD-L1 человека, белка PD-L1 обезьяны и белка PD-L1 мыши.

[0019] В другом аспекте настоящая заявка относится к антителу, его антигенсвязывающему фрагменту или варианту, связывающемуся с белком CD137 с K_D 5×10^{-9} М или менее.

[0020] В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант связывается с белком CD137 с K_D 3×10^{-9} М или менее.

[0021] В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может приводить к облегчению или лечению опухолей. В

некоторых вариантах осуществления антитела, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может приводить к облегчению или лечению рака толстого кишечника.

[0022] В некоторых вариантах осуществления антитела включает легкую цепь антитела или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь или ее фрагмент включает LCDR1-3, и аминокислотные последовательности LCDR1-3 последовательно приведены в SEQ ID NO: 80-82. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает каркасные области LFR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4. В некоторых вариантах осуществления каркасные области выбраны из группы, состоящей из консенсусных каркасных последовательностей человека и последовательностей зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления С-конец L-FR1 прямо или косвенно связан с N-концом LCDR1, и L-FR1 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления L-FR2 находится между LCDR1 и LCDR2, и L-FR2 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90. В некоторых вариантах осуществления L-FR3 находится между LCDR2 и LCDR3, и L-FR3 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 91. В некоторых вариантах осуществления N-конец L-FR4 прямо или косвенно связан с С-концом LCDR3, и L-FR4 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 92.

[0023] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела или ее фрагмент включает вариабельную область легкой цепи VL, и вариабельная область легкой цепи VL включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20.

[0024] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает константную область человека, и константная область человека включает константную область Ig λ человека.

[0025] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела или ее фрагмент включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23.

[0026] В некоторых вариантах осуществления антитела включает тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, где тяжелая цепь или ее фрагмент включает HCDR1-3, и аминокислотные последовательности HCDR1-3 последовательно приведены в SEQ ID NO: 77-79. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает каркасные области H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4. В некоторых вариантах осуществления каркасные области выбраны из группы, состоящей из консенсусных каркасных последовательностей человека и последовательностей зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления С-конец H-FR1 прямо или косвенно связан с N-концом HCDR1, и H-FR1 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84-85. В некоторых вариантах осуществления H-FR2 находится между HCDR1 и HCDR2, и H-FR2 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86. В некоторых вариантах осуществления H-FR3 находится между HCDR2 и HCDR3, и H-FR3 включает

аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления N-конец H-FR4 прямо или косвенно связан с C-концом HCDR3, и H-FR4 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 88.

[0027] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает переменную область тяжелой цепи VH, и переменная область тяжелой цепи VH включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 25.

[0028] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает константную область человека, и константная область человека включает константную область IgG человека.

[0029] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 27.

[0030] В некоторых вариантах осуществления белок CD137 включает белок CD137 человека.

[0031] В другом аспекте настоящая заявка относится к биспецифическому антителу, связывающемуся с белком PD-L1 с K_D 2×10^{-9} М или менее и связывающемуся с белком CD137 с K_D 8×10^{-9} М или менее.

[0032] В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело включает первый нацеливающий фрагмент, специфически связывающийся с белком PD-L1, где первый нацеливающий фрагмент включает антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант.

[0033] В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело включает второй нацеливающий фрагмент, специфически связывающийся с белком CD137, где второй нацеливающий фрагмент включает антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, связывающийся с белком CD137. В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающееся с белком CD137, включает scFv, и scFv включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело включает первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь включает переменную область тяжелой цепи антитела, связывающуюся с белком PD-L1, переменную область тяжелой цепи антитела, связывающуюся с белком CD137, и переменную область легкой цепи антитела, связывающуюся с белком CD137; и вторая полипептидная цепь включает переменную область легкой цепи антитела, связывающуюся с белком PD-L1.

[0034] В некоторых вариантах осуществления в первой полипептидной цепи переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, находится на N-конце переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, и переменная область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, находится на N-конце переменной области легкой цепи антитела,

связывающегося с белком CD137; альтернативно, переменная область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, находится на N-конце переменной области легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, и переменная область легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, находится на N-конце переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137.

[0035] В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, и переменная область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, в первой полипептидной цепи составляют scFv.

[0036] В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь дополнительно включает константную область IgG человека, и константная область IgG человека находится на C-конце переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, и находится на N-конце переменной области легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137; альтернативно, константная область IgG человека находится на C-конце переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, и находится на N-конце переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137.

[0037] В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления вторая полипептидная цепь включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 34.

[0038] В другом аспекте настоящая заявка относится к одной или более молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант или биспецифическое антитело.

[0039] В другом аспекте настоящая заявка относится к вектору, включающему молекулу нуклеиновой кислоты.

[0040] В другом аспекте настоящая заявка относится к клетке, включающей молекулу нуклеиновой кислоты или вектор.

[0041] В другом аспекте настоящая заявка относится к способу получения антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта, или биспецифического антитела, включающему культивирование клеток в условиях, делающих возможной экспрессию антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта или биспецифического антитела.

[0042] В другом аспекте настоящая заявка относится к фармацевтической композиции, включающей антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, или биспецифическое антитело, молекулу нуклеиновой кислоты, вектор и/или клетку и, необязательно, фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

[0043] В другом аспекте настоящая заявка относится к применению антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта или биспецифического антитела,

молекулы нуклеиновой кислоты, вектора, клетки и/или фармацевтической композиции в производстве лекарственного средства для облегчения или лечения опухолей.

[0044] В другом аспекте настоящая заявка относится к способу ингибирования связывания белка PD-L1 с белком PD-1, включающему введение антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта, или биспецифического антитела, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора, клетки и/или фармацевтической композиции.

[0045] В настоящей заявке положение CDR в антителе определяют способом Kabat.

[0046] Специалистам в этой области будут понятны другие аспекты и преимущества настоящего изобретения из подробного описания ниже. В следующем подробном описании представлены исключительно примеры вариантов осуществления настоящего изобретения. Например, специалистам в этой области будет понятно, что содержание настоящего описания позволит специалистам в этой области делать изменения в описанных вариантах осуществления без отклонения от сущности и объема изобретения, к которому относится настоящая заявка. Соответственно, сопутствующие чертежи и описание в настоящей заявке являются исключительно примерами, а не ограничением.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0047] Конкретные признаки изобретения, описываемые в настоящей заявке, приведены в формуле изобретения. Признаки и преимущества изобретения, описанные в настоящей заявке, будут более понятными с учетом подробно описанных примеров вариантов осуществления и сопутствующих чертежей, представленных далее в настоящем описании. Краткое описание сопутствующих чертежей является следующим:

[0048] На фиг. 1 показано выравнивание аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи антитела против PD-L1 по настоящему изобретению и соответствующих последовательностей зародышевой линии. Подчеркнуты CDR, определяемые способом Kabat.

[0049] На фиг. 2 показаны результаты, касающиеся ингибирования антителом против PD-L1 по настоящему изобретению связывания PD-L1 человека с PD-1 человека.

[0050] На фиг. 3 показаны результаты, касающиеся ингибирования антителом против PD-L1 по настоящему изобретению связывания PD-L1 *Macaca fascicularis* с PD-1 *Macaca fascicularis*.

[0051] На фиг. 4 показаны результаты, касающиеся ингибирования антителом против PD-L1 по настоящему изобретению связывания PD-L1 мыши с PD-1 мыши.

[0052] На фиг. 5 показан эффект различных антител по настоящему изобретению в отношении роста опухоли MC38 у мыши C57BL/6 (*, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$; непарный t-критерий).

[0053] На фиг. 6 показано выравнивание аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи антитела против CD137 по настоящему изобретению и соответствующих последовательностей зародышевой линии, где подчеркнуты CDR, определенные способом Kabat.

[0054] На фиг. 7 показан эффект антитела против CD137 по настоящему изобретению в отношении роста опухоли MC38 у самки мыши C57BL/6 с нокином гена CD137 человека (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; непарный t-критерий).

[0055] На фиг. 8 показано выравнивание аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи антитела против PD-L1 по настоящему изобретению и соответствующих последовательностей зародышевой линии, где подчеркнуты CDR, определенные способом Kabat, и закрашены CDR, определенные способом IMGT. Аминокислотные остатки в различных областях CDR YN-003 (включающих некоторые аминокислотные остатки в областях CDR и несколько аминокислотных остатков в областях FR, смежные с областями CDR), на которые воздействуют случайным образом при осуществлении созревания аффинности, указаны курсивом.

[0056] На фиг. 9 показано выравнивание аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи антитела против PD-L1 по настоящему изобретению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Подчеркнуты CDR, определенные способом Kabat, и закрашены CDR, определенные способом IMGT.

[0057] На фиг. 10 показано выравнивание аминокислотных последовательностей переменных областей легкой цепи антитела против PD-L1 по настоящему изобретению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Подчеркнуты CDR, определенные способом Kabat, и закрашены CDR, определенные способом IMGT.

[0058] На фиг. 11 показано связывание антитела против PD-L1 по настоящему изобретению с клетками CHO, стабильно экспрессирующими PD-L1 человека.

[0059] На фиг. 12 показано, что антитело против PD-L1 по настоящему изобретению ингибирует связывание PD-1 человека с PD-L1 человека.

[0060] На фиг. 13 показано, что антитело против PD-L1 по настоящему изобретению связывается с клетками CHO, стабильно экспрессирующими PD-L1 мыши.

[0061] На фиг. 14 показано, что антитело против PD-L1 по настоящему изобретению ингибирует связывание PD-1 мыши с PD-L1 мыши.

[0062] На фиг. 15 показано, что антитело против PD-L1 по настоящему изобретению связывается с клетками MDA-MB-231.

[0063] На фиг. 16 показано, что антитело против PD-L1 и биспецифическое антитело против PD-L1/CD137 по настоящему изобретению связываются с клетками CHO, стабильно экспрессирующими PD-L1 человека.

[0064] На фиг. 17 показано, что антитело против PD-L1 и биспецифическое антитело против PD-L1/CD137 по настоящему изобретению ингибирует связывание PD-1 человека с PD-L1 человека.

[0065] На фиг. 18 показано, что антитело против PD-L1 и биспецифическое антитело против PD-L1/CD137 по настоящему изобретению связываются с клетками CHO, стабильно экспрессирующими PD-L1 мыши.

[0066] На фиг. 19 показано, что антитело против PD-L1 и биспецифическое

антитело против PD-L1/CD137 по настоящему изобретению ингибируют связывание PD-1 мыши с PD-L1 мыши.

[0067] На фиг. 20 показано, что антитело CD137 и биспецифическое антитело против PD-L1/CD137 по настоящему изобретению связываются с клетками 293Т, стабильно экспрессирующими CD137 человека.

[0068] На фиг. 21 показано, что молекулярную массу антитела по настоящему изобретению анализируют посредством электрофореза в ПААГ с SDS. а, невосстановительные условия; и b, восстановительные условия.

[0069] На фиг. 22 показаны результаты, касающиеся стимуляции различными антителами по настоящему изобретению люциферазной активности клеток 293Т, экспрессирующих CD137 человека и имеющих стабильно интегрированный репортерный ген люциферазы.

[0070] На фиг. 23 показан эффект антител по настоящему изобретению в отношении роста опухолей MC38 у самок мышей C57BL/6 с геном CD137 человека (*, $P < 0,05$; непарный t-критерий).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0071] Далее в настоящем описании варианты осуществления изобретения, представленные в настоящей заявке, проиллюстрированы с помощью конкретных примеров. Специалистам в этой области будут понятны другие преимущества и эффекты изобретения, представленного в настоящей заявке, из следующего описания.

[0072] В настоящей заявке термин "антитело", в целом, относится к полипептидной молекуле, способной специфически распознавать и/или нейтрализовать специфический антиген. Например, антитело может включать иммуноглобулин, состоящий из по меньшей мере двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных дисульфидной связью, и включает любую молекулу, включающую его антигенсвязывающую часть. Термин "антитело" включает моноклональные антитела, фрагмент антитела или производное антитела, включая, в качестве неограничивающих примеров, антитела человека, гуманизированные антитела, химерные антитела, одноцепочечные антитела (например, scFv) и антигенсвязывающие фрагменты антител (например, Fab-, Fab'- и (Fab)₂-фрагменты). Термин "антитело" дополнительно включает все рекомбинантные антитела, такие как антитела, экспрессирующиеся в прокариотических клетках, негликозилированные антитела и любой антигенсвязывающий фрагмент антитела, как представлено в настоящем описании, и их производные. Каждая тяжелая цепь может состоять из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь может состоять из вариабельных областей легкой цепи (VL) и константных областей легкой цепи. Области VH и VL можно дополнительно разделять на высоковариабельные области, названные определяющими комплементарность областями (CDR), распределенными по более консервативным областям, названным каркасными областями (FR). Каждая VH и VL может состоять из трех CDR и четырех FR, которые могут располагаться от амино-концу к карбокси-концу в порядке FR1, CDR1, FR2, CDR2,

FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области в тяжелых цепях и легких цепях включают связывающие домены, взаимодействующие с антигеном. Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканью или фактором организма-хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент классической системы комплемента (C1q).

[0073] В настоящей заявке термин "белок PD-L1", в целом, относится к лиганду белка программируемой гибели-1 (PD-1). PD-1 является рецептором суперсемейства Ig, взаимодействующим со специфическим лигандом (PD-L) и отрицательно регулирующим передачу сигнала Т-клеточного антигенного рецептора, и считают, что он играет роль в поддержании аутоотолерантности. В отсутствие коstimуляторного сигнала Т-клеткам трудно распознавать стимуляцию антигеном, они не могут эффективно продуцировать иммунный ответ, и это дополнительно может вызывать истощение или толерантность к гетерологичному антигену. PD-L1 может экспрессироваться в гемопоэтических клетках или различных негемопоэтических клетках. В7.1 (CD80) также является рецептором PD-L1, экспрессирующимся в активированных В-клетках, Т-клетках, макрофагах и дендритных клетках. Как лиганд PD-1 и В7.1, PD-L1 дополнительно селективно экспрессируется в различных опухолевых клетках. Ингибирование передачи сигнала PD-L1 включает блокирование взаимодействий PD-L1 с PD-1 и В7.1 или и тем, и другим, и, таким образом, предотвращение отправки PD-L1 отрицательного коstimуляторного сигнала в Т-клетки и другие антигенпрезентирующие клетки. Это может усиливать иммунный ответ на инфекцию (например, острую и хроническую) и противоопухолевый иммунитет.

[0074] В настоящей заявке термин "белок CD137", также известный как 4-1BB или TNFRS9, как правило, относится к трансмембранному белку суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRS), являющемуся индуцируемой активацией коstimуляторной молекулой и важным регулятором иммунных ответов. исследования показали, что CD137-активирующие моноклональные антитела повышают экспрессию коstimуляторных молекул во многих моделях, и значительно усиливают ответ цитолитических Т-лимфоцитов и имеют противоопухолевые эффекты. Противоопухолевый эффект CD137-направленной терапии можно продемонстрировать в исследовании противоопухолевой эффективности на мышах с использованием активирующего моноклонального антитела против CD137 мыши. CD137 стал мощным активатором иммунных клеток и важным антигеном-кандидатом для лечения различных заболеваний (см. Vinay, Dass S., and Byoung S. Kwon. "4-1BB (CD137), an inducible costimulatory Receptor, as a specific target for cancer therapy." *BMB reports* 47,3 (2014): 122.).

[0075] В настоящей заявке термин "NFκB" относится к ядерному фактору каппа-легкая цепь-энхансеру активированных В-клеток (NFκB). Он является белковым комплексом, контролирующим транскрипцию ДНК. NFκB существует почти во всех типах клеток животных и участвует в клеточных ответах на многие стимулы, включая стресс, цитокины, свободные радикалы, УФ-излучение, окисление LDL и микробные или

вирусные антигены. При иммунном ответе на инфекцию NFκB играет важную регуляторную роль (κ-легкая цепь является важной частью иммуноглобулина). Аномальная регуляция NFκB ассоциирована со злокачественными новообразованиями, воспалением и аутоиммунными заболеваниями, септическим шоком, вирусными инфекциями и аномальным развитием иммунной системы. NFκB также тесно ассоциирован с синаптической пластичностью и процессами памяти. Основными клетками-мишенями NFκB являются хемокины, иммунные рецепторы, молекулы адгезии, гены ответа на стресс, регуляторы апоптоза, факторы транскрипции, факторы роста, ферменты и регуляторы клеточного цикла. Кроме того, NFκB оказывает влияние на транскрипцию нескольких вирусных промоторов/энхансеров (например, ВИЧ-1 и CMV) (см. Tergaonkar, Vinay. "NFκB pathway: A good signaling paradigm and therapeutic target." *The international journal of biochemistry & cell biology* 38,10 (2006): 1647-1653.).

[0076] В настоящей заявке термин " K_D " можно использовать взаимозаменяемо с термином " KD ", и, в целом, он относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген в единицах М (моль/л). KD можно вычислять из концентраций вещества АВ и веществ А и В, полученных посредством диссоциации АВ: $KD=c(A)*c(B)/c(AB)$. Из этой формулы можно видеть, что чем больше значение KD , тем выше диссоциация и слабее аффинность между веществами А и В; и наоборот, чем меньше значение KD , тем меньше диссоциация, и тем выше аффинность между веществами А и В.

[0077] В настоящей заявке термин "моноклональное антитело", в целом, относится к группе антител, являющихся, по существу, гомологичными, т.е. каждое антитело, включенное в группу, является одинаковыми, за исключением возможных природных мутаций в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими и направлены против одного участка антигена. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, включающих разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело, направленное против одной детерминанты на антигене, не интерпретируют как требующее какого-либо конкретного способа получения антител. Например, моноклональные антитела можно получать с помощью гибридомной технологии или продуцировать в бактериях, эукариотических животных или растительных клетках способами рекомбинантной ДНК. Альтернативно, моноклональные антитела также можно получать из фаговой библиотеки антител с использованием технологии, как описано, например, в Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) и Marks et al., *Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991).

[0078] В настоящей заявке термин "одноцепочечное антитело (scFv)", как правило, относится к молекуле, образованной посредством связывания варибельной области тяжелой цепи антитела с варибельной областью легкой цепи с помощью короткого пептидного линкера (линкера).

[0079] В настоящей заявке термин "химерное антитело", в целом, относится к

антителу, в котором часть аминокислотной последовательности каждой тяжелой или легкой цепи является гомологичной соответствующей аминокислотной последовательности в антителе конкретного биологического вида или принадлежит к конкретному классу, а остальная часть цепи является гомологичной соответствующей последовательности другого биологического вида. Например, переменные области легкой цепи и тяжелой цепи получают из переменной области антитела одного вида животных (например, мыши, крысы и т.д.), в то время как константная часть является гомологичной последовательности антитела другого биологического вида (например, человека). Например, в случае получения химерных антител, не принадлежащие человеку В-клетки или гибридные клетки можно использовать для получения переменных областей, и константные области, комбинируемые с ними, получают из людей. Переменная область обладает преимуществом легкого получения, и на ее специфичность не влияет источник константной области, комбинируемой с ней. В то же время, т.к. константную область химерного антитела можно получать из людей, возможность индуцирования химерным антителом иммунного ответа при инъекции является более низкой, чем в случае антитела, константную область которого получают из не принадлежащего человеку источника.

[0080] В настоящей заявке термин "гуманизованное антитело", в целом, относится к сконструированному антителу, полученному посредством снижения иммуногенности антител, иммуноглобулиновым связывающим белкам и полипептидам, полученным из не являющихся человеком видов (например, мышей или крыс), для людей при одновременном сохранении антигенсвязывающих свойств исходного антитела. Например, можно использовать технические средства, включающие пересадку CDR (Jones et al., Nature 321:522 (1986)) и ее вариант, включающий "реконструирование" (Verhoeven, et al., 1988 Science 239:1534-1536; Riechmann, et al., 1988 Nature 332:323-337; Tempest, et al., Bio/Technol 1991 9:266-271), "гиперхимеризацию" (Queen, et al., 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86:10029-10033; Co, et al., 1991 Proc Natl Acad Sci USA 88:2869-2873; Co, et al., 1992 J Immunol 148:1149-1154) и "венирование" (Mark, et al., "Derivation of therapeutically active humanized and veneered anti-CD18 antibodies." в: Metcalf BW, Dalton BJ, eds. Cellular adhesion: molecular definition to therapeutic potential. New York: Plenum Press, 1994: 291-312) или т.п., для гуманизации не принадлежащего человеку связывающего домена. Если другие области, такие как шарнирная область и домены константной области, также получают из не принадлежащих человеку источников, эти области также могут являться гуманизованными.

[0081] В настоящей заявке термин "полностью человеческое антитело", в целом, означает, что все части антитела (включая константные области, области СН и СL антитела) кодируются генами, полученными из человека. Полностью человеческое антитело может значительно снижать иммунные побочные эффекты, вызванные гетерогенными антителами, в отношении организма человека.

[0082] В настоящей заявке термин "биспецифическое антитело (BsAb)", в целом,

относится к антителу или конструкции антитела с двойной специфичностью в его связывающем плече. Природные антитела являются моноспецифическими и обладают одной и той же специфичностью в своих антигенсвязывающих плечах. Биспецифические антитела получают из двух разных источников и конструируют посредством технологии рекомбинантной ДНК или слияния клеток таким образом, что они сохраняют две специфичности исходного антитела. Биспецифические антитела несут два разных антигенсвязывающих участка. Fc-часть биспецифического антитела отличается от Fc-части любого родительского моноспецифического антитела. Т.к. биспецифические антитела имеют двойную специфичность к лекарственным средствам и опухолевым клеткам, теоретически они могут приводить к тому, что накопление лекарственного средства в опухолях будет более высоким, чем в неопухолевых частях организма. Большинство из новых биспецифических антител могут перенаправлять цитотоксические эффекторные клетки (например, Тс-клетки, НК-клетки, нейтрофилы) к целевым клеткам (например, опухолевым клеткам). Биспецифические антитела могут одновременно блокировать два разных медиатора/пути, играющих уникальную или перекрывающуюся роль в патогенезе, и также могут повышать специфичность связывания посредством взаимодействия с двумя, вместо одного, разными антигенами поверхности клетки (Fanger, Michael W., и Paul M. Guyre. "Bispecific antibodies for targeted cellular cytotoxicity." *Trends in biotechnology*, 1991: 375-380), (Fan, Gaowei, et al. "Bispecific antibodies and their applications." *Journal of hematology & oncology*, 2015: 130).

[0083] В настоящей заявке термин "гомология последовательности", в целом, означает, что аминокислотные последовательности гомологичных белков имеют значительное сходство.

[0084] В настоящей заявке термин "эпитоп", как правило, относится к антигенной детерминанте, т.е. части молекулы, распознаваемой иммунной системой (например, распознаваемой антителом). Например, эпитопы являются дискретными трехмерными участками на антигене, распознаваемыми иммунной системой. Эпитоп, как правило, состоит из химически активных поверхностных групп молекул (например, аминокислот или боковых цепей сахаров) и имеет специфические трехмерные структурные характеристики и специфические характеристики заряда. Эпитопы можно разделять на конформационные эпитопы и неконформационные эпитопы (линейные эпитопы) в зависимости от их структуры. Различие между конформационными эпитопами и неконформационными эпитопами состоит в том, что первые из них будут утрачивать свое связывание в присутствии денатурирующих растворителей, а последние из них - не будут. Эпитопы, находящиеся только на поверхности антигенных веществ и легко связывающиеся с антигенраспознающими рецепторами или антителами, можно назвать функциональными эпитопами; и эпитопы, находящиеся внутри молекулы и не являющиеся иммуногенными, можно называть маскированными эпитопами. Эпитопы могут состоять из непрерывных остатков или могут быть образованы прерывающимися остатками, близкими друг к другу в результате фолдинга антигенного полимера. Эпитопы,

образованные последовательными аминокислотами в белках, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, но эпитопы, образованные прерывающимися аминокислотами, как правило, утрачиваются после такого воздействия.

[0085] В настоящей заявке термин "антигенсвязывающий фрагмент", в целом, относится к части интактного антитела, например, антигенсвязывающей области и/или вариабельной области интактного антитела. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент может включать Fab-, Fab'-, F(ab)₂-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут включать двухцепочечные антитела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и полиспецифические антитела, образованные фрагментами антител. Два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, полученные посредством расщепления антитела, имеющего интактную структуру, папином (например, посредством удаления Fc-области и шарнирной области), называют "Fab"-фрагментами. Fab-фрагмент состоит из интактной легкой цепи, вариабельной области тяжелой цепи (VH) и первого константного домена (CH1) тяжелой цепи. Каждый Fab-фрагмент является моновалентным в отношении связывания антигена, т.е. он содержит один антигенсвязывающий участок. F(ab)₂-фрагменты антител исходно получали как пары Fab-фрагментов, соединенные через цистеин. Один крупный F(ab')₂-фрагмент, полученный посредством расщепления антитела, имеющего интактную структуру, пепсином, приблизительно равен двум Fab-фрагментам, соединенным дисульфидной связью и имеющим разную антигенсвязывающую активность, и все равно способен перекрестно связывать антиген. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов тем, что они имеют несколько дополнительных остатков на карбокси-конце домена CH1, включая один или более цистеинов из шарнирной области антитела. Fv-фрагмент состоит из доменов VL и VH одного плеча антитела.

[0086] В настоящей заявке термин "вариант", в целом, относится к аминокислотной последовательности, имеющей, по существу, ту же функцию (например, способность специфически связываться с PD-L1) и по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 100%) идентичности последовательности. В некоторых вариантах осуществления вариант аминокислотной последовательности является аминокислотной последовательностью, имеющей, по существу, ту же функцию (например, способность специфически связываться с PD-L1), и включает одну или более (например, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10 или более) замен, делеций или добавлений аминокислот.

[0087] В настоящей заявке термин "идентичность", в целом, относится к проценту количества одинаковых аминокислотных остатков среди всех аминокислотных остатков при сравнении последовательности-кандидата с конкретной пептидной или полипептидной последовательностью.

[0088] В настоящей заявке термин "IgG", в целом, относится к иммуноглобулину G. IgG является одним из иммуноглобулинов человека, и другие включают IgA, IgM, IgD и IgE. IgG является основным антительным компонентом сыворотки, на долю которого приходится приблизительно 75% Ig сыворотки. В соответствии с различиями антигенности γ -цепи молекулы IgG, IgG человека имеет четыре подтипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgG играет важную роль в иммунитете. В настоящей заявке термин "IgG1", в целом, относится к подтипу с наиболее высокой долей среди IgG, имеющему более высокую аффинность к Fc-рецепторам.

[0089] В настоящей заявке термин "молекула нуклеиновой кислоты", в целом, относится к выделенной форме нуклеотидов, дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов или их аналогов любой длины, выделенных из их природного окружения или синтезированной искусственно.

[0090] В настоящей заявке термин "вектор", в целом, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к саморепликации в подходящем организме-хозяине, с помощью которой переносят встроенную молекулу нуклеиновой кислоты в клетки-хозяева и/или между клетками-хозяевами. Вектор может включать вектор, в основном, используемый для встраивания ДНК или РНК в клетки, вектор, в основном, используемый для репликации ДНК или РНК, и вектор, в основном, используемый для экспрессии, транскрипции и/или трансляции ДНК или РНК. Вектор также включает вектор, имеющий множество описанных выше функций. Вектор может являться полинуклеотидом, который может транскрибироваться и транслироваться в полипептид при встраивании в подходящую клетку-хозяина. Как правило, при культивировании подходящей клетки-хозяина, содержащей вектор, вектор может приводить к образованию желаемого продукта экспрессии.

[0091] В настоящей заявке термин "клетка-хозяин", в целом, относится к плазмиде или вектору, которые могут включать или включают молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, или отдельной клетке, линии клеток или культуре клеток, которые могут экспрессировать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению. Клетка-хозяин может включать потомство одной клетки-хозяина. Из-за природных, случайных и преднамеренных мутаций клетки-потомки могут не являться точно такими же, как исходные родительские клетки по морфологии или геному, при условии, что они могут экспрессировать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению. Клетку-хозяина можно получать посредством трансфекции клеток *in vitro* с использованием вектора по настоящему изобретению. Клетка-хозяин может являться прокариотической клеткой (например, *E. coli*), а также может являться эукариотической клеткой (например, такой как дрожжевые клетки, клетки COS, клетки яичника китайского хомяка (CHO), клетки HeLa, клетки HEK293, клетки COS-1, клетки NS0 или миеломные клетки). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является клеткой млекопитающего. Например, клетка млекопитающего может являться клеткой CHO-K1. В настоящей заявке термин

"рекомбинантная клетка-хозяин", как правило, относится к клетке, в которую встраивают рекомбинантный экспрессирующий вектор. Рекомбинантная клетка-хозяин не только включает конкретную клетку, но также включает и потомство таких клеток.

[0092] В настоящей заявке термин "злокачественное новообразование", в целом, относится к физиологическому статусу млекопитающего, как правило, отличающемуся нарушениями пролиферации или выживания клеток. Неограничивающие примеры злокачественных новообразований включают злокачественные новообразования, лимфому, опухоль материнских клеток, саркому, лейкоз и злокачественную лимфоидную опухоль. Например, оно может являться лимфомой.

[0093] В настоящей заявке термин "между", в целом, означает, что С-конец некоторого аминокислотного фрагмента прямо или косвенно связан с N-концом первого аминокислотного фрагмента, и его N-конец прямо или косвенно связан с С-концом второго аминокислотного фрагмента. В легкой цепи, например, N-конец L-FR2 прямо или косвенно связан с С-концом LCDR1, и С-конец L-FR2 прямо или косвенно связан с N-концом LCDR2. В качестве другого примера, N-конец L-FR3 прямо или косвенно связан с С-концом LCDR2, и С-конец L-FR3 прямо или косвенно связан с N-концом LCDR3. В тяжелой цепи, например, N-конец H-FR2 прямо или косвенно связан с С-концом HCDR1, и С-конец H-FR2 прямо или косвенно связан с N-концом HCDR2. В качестве другого примера, N-конец H-FR3 прямо или косвенно связан с С-концом HCDR2, и С-конец H-FR3 прямо или косвенно связан с N-концом HCDR3.

[0094] В настоящей заявке термин "приблизительно", в целом, относится к колебаниям в диапазоне указанного значения $\pm 0,5\%$ - $\pm 10\%$, таким как колебания в диапазоне указанного значения $\pm 0,5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 1,5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 2,5\%$, $\pm 3\%$, $\pm 3,5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 4,5\%$, $\pm 5\%$, $\pm 5,5\%$, $\pm 6\%$, $\pm 6,5\%$, $\pm 7\%$, $\pm 7,5\%$, $\pm 8\%$, $\pm 8,5\%$, $\pm 9\%$, $\pm 9,5\%$ или $\pm 10\%$.

[0095] В настоящей заявке термин "включает", в целом, означает "включают", "суммируют", "имеют" или "содержат". В некоторых случаях он также означает "является" или "состоит из".

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент

[0096] В одном из аспектов настоящая заявка относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или варианту, связывающемуся с белком PD-L1 со значением K_D 3×10^{-9} М или менее (например, значение K_D составляет не более приблизительно 3×10^{-9} М, не более приблизительно 2×10^{-9} М, не более приблизительно 1×10^{-9} М, не более приблизительно 9×10^{-10} М, не более приблизительно 8×10^{-10} М, не более приблизительно 7×10^{-10} М, не более приблизительно 6×10^{-10} М, не более приблизительно 5×10^{-10} М, не более приблизительно 4×10^{-10} М, не более приблизительно 3×10^{-10} М, не более приблизительно 2×10^{-10} М, не более 1×10^{-10} М, не более приблизительно 9×10^{-11} М, не более приблизительно 8×10^{-11} М, не более приблизительно 7×10^{-11} М, не более приблизительно 6×10^{-11} М, не более приблизительно 1×10^{-11} М или менее). Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может связываться с белком PD-L1 со значением K_D менее 8×10^{-11} М.

[0097] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению может ингибировать связывание PD-L1 с PD-1.

[0098] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению может приводить к облегчению или лечению опухолеассоциированных заболеваний. Опухоль включает рак толстого кишечника.

[0099] В настоящей заявке антитело может быть выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела, одноцепочечного антитела, химерного антитела, гуманизированного антитела и полностью человеческого антитела.

[00100] В настоящей заявке антигенсвязывающий фрагмент может быть выбран из группы, состоящей из Fab-, Fab'-, F(ab)₂- и Fv-фрагмента.

[00101] В настоящей заявке вариант может являться аминокислотной последовательностью, имеющей, по существу, ту же функцию (например, может специфически связываться с PD-L1), и имеет по меньшей мере 85% или более (например, по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более) идентичности последовательности. В некоторых вариантах осуществления вариант аминокислотной последовательности имеет, по существу, ту же функцию (например, способность специфически связываться с PD-L1) и включает аминокислотную последовательность, полученную посредством добавления, делеции или замены одной или более (например, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10 или более) аминокислот. В качестве другого примера, вариант по настоящему изобретению может быть выбран из следующей группы: белок или полипептид, подвергнутый замене, делеции или добавлению одной или более аминокислот в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; и белок или полипептид, имеющий более 85% (например, по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более) идентичности последовательности по отношению к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту.

[00102] В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может включать легкую цепь антитела или ее фрагмент, включающий LCDR1, и LCDR1 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53: TGTX1SX2VGGYX3X4VS; где X1 является S, R или V; X2 является D, E или S; X3 является N или R; X4 является Y или E, и где LCDR1 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat. Например, легкая цепь антитела или ее фрагмент может включать LCDR1, и LCDR1 включает следующую аминокислотную последовательность или ее вариант: SEQ ID NO: 54-58.

[00103] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела или ее фрагмент может включать LCDR2, включающую аминокислотную последовательность,

приведенную в SEQ ID NO: 59: X1NSX2RPS, где X1 является G или E; X2 является N или I, и где LCDR2 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat. Например, легкая цепь антитела или ее фрагмент может включать LCDR2, включающую следующую аминокислотную последовательность или ее вариант: SEQ ID NO: 60-61.

[00104] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела или ее фрагмент может включать LCDR3, включающую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62: QSYDSSLGSGX1V, где X1 является S или T, и где LCDR3 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat. Например, легкая цепь антитела или ее фрагмент может включать LCDR3, включающую аминокислотную последовательность или ее вариант, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 64.

[00105] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела или ее фрагмент может дополнительно включать каркасные области L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4. Например, С-конец L-FR1 можно прямо или косвенно соединять с N-концом LCDR1, и L-FR1 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71. L-FR2 находится между LCDR1 и LCDR2, и L-FR2 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72. L-FR3 находится между LCDR2 и LCDR3, и L-FR3 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73-75. N-конец L-FR4 прямо или косвенно связан с С-концом LCDR3, и L-FR4 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления каркасные области выбраны из группы, состоящей из консенсусных каркасных последовательностей человека и последовательностей зародышевой линии человека.

[00106] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь или ее фрагмент из антитела по настоящему изобретению включает переменную область легкой цепи VL, и переменная область легкой цепи VL включает аминокислотную последовательность или ее вариант, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 41.

[00107] В антителе или его антигенсвязывающем фрагменте или варианте по настоящему изобретению легкая цепь антитела или ее фрагмент может дополнительно включать константную область человека, и константная область человека включает константную область IgL человека.

[00108] В настоящей заявке легкая цепь антитела или ее фрагмент может включать аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 42.

[00109] В настоящей заявке антитело по настоящему изобретению может включать тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, где тяжелая цепь антитела или ее фрагмент может включать HCDR1, и HCDR1 может включать аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 45: X1Y AIS, где X1 является S или T, и где HCDR1 определяют в соответствии с индексом

нумерации антител Kabat. Например, тяжелая цепь антитела или ее фрагмент может включать HCDR1, и HCDR1 включает аминокислотную последовательность или ее вариант, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47.

[00110] В настоящей заявке тяжелая цепь антитела или ее фрагмент может включать HCDR2, и HCDR2 включает следующую аминокислотную последовательность или ее вариант: SEQ ID NO: 48, и где HCDR2 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat.

[00111] В настоящей заявке тяжелая цепь антитела или ее фрагмент может включать HCDR3, и HCDR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 49: TMX1X2YX3X4GNX5DY, где X1 является D, E или G, X2 является G или E, X3 является S или G, X4 является Y или F, X5 является F или Y, и где HCDR3 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat. Например, тяжелая цепь антитела или ее фрагмент может включать HCDR3, и HCDR3 включает следующую аминокислотную последовательность или ее вариант: SEQ ID NO: 50-52.

[00112] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает каркасные области H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4. Например, С-конец H-FR1 прямо или косвенно связан с N-концом HCDR1, и H-FR1 может включать аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 67. H-FR2 находится между HCDR1 и HCDR2, и H-FR2 может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 68. H-FR3 находится между HCDR2 и HCDR3, и H-FR3 может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69. N-конец H-FR4 прямо или косвенно связан с С-концом HCDR3, и H-FR4 может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70. В некоторых вариантах осуществления каркасные области выбраны из группы, состоящей из консенсусных каркасных последовательностей человека и последовательностей зародышевой линии человека.

[00113] Тяжелая цепь антитела или ее фрагмент по настоящему изобретению может включать переменную область тяжелой цепи VH, и переменная область тяжелой цепи VH может включать аминокислотную последовательность или ее вариант, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 31, и SEQ ID NO: 35. В антителе, его антигенсвязывающем фрагменте или варианте по настоящему изобретению тяжелая цепь антитела или ее фрагмент может дополнительно включать константную область человека. Например, константная область человека может включать константную область IgG человека. Например, константная область IgG человека может включать константную область IgG1 человека.

[00114] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела или ее фрагмент может включать аминокислотную последовательность или ее вариант, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 32 и SEQ

ID NO: 36.

[00115] В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению включает легкую цепь антитела или ее фрагмент, включающую LCDR1, и LCDR1 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53: TGTX1SX2VGGYX3X4VS; где X1 является S, R или V; X2 является D, E или S; X3 является N или R; X4 является Y или E, и где LCDR1 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat. Например, легкая цепь антитела или ее фрагмент может включать LCDR1, и LCDR1 включает аминокислотную последовательность или ее вариант, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54-58. Легкая цепь антитела или ее фрагмент включает LCDR2, включающую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59: X1NSX2RPS, где X1 является G или E; X2 является N или I, и где LCDR2 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat. Например, легкая цепь антитела или ее фрагмент может включать LCDR2, включающую аминокислотную последовательность или ее вариант, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60-61. Легкая цепь антитела или ее фрагмент включает LCDR3, включающую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62: QSYDSSLGXIIV, где X1 является S или T, и где LCDR3 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat. Например, легкая цепь антитела или ее фрагмент может включать LCDR3, включающую аминокислотную последовательность или ее вариант, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 63-64. Кроме того, антитело по настоящему изобретению включает тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, включающую HCDR1, и HCDR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 45: X1YAIIS, где X1 является S или T, и где HCDR1 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat. Например, тяжелая цепь антитела или ее фрагмент может включать HCDR1, и HCDR1 включает аминокислотную последовательность или ее вариант, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47. Например, тяжелая цепь антитела или ее фрагмент может включать HCDR2, и HCDR2 включает следующую аминокислотную последовательность или ее вариант: SEQ ID NO: 48, и где HCDR2 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat. В качестве другого примера, тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает HCDR3, и HCDR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 49: TMX1X2YX3X4GNX5DY, где X1 является D, E или G, X2 является G или E, X3 является S или G, X4 является Y или F, X5 является F или Y, и где HCDR3 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat. тяжелая цепь антитела или ее фрагмент может включать HCDR3, и HCDR3 включает следующую аминокислотную последовательность или ее вариант: SEQ ID NO: 50-52.

[00116] Аминокислотная последовательность LCDR1 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать SEQ ID NO: 54 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2

может включать SEQ ID NO: 60 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 63 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 46; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 48 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 50 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-002 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых случаях, аминокислотная последовательность L-FR1 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта может включать SEQ ID NO: 71 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR2 может включать SEQ ID NO: 72 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR3 может включать SEQ ID NO: 73 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR4 может включать SEQ ID NO: 76 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HFR1 может включать SEQ ID NO: 65 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR2 может включать SEQ ID NO: 68 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR3 может включать SEQ ID NO: 69 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR4 может включать SEQ ID NO: 70 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело, имеющее те же LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 и H-FR1-4, что и антитело YN-002. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать переменную область легкой цепи, аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи может включать SEQ ID NO: 4 или ее вариант; и где тяжелая цепь может включать переменную область тяжелой цепи, и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 2 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-002 или антитело, имеющее ту же переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи приведена в SEQ ID NO: 8, и аминокислотная последовательность тяжелой цепи приведена в SEQ ID NO: 6. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-002 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00117] В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению конкурирует с референсным антителом за связывание с белком PD-L1 (например, белком PD-L1 человека). Референсное антитело может включать LCDR1-3 и HCDR1-3, и аминокислотная последовательность LCDR1 может включать SEQ ID NO: 54 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 60 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 63 или

ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 46 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 48 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 50 или ее вариант. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать антитело YN-002 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело включает L-FR1-4 и H-FR1-4, и аминокислотная последовательность L-FR1 может включать SEQ ID NO: 71 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR2 может включать SEQ ID NO: 72 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR3 может включать SEQ ID NO: 73 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR4 может включать SEQ ID NO: 76 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR1 может включать SEQ ID NO: 65 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR2 может включать SEQ ID NO: 68 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR3 может включать SEQ ID NO: 69 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR4 может включать SEQ ID NO: 70 или ее вариант. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать антитело YN-002 или антитело с теми же LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 и H-FR1-4. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи может включать SEQ ID NO: 4 или ее вариант; и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 2 или ее вариант. Например, референсное антитело может включать антитело YN-002 или антитело, имеющее ту же переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 8, и аминокислотная последовательность тяжелой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 6. Например, референсное антитело может включать антитело YN-002 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00118] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность LCDR1 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать SEQ ID NO: 54 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 60 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 63 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 46 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 48 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 50 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-003 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых случаях аминокислотная последовательность L-FR1 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта может включать SEQ ID NO: 71 или ее

вариант; аминокислотная последовательность L-FR2 может включать SEQ ID NO: 72 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR3 может включать SEQ ID NO: 74 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR4 может включать SEQ ID NO: 76 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR1 может включать SEQ ID NO: 66 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR2 может включать SEQ ID NO: 68 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR3 может включать SEQ ID NO: 69 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR4 может включать SEQ ID NO: 70 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-003 или антитело с теми же LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 и H-FR1-4. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать переменную область легкой цепи, аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи может включать SEQ ID NO: 11 или ее вариант; и где тяжелая цепь может включать переменную область тяжелой цепи, и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 9 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-003 или антитело, имеющее ту же переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи приведена в SEQ ID NO: 15 и аминокислотная последовательность тяжелой цепи приведена в SEQ ID NO: 13. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-003 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00119] В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению конкурирует с референсным антителом за связывание с белком PD-L1 (например, белком PD-L1 человека). Референсное антитело может включать LCDR1-3 и HCDR1-3, и аминокислотная последовательность LCDR1 может включать SEQ ID NO: 54 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 60 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 63 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 46 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 48 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 50 или ее вариант. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать антитело YN-003 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело включает L-FR1-4 и H-FR1-4, и аминокислотная последовательность L-FR1 может включать SEQ ID NO: 71 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR2 может включать SEQ ID NO: 72 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR3 может включать SEQ ID NO: 74

или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR4 может включать SEQ ID NO: 76 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR1 может включать SEQ ID NO: 66 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR2 может включать SEQ ID NO: 68 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR3 может включать SEQ ID NO: 69 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR4 может включать SEQ ID NO: 70 или ее вариант. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать антитело YN-003 или антитело с теми же LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 и H-FR1-4. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи может включать SEQ ID NO: 11 или ее вариант; и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 9 или ее вариант. Например, референсное антитело может включать антитело YN-003 или антитело, имеющее ту же переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 15, и аминокислотная последовательность тяжелой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 13. Например, референсное антитело может включать антитело YN-003 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00120] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность LCDR1 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать SEQ ID NO: 55 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 60 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 64 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 47 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 48 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 51 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-035 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых случаях, аминокислотная последовательность L-FR1 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта может включать SEQ ID NO: 71 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR2 может включать SEQ ID NO: 72 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR3 может включать SEQ ID NO: 74 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR4 может включать SEQ ID NO: 76 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR1 может включать SEQ ID NO: 67 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR2 может включать SEQ ID NO: 68 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR3 может включать SEQ ID NO: 69 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR4 может включать SEQ ID NO: 70 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-035 или антитело с теми же LCDR1-

3, HCDR1-3, L-FR1-4 и H-FR1-4. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать переменную область легкой цепи, аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи может включать SEQ ID NO: 33 или ее вариант; и где тяжелая цепь может включать переменную область тяжелой цепи, и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 31 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-035 или антитело, имеющее ту же переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи приведена в SEQ ID NO: 34, и аминокислотная последовательность тяжелой цепи приведена в SEQ ID NO: 32. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-035 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00121] В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению конкурирует с референсным антителом за связывание с белком PD-L1 (например, белком PD-L1 человека). Референсное антитело может включать LCDR1-3 и HCDR1-3, и аминокислотная последовательность LCDR1 может включать SEQ ID NO: 55 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 60 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 64 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 47 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 48 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 51 или ее вариант. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать антитело YN-035 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело включает L-FR1-4 и H-FR1-4, и аминокислотная последовательность L-FR1 может включать SEQ ID NO: 71 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR2 может включать SEQ ID NO: 72 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR3 может включать SEQ ID NO: 74 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR4 может включать SEQ ID NO: 76 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR1 может включать SEQ ID NO: 67 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR2 может включать SEQ ID NO: 68 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR3 может включать SEQ ID NO: 69 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR4 может включать SEQ ID NO: 70 или ее вариант. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать антитело YN-035 или антитело с теми же LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 и H-FR1-4. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать переменную область легкой цепи и

вариабельную область тяжелой цепи, аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи может включать SEQ ID NO: 33 или ее вариант; и аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 31 или ее вариант. Например, референсное антитело может включать антитело YN-035 или антитело, имеющее ту же вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 34, и аминокислотная последовательность тяжелой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 32. Например, референсное антитело может включать антитело YN-035 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00122] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность LCDR1 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать SEQ ID NO: 55 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 60 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 64 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 47 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 48 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 52 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-036 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых случаях аминокислотная последовательность L-FR1 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта может включать SEQ ID NO: 71 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR2 может включать SEQ ID NO: 72 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR3 может включать SEQ ID NO: 74 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR4 может включать SEQ ID NO: 76 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR1 может включать SEQ ID NO: 67 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR2 может включать SEQ ID NO: 68 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR3 может включать SEQ ID NO: 69 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR4 может включать SEQ ID NO: 70 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-036 или антитело с теми же LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 и H-FR1-4. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать вариабельную область легкой цепи, аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи может включать SEQ ID NO: 33 или ее вариант; и где тяжелая цепь может включать вариабельную область тяжелой цепи, и аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 35 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-036 или антитело, имеющее ту же вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах

осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи приведена в SEQ ID NO: 34 и аминокислотная последовательность тяжелой цепи приведена в SEQ ID NO: 36. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-036 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00123] В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению конкурирует с референсным антителом за связывание с белком PD-L1 (например, белком PD-L1 человека). Референсное антитело может включать LCDR1-3 и HCDR1-3, и аминокислотная последовательность LCDR1 может включать SEQ ID NO: 55 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 60 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 64 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 47 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 48 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 52 или ее вариант. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать антитело YN-036 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело включает L-FR1-4 и H-FR1-4, и аминокислотная последовательность L-FR1 может включать SEQ ID NO: 71 или ее вариант; аминокислотная последовательность LFR2 может включать SEQ ID NO: 72 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR3 может включать SEQ ID NO: 74 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR4 может включать SEQ ID NO: 76 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR1 может включать SEQ ID NO: 67 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR2 может включать SEQ ID NO: 68 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR3 может включать SEQ ID NO: 69 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR4 может включать SEQ ID NO: 70 или ее вариант. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать антитело YN-036 или антитело с теми же LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 и H-FR1-4. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи может включать SEQ ID NO: 33 или ее вариант; и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 35 или ее вариант. Например, референсное антитело может включать антитело YN-036 или антитело, имеющее ту же переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 34 и аминокислотная последовательность тяжелой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 36. Например, референсное антитело может

включать антитело YN-036 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00124] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность LCDR1 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать SEQ ID NO: 56 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 61 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 64 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 47 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 48 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 52 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-037 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых случаях, аминокислотная последовательность L-FR1 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта может включать SEQ ID NO: 71 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR2 может включать SEQ ID NO: 72 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR3 может включать SEQ ID NO: 75 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR4 может включать SEQ ID NO: 76 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR1 может включать SEQ ID NO: 67 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR2 может включать SEQ ID NO: 68 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR3 может включать SEQ ID NO: 69 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR4 может включать SEQ ID NO: 70 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-037 или антитело с теми же LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 и H-FR1-4. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать вариабельную область легкой цепи, аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи может включать SEQ ID NO: 37 или ее вариант; и где тяжелая цепь может включать вариабельную область тяжелой цепи, и аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 35 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-037 или антитело, имеющее ту же вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи приведена в SEQ ID NO: 38 и аминокислотная последовательность тяжелой цепи приведена в SEQ ID NO: 36. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-037 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00125] В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению конкурирует с референсным антителом за связывание с белком PD-L1 (например, белком PD-L1 человека).

Референсное антитело может включать LCDR1-3 и HCDR1-3, и аминокислотная последовательность LCDR1 может включать SEQ ID NO: 56 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 61 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 64 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 47 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 48 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 52 или ее вариант. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать антитело YN-037 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело включает L-FR1-4 и H-FR1-4, и аминокислотная последовательность L-FR1 может включать SEQ ID NO: 71 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR2 может включать SEQ ID NO: 72 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR3 может включать SEQ ID NO: 75 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR4 может включать SEQ ID NO: 76 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR1 может включать SEQ ID NO: 67 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR2 может включать SEQ ID NO: 68 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR3 может включать SEQ ID NO: 69 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR4 может включать SEQ ID NO: 70 или ее вариант. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать антитело YN-037 или антитело с теми же LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 и H-FR1-4. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи может включать SEQ ID NO: 37 или ее вариант; и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 35 или ее вариант. Например, референсное антитело может включать антитело YN-037 или антитело, имеющее ту же переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 38 и аминокислотная последовательность тяжелой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 36. Например, референсное антитело может включать антитело YN-037 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00126] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность LCDR1 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать SEQ ID NO: 57 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 61 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 64 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 47 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 48 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR3 может включать

SEQ ID NO: 52 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-038 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых случаях, аминокислотная последовательность L-FR1 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта может включать SEQ ID NO: 71 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR2 может включать SEQ ID NO: 72 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR3 может включать SEQ ID NO: 75 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR4 может включать SEQ ID NO: 76 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR1 может включать SEQ ID NO: 67 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR2 может включать SEQ ID NO: 68 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR3 может включать SEQ ID NO: 69 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR4 может включать SEQ ID NO: 70 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-038 или антитело с теми же LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 и H-FR1-4. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать переменную область легкой цепи, аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи может включать SEQ ID NO: 39 или ее вариант; и где тяжелая цепь может включать переменную область тяжелой цепи, и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 35 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-038 или антитело, имеющее ту же переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи приведена в SEQ ID NO: 40 и аминокислотная последовательность тяжелой цепи приведена в SEQ ID NO: 36. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-038 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00127] В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению конкурирует с референсным антителом за связывание с белком PD-L1 (например, белком PD-L1 человека). Референсное антитело может включать LCDR1-3 и HCDR1-3, и аминокислотная последовательность LCDR1 может включать SEQ ID NO: 57 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 61 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 64 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 47 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 48 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 52 или ее вариант. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать антитело YN-038 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3.

В некоторых вариантах осуществления референсное антитело включает L-FR1-4 и H-FR1-4, и аминокислотная последовательность L-FR1 может включать SEQ ID NO: 71 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR2 может включать SEQ ID NO: 72 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR3 может включать SEQ ID NO: 75 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR4 может включать SEQ ID NO: 76 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR1 может включать SEQ ID NO: 67 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR2 может включать SEQ ID NO: 68 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR3 может включать SEQ ID NO: 69 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR4 может включать SEQ ID NO: 70 или ее вариант. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать антитело YN-038 или антитело с теми же LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 и H-FR1-4. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи может включать SEQ ID NO: 39 или ее вариант; и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 35 или ее вариант. Например, референсное антитело может включать антитело YN-038 или антитело, имеющее ту же переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 40 и аминокислотная последовательность тяжелой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 36. Например, референсное антитело может включать антитело YN-038 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00128] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность LCDR1 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать SEQ ID NO: 58 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 61 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 64 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 47 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 48 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 52 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-039 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых случаях, аминокислотная последовательность L-FR1 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта может включать SEQ ID NO: 71 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR2 может включать SEQ ID NO: 72 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR3 может включать SEQ ID NO: 75 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR4 может включать SEQ ID NO: 76 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR1 может включать SEQ ID NO: 67 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR2 может включать SEQ

ID NO: 68 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR3 может включать SEQ ID NO: 69 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR4 может включать SEQ ID NO: 70 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-039 или антитело с теми же LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 и H-FR1-4. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать переменную область легкой цепи, аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи может включать SEQ ID NO: 41 или ее вариант; и где тяжелая цепь может включать переменную область тяжелой цепи, и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 35 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-039 или антитело, имеющее ту же переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи приведена в SEQ ID NO: 42 и аминокислотная последовательность тяжелой цепи приведена в SEQ ID NO: 36. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-039 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00129] В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению конкурирует с референсным антителом за связывание с белком PD-L1 (например, белком PD-L1 человека). Референсное антитело может включать LCDR1-3 и HCDR1-3, и аминокислотная последовательность LCDR1 может включать SEQ ID NO: 58 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 61 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 64 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 47 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 48 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 52 или ее вариант. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать антитело YN-039 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело включает L-FR1-4 и H-FR1-4, и аминокислотная последовательность L-FR1 может включать SEQ ID NO: 71 или ее вариант; аминокислотная последовательность LFR2 может включать SEQ ID NO: 72 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR3 может включать SEQ ID NO: 75 или ее вариант; аминокислотная последовательность L-FR4 может включать SEQ ID NO: 76 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR1 может включать SEQ ID NO: 67 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR2 может включать SEQ ID NO: 68 или ее вариант; аминокислотная последовательность H-FR3 может включать SEQ ID NO: 69 или ее вариант; и аминокислотная последовательность H-FR4 может

включать SEQ ID NO: 70 или ее вариант. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать антитело YN-039 или антитело с теми же LCDR1-3, HCDR1-3, L-FR1-4 и H-FR1-4. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи может включать SEQ ID NO: 41 или ее вариант; и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 35 или ее вариант. Например, референсное антитело может включать антитело YN-039 или антитело, имеющее ту же переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 42 и аминокислотная последовательность тяжелой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 36. Например, референсное антитело может включать антитело YN-039 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00130] В настоящей заявке белок PD-L1 выбран из группы, состоящей из белка PD-L1 человека, белка PD-L1 обезьяны и белка PD-L1 мыши.

[00131] В другом аспекте настоящая заявка также относится к антителу, его антигенсвязывающему фрагменту или варианту, связывающемуся с белком CD137 с K_D ниже 5×10^{-9} М (например, K_D не более приблизительно 5×10^{-9} М, не более приблизительно 4×10^{-9} М, не более приблизительно 3×10^{-9} М, не более приблизительно 2×10^{-9} М, не более приблизительно 1×10^{-9} М или не более приблизительно 1×10^{-10} М или менее). Например, оно связывается с белком CD137 с K_D ниже 3×10^{-9} М.

[00132] Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению может приводить к облегчению или лечению опухолей. Например, опухоль может включать рак толстого кишечника.

[00133] В настоящей заявке антитело может быть выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела, одноцепочечного антитела, химерного антитела, гуманизированного антитела и полностью человеческого антитела.

[00134] В настоящей заявке антигенсвязывающий фрагмент может быть выбран из группы, состоящей из Fab-, Fab'-, F(ab)₂- и Fv-фрагмента.

[00135] В настоящей заявке вариант может являться аминокислотной последовательностью, имеющей, по существу, ту же функцию (например, способность специфически связываться с CD137), и иметь по меньшей мере 85% или более (например, по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более) идентичности последовательности. В некоторых вариантах осуществления вариант аминокислотной последовательности является аминокислотной последовательностью, имеющей, по существу, ту же функцию (например, способность специфически связываться с CD137), и, по существу, дополнительно включает

добавление, делецию или замену одной или более (например, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10 или более) аминокислот.

[00136] В некоторых вариантах осуществления антитело может включать легкую цепь антитела или ее фрагмент. Например, легкая цепь антитела или ее фрагмент может включать LCDR1, и LCDR1 может включать следующую аминокислотную последовательность или ее вариант: SEQ ID NO: 80. Например, легкая цепь антитела или ее фрагмент может включать LCDR2, включающую следующую аминокислотную последовательность или ее вариант: SEQ ID NO: 81. В качестве другого примера, легкая цепь антитела или ее фрагмент включает LCDR3 или ее вариант, и LCDR3 может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 82.

[00137] В некоторых вариантах осуществления, что касается антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта, легкая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает каркасные области L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4. Например, С-конец L-FR1 прямо или косвенно связан с N-концом LCDR1, и L-FR1 может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89. L-FR2 находится между LCDR1 и LCDR2, и L-FR2 может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90. L-FR3 находится между LCDR2 и LCDR3, и L-FR3 может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 91. N-конец L-FR4 прямо или косвенно связан с С-концом LCDR3, и L-FR4 может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 92.

[00138] В некоторых вариантах осуществления, что касается антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта, легкая цепь антитела или ее фрагмент включает вариабельную область легкой цепи VL, и вариабельная область легкой цепи VL может включать следующую аминокислотную последовательность или ее вариант: SEQ ID NO: 20.

[00139] В настоящей заявке легкая цепь антитела или ее фрагмент может дополнительно включать константную область человека, и константная область человека включает константную область Ig λ человека.

[00140] В настоящей заявке легкая цепь или ее фрагмент из антитела может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23.

[00141] В некоторых вариантах осуществления антитело может включать тяжелую цепь антитела или ее фрагмент. Тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает HCDR1, и HCDR1 может включать следующую аминокислотную последовательность или ее вариант: SEQ ID NO: 77. Тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает HCDR2, и HCDR2 может включать следующую аминокислотную последовательность или ее вариант: SEQ ID NO: 78. Тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает HCDR3, и HCDR3 может включать следующую аминокислотную последовательность или ее вариант: SEQ ID NO: 79.

[00142] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела или ее фрагмент может дополнительно включать каркасные области H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-

FR4. С-конец H-FR1 прямо или косвенно связан с N-концом HCDR1, и H-FR1 может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84-85. H-FR2 находится между HCDR1 и HCDR2, и H-FR2 может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86. H-FR3 находится между HCDR2 и HCDR3, и H-FR3 может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87. N-конец H-FR4 прямо или косвенно связан с С-концом HCDR3, и H-FR4 может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 88.

[00143] Тяжелая цепь антитела или ее фрагмент по настоящему изобретению включает переменную область тяжелой цепи VH, и переменная область тяжелой цепи VH может включать аминокислотную последовательность или ее вариант, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 25.

[00144] В антителе, его антигенсвязывающем фрагменте или варианте по настоящему изобретению тяжелая цепь антитела или ее фрагмент может дополнительно включать константную область человека. Например, константная область человека может включать константную область IgG человека. Например, константная область IgG человека может включать константную область IgG1 человека.

[00145] В настоящей заявке тяжелая цепь антитела или ее фрагмент может включать аминокислотную последовательность или ее вариант, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 27.

[00146] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность LCDR1 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать SEQ ID NO: 80 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 81 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 82 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 77 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 78 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 79 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-005 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать SEQ ID NO: 20 или ее вариант; и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 18 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-005 или антитело, имеющее ту же переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 23 и аминокислотная последовательность тяжелой цепи может быть приведена в SEQ ID NO:

21. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-005 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00147] В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению конкурирует с референсным антителом за связывание с белком CD137 (например, белком CD137 человека). Референсное антитело может включать LCDR1-3 и HCDR1-3, и аминокислотная последовательность LCDR1 может включать SEQ ID NO: 80 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 81 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 82 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 77 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 78 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 79 или ее вариант. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать антитело YN-005 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи может включать SEQ ID NO: 20 или ее вариант; и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 18 или ее вариант. Например, референсное антитело может включать антитело YN-005 или антитело, имеющее ту же переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 23 и аминокислотная последовательность тяжелой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 21. Например, референсное антитело может включать антитело YN-005 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00148] В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность LCDR1 антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать SEQ ID NO: 80 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 81 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 82 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 77 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 78 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 79 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-006 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать SEQ ID NO: 20 или ее вариант; и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может включать

SEQ ID NO: 25 или ее вариант. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-006 или антитело, имеющее ту же переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 23 и аминокислотная последовательность тяжелой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 27. Например, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может включать антитело YN-006 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00149] В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению конкурирует с референсным антителом за связывание с белком CD137 (например, белком CD137 человека). Референсное антитело может включать LCDR1-3 и HCDR1-3, и аминокислотная последовательность LCDR1 может включать SEQ ID NO: 80 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 81 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 82 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 77 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 78 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 79 или ее вариант. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать антитело YN-006 или антитело с теми же LCDR1-3 и HCDR1-3. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи может включать SEQ ID NO: 20 или ее вариант; и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может включать SEQ ID NO: 25 или ее вариант. Например, референсное антитело может включать антитело YN-006 или антитело, имеющее ту же переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 23 и аминокислотная последовательность тяжелой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 27. Например, референсное антитело может включать антитело YN-006 или иметь ту же легкую цепь и тяжелую цепь.

[00150] В настоящей заявке белок CD137 может включать белок CD137 человека.

[00151] В другом аспекте настоящая заявка также относится к биспецифическому антителу, связывающемуся с белком PD-L1 с K_D ниже 2×10^{-9} М (например, K_D не более приблизительно 2×10^{-9} М, не более приблизительно 1×10^{-9} М, не более приблизительно 1×10^{-10} М или не более приблизительно 8×10^{-11} М или менее) и связывающемуся с белком CD137 с K_D ниже 8×10^{-9} М (например, K_D не более приблизительно 8×10^{-9} М, не более приблизительно 7×10^{-9} М, не более приблизительно 6×10^{-9} М, не более приблизительно

5×10^{-9} M, не более приблизительно 4×10^{-9} M, не более приблизительно 3×10^{-9} M, не более приблизительно 2×10^{-9} M, не более приблизительно 1×10^{-9} M или не более приблизительно 1×10^{-10} M или менее).

[00152] В настоящей заявке белок PD-L1 выбран из группы, состоящей из белка PD-L1 человека, белка PD-L1 обезьяны и белка PD-L1 мыши; и белок CD137 включает белок CD137 человека.

[00153] В настоящей заявке биспецифическое антитело включает первый нацеливающий фрагмент, специфически связывающийся с белком PD-L1, где первый нацеливающий фрагмент может включать антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, связывающееся с PD-L1.

[00154] Например, антигенсвязывающий фрагмент в первом нацеливающем фрагменте может быть выбран из группы, состоящей из Fab-, Fab'-, F(ab)₂- и Fv-фрагмента. В качестве другого примера, вариант в первом нацеливающем фрагменте может быть выбран из группы, состоящей из белка или полипептида, подвергнутого замене, делеции или добавлению одной или более аминокислот в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; и белок или полипептид, имеющий 85% или более (например, по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более) идентичности последовательности по отношению к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант может являться антителом, его антигенсвязывающим фрагментом или вариантом, связывающимся с белком PD-L1.

[00155] В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающееся с белком PD-L1, в биспецифическом антителе может включать легкую цепь или ее фрагмент. Например, легкая цепь или ее фрагмент включает LCDR1-3, и аминокислотная последовательность LCDR1 представляет собой SEQ ID NO: 54-58; аминокислотная последовательность LCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 60-61; и аминокислотная последовательность LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 63-64. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь или ее фрагмент может включать переменную область легкой цепи, и аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи может быть выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь или ее фрагмент из антитела может включать константную область человека, и константная область человека включает константную область Igλ человека.

[00156] В некоторых вариантах осуществления легкая цепь или ее фрагмент может включать аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 42.

[00157] В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающееся с белком PD-L1, может включать тяжелую цепь или ее фрагмент. Например, тяжелая цепь или ее фрагмент включает HCDR1-3, и аминокислотная последовательность HCDR1 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-47; аминокислотная последовательность HCDR2 представляет собой SEQ ID NO: 48; и аминокислотная последовательность HCDR3 представляет собой SEQ ID NO: 50-52.

[00158] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь или ее фрагмент может включать переменную область тяжелой цепи, и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может быть выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 35.

[00159] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь или ее фрагмент может дополнительно включать константную область человека, и константная область человека может включать константную область IgG человека. Например, константная область IgG человека является константной областью IgG1 человека.

[00160] В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь или ее фрагмент может включать аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 36.

[00161] В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело включает второй нацеливающий фрагмент, специфически связывающийся с белком CD137, где второй нацеливающий фрагмент может включать антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, связывающееся с белком CD137. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab-, Fab'-, F(ab)₂- и Fv-фрагмента. В некоторых вариантах осуществления вариант выбран из группы, состоящей из белка или полипептида, подвергнутого замене, делеции или добавлению одной или более аминокислот в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; и белок или полипептид, имеющий 85% или более (например, по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более) идентичности последовательности по отношению к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту.

[00162] В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающееся с белком CD137, может включать легкую цепь или ее фрагмент. Например, легкая цепь или ее фрагмент включает LCDR1-3, и аминокислотные последовательности LCDR1-3 последовательно могут являться SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81 и SEQ ID NO: 82. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь или ее фрагмент может включать переменную область легкой цепи, и переменная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20.

[00163] В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающееся с белком CD137, может включать тяжелую цепь или ее фрагмент. В некоторых вариантах

осуществления тяжелая цепь или ее фрагмент из антитела может включать HCDR1-3, и аминокислотные последовательности HCDR1-3 последовательно могут являться SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 79. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь или ее фрагмент из антитела может включать переменную область тяжелой цепи, и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи может быть выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 25.

[00164] В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающееся с белком CD137, может включать scFv, и scFv может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83.

[00165] В настоящей заявке биспецифическое антитело может включать первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь может включать переменную область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, переменную область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, и переменную область легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137; и вторая полипептидная цепь может включать переменную область легкой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1.

[00166] Например, в первой полипептидной цепи переменная область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, может находиться на N-конце переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, и переменная область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, может находиться на N-конце переменной области легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137. В качестве другого примера, в первой полипептидной цепи переменная область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, может находиться на N-конце переменной области легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, и переменная область легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, может находиться на N-конце переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137.

[00167] Например, в первой полипептидной цепи переменная область легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, и переменная область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, составляют scFv. Например, scFv может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83.

[00168] Первая полипептидная цепь может дополнительно включать константную область IgG человека. Например, константная область IgG человека может являться константной областью IgG1 человека.

[00169] В некоторых вариантах осуществления константная область IgG человека может находиться на C-конце переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, и может находиться на N-конце переменной области легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137; альтернативно, константная область IgG человека может находиться на C-конце переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, и может находиться на N-конце переменной

области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137.

[00170] В некоторых вариантах осуществления первая полипептидная цепь может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44.

[00171] В некоторых вариантах осуществления вторая полипептидная цепь может дополнительно включать константную область Ig λ человека.

[00172] В настоящей заявке вторая полипептидная цепь может включать следующие аминокислотные последовательности: SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 34.

[00173] Например, в первом нацеливающем фрагменте биспецифического антитела по настоящему изобретению аминокислотная последовательность LCDR1 может быть выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57 и SEQ ID NO: 58 или ее варианта; аминокислотная последовательность LCDR2 может быть выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 61 или ее варианта; аминокислотная последовательность LCDR3 может быть выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 64 или ее варианта; и аминокислотная последовательность HCDR1 может быть выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47 или ее варианта; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 48 или ее варианта; и аминокислотная последовательность HCDR3 может быть выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50-52 или ее варианта. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может быть выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 41 или ее варианта; и аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи может быть выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 35 или ее варианта. В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи может являться аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 42, и аминокислотная последовательность тяжелой цепи может являться аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 36.

[00174] Например, во втором нацеливающем фрагменте биспецифического антитела по настоящему изобретению, аминокислотная последовательность LCDR1 может включать SEQ ID NO: 80 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR2 может включать SEQ ID NO: 81 или ее вариант; аминокислотная последовательность LCDR3 может включать SEQ ID NO: 82 или ее вариант; и аминокислотная последовательность HCDR1 может включать SEQ ID NO: 77 или ее вариант; аминокислотная последовательность HCDR2 может включать SEQ ID NO: 78 или ее

вариант; и аминокислотная последовательность HCDR3 может включать SEQ ID NO: 79 или ее вариант. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по настоящему изобретению может включать SEQ ID NO: 20 или ее вариант; и аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи может являться последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 25 или их вариантов. В некоторых вариантах осуществления антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по настоящему изобретению может включать легкую цепь и тяжелую цепь, аминокислотная последовательность легкой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 23, и аминокислотная последовательность тяжелой цепи может быть приведена в SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 27.

[00175] Например, в биспецифическом антителе по настоящему изобретению первый полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, и второй полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15. Биспецифическое антитело может включать антитело YN-007 или антитело с теми же первым полипептидом и вторым полипептидом, где первый полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 25, аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13; и второй полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15.

[00176] В качестве другого примера, в биспецифическом антителе по настоящему изобретению первый полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, и второй полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34. Биспецифическое антитело может включать антитело YN-051 или антитело с теми же первым полипептидом и вторым полипептидом. Где первый полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 25, аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32; и второй полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34.

[00177] В качестве другого примера в биспецифическом антителе по настоящему изобретению первый полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44, и второй полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34. Биспецифическое антитело может включать антитело YN-052 или антитело с теми же первым полипептидом и вторым полипептидом. Где первый полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 25, аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20, и аминокислотную

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36; и второй полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34.

[00178] Например, в биспецифическом антителе по настоящему изобретению первый полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, и второй полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15. Биспецифическое антитело может включать антитело YN-007 или антитело с теми же первым полипептидом и вторым полипептидом. Где первый полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23, и аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13; и второй полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15.

[00179] В качестве другого примера, в биспецифическом антителе по настоящему изобретению первый полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, и второй полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34. Биспецифическое антитело может включать антитело YN-051 или антитело с теми же первым полипептидом и вторым полипептидом. Где первый полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23; и второй полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34.

[00180] В качестве другого примера, в биспецифическом антителе по настоящему изобретению первый полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44, и второй полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34. Биспецифическое антитело может включать антитело YN-052 или антитело с теми же первым полипептидом и вторым полипептидом. Где первый полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23; и второй полипептид может включать аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34.

Нуклеиновая кислота, вектор, клетка-хозяин и способ получения

[00181] В другом аспекте настоящая заявка также относится к одной или более выделенным молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант или биспецифическое антитело по настоящему изобретению. Например, каждая молекула нуклеиновой кислоты из одной или более молекул нуклеиновой кислоты может кодировать целое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или кодировать его часть (например, одну или более из HCDR1-3, LCDR1-3, VL, VH, легкой цепи или тяжелой цепи).

[00182] Молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению может являться выделенной. Например, ее можно получать или синтезировать следующими способами: (i) амплификация *in vitro*, такая как, амплификация посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР), (ii) клональная рекомбинация, (iii) очистка, такая как фракционирование посредством расщепления ферментами рестрикции и электрофореза в геле, или (iv) синтез, такой как химический синтез. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота является молекулой нуклеиновой кислоты, полученной с помощью технологии рекомбинантных ДНК.

[00183] В настоящей заявке нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, можно получать множеством известных в этой области способов, включая, в качестве неограничивающих примеров, ПЦР с достройкой перекрывающихся участков с использованием рестрикционных фрагментов или синтетических олигонуклеотидов. Конкретные действия см. в Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; и Ausube, et al., *Current Protocols in Molecular biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York N.Y., 1993.

[00184] В другом аспекте настоящая заявка относится к одному или более векторам и включает одну или более молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Каждый вектор может включать одну или более молекул нуклеиновой кислоты. Кроме того, вектор может дополнительно включать другие гены, такие как маркерные гены, делающие возможной селекцию этого вектора в подходящей клетке-хозяине и в подходящих условиях. Кроме того, вектор может дополнительно включать элемент контроля экспрессии, позволяющий правильно экспрессировать кодирующую область в подходящей клетке-хозяине. Такие контрольные элементы хорошо известны специалистам в этой области, например, они могут включать промоторы, участки связывания рибосомы, энхансеры и другие контрольные элементы для регуляции транскрипции генов или трансляции мРНК и т.д. В некоторых вариантах осуществления последовательность контроля экспрессии является регуляторным элементом. Конкретная структура последовательности контроля экспрессии может варьироваться в зависимости от функции видов или типов клеток, но, как правило, включает 5'-нетранскрибируемую последовательность и 5'- и 3'-нетранслируемую последовательность, участвующие в инициации транскрипции и трансляции, такие как ТАТА-бокс, последовательность кэпа, последовательность СААТ и т.д. Например, 5'-нетранскрибируемая последовательность контроля экспрессии может включать промоторную область, которая может включать промоторную последовательность для транскрипционного контроля функционально связанной нуклеиновой кислоты. Одну или более молекул нуклеиновой кислоты, описанных в настоящей заявке, можно функционально связывать с элементом контроля экспрессии.

[00185] Вектор может включать, например, плазмиду, космиду, вирус, фаг или другие векторы, общепотребительные в геной инженерии, например, вектор является

экспрессирующим вектором.

[00186] В другом аспекте настоящая заявка относится к клетке, которая может включать молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и/или вектор, описанный в настоящей заявке. Клетка может являться клеткой-хозяином. В некоторых вариантах осуществления каждая клетка-хозяин может включать одну молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, описанный в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления каждая клетка-хозяин может включать множество (например, две или более) молекул нуклеиновой кислоты или векторов, описанных в настоящей заявке. Например, вектор по настоящему изобретению можно встраивать в клетку-хозяина, например, эукариотическую клетку, например, клетку растительного происхождения, клетку гриба или дрожжевые клетки и т.д. Вектор по настоящему изобретению можно встраивать в клетку-хозяина известными в этой области способами, такими как электропорация, трансфекция с липофектином, трансфекция с липофектаминоном и т.п.

[00187] В другом аспекте настоящая заявка относится к одной или более клеткам-хозяевам, включающим молекулу нуклеиновой кислоты или вектор.

[00188] В другом аспекте настоящая заявка относится к способу получения антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта или биспецифического антитела. Способ может включать культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в условиях, делающих возможной экспрессию антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта или биспецифического антитела, и, необязательно, сбор антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта. Например, можно использовать подходящую среду, подходящую температуру, время культивирования и т.д., и эти способы будут понятны специалистам в этой области.

Фармацевтическая композиция и применение

[00189] В другом аспекте настоящая заявка относится к фармацевтической композиции, которая может включать антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант или биспецифическое антитело, молекулу нуклеиновой кислоты, вектор и/или клетку-хозяина и, необязательно, фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

[00190] Фармацевтически приемлемое вспомогательное средство может включать буферы, антиоксиданты, консерванты, низкомолекулярные полипептиды, белки, гидрофильные полимеры, аминокислоты, сахара, хелаторы, противоионы, комплексные соединения с металлами и/или неионное поверхностно-активное вещество и т.п.

[00191] В настоящей заявке фармацевтическую композицию можно составлять для перорального введения, внутривенного введения, внутримышечного введения, введения *in situ* в очаг опухоли, ингаляции, ректального введения, вагинального введения, трансдермального введения или введения с помощью подкожного депо.

[00192] В другом аспекте настоящая заявка относится к применению антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта или биспецифического антитела, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина и/или фармацевтической

композиции в производстве лекарственного средства для облегчения или лечения опухолей. Помимо прочего, опухоли включают рак толстого кишечника.

[00193] В другом аспекте настоящая заявка относится к способу повышения функции Т-клеток, включающему введение нуждающемуся в этом индивидууму антитела, связывающегося с белком PD-L1, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта, антитела, связывающегося с белком CD137, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта или биспецифического антитела, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции. Среди них, Т-клетки являются опухолеассоциированными дисфункциональными Т-клетками.

[00194] В другом аспекте настоящая заявка относится к способу ингибирования связывания белка PD-L1 с белком PD-1, включающему введение нуждающемуся в этом индивидууму антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта или биспецифического антитела, молекулы нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина и/или фармацевтической композиции.

[00195] В настоящей заявке положение CDR антитела можно определять способом Kabat.

[00196] Настоящая заявка дополнительно включает следующие варианты осуществления:

1. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, связывающееся с белком PD-L1 с K_D 3×10^{-9} М или менее.

2. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по варианту осуществления 1, связывающееся с белком PD-L1 с K_D 8×10^{-11} М или менее.

3. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 1-2, ингибирующее связывание PD-L1 с PD-1.

4. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 1-3, способное приводить к облегчению или лечению опухолеассоциированных заболеваний.

5. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по варианту осуществления 4, где опухоль включает рак толстого кишечника.

6. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 1-5, где антитело выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела, одноцепочечного антитела, химерного антитела, гуманизированного антитела и полностью человеческого антитела.

7. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 1-6, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab-, Fab'-, F(ab)₂- и Fv-фрагмента.

8. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 1-7, где вариант выбран из группы, состоящей из:

1) белка или полипептида, полученного посредством замены, делеции или добавления одной или более аминокислот в антителе или его антигенсвязывающем

фрагменте; и

2) белка или полипептида, имеющего 90% или более идентичности последовательности по отношению к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту.

9. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 1-8, конкурирующее с референсным антителом, связывающимся с белком PD-L1, где референсное антитело включает переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, переменная область легкой цепи референсного антитела включает LCDR1-3, переменная область легкой цепи референсного антитела включает LCDR1-3, и LCDR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54-58; LCDR2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60-61; и LCDR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 63-64; и переменная область тяжелой цепи референсного антитела включает HCDR1-3, HCDR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-47; HCDR2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 48; и HCDR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50-52.

10. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по варианту осуществления 9, где переменная область легкой цепи референсного антитела включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 41, и переменная область тяжелой цепи референсного антитела включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 35.

11. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 9-10, где легкая цепь референсного антитела включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 42; и тяжелая цепь референсного антитела включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 36.

12. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по вариантам осуществления 1-11, где антитело включает легкую цепь антитела или ее фрагмент, включающую LCDR1, и LCDR1 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53: TGTX1SX2VGGYX3X4VS; где X1 является S, R или V; X2 является D, E или S; X3 является N или R; X4 является Y или E, и где LCDR1 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat.

13. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по варианту осуществления 12, где LCDR1 включает аминокислотную последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54-58.

14. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 11-13, где легкая цепь антитела или ее фрагмент включает LCDR2, включающую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59: X1NSX2RPS, где X1 является G или E; X2 является N или I, и где LCDR2 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat.

15. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по варианту осуществления 14, где LCDR2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60-61.

16. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 11-15, где легкая цепь антитела или ее фрагмент включает LCDR3, включающую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62: QSYDSSLG1V, где X1 является S или T, и где LCDR3 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat.

17. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 11-16, где легкая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает каркасные области L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4.

18. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по варианту осуществления 17, где каркасные области выбраны из группы, состоящей из консенсусных каркасных последовательностей человека и последовательностей зародышевой линии человека.

19. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 17-18, где С-конец L-FR1 прямо или косвенно связан с N-концом LCDR1, и L-FR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71.

20. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 17-19, где L-FR2 находится между LCDR1 и LCDR2, и LFR2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 72.

21. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 17-20, где L-FR3 находится между LCDR2 и LCDR3, и LFR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73-75.

22. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 17-21, где N-конец L-FR4 прямо или косвенно связан с С-концом LCDR3, и L-FR4 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 76.

23. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 12-22, где легкая цепь антитела или ее фрагмент включает переменную область легкой цепи VL, и переменная область легкой цепи VL включает

аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 41.

24. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 12-23, где легкая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает константную область человека, и константная область человека включает константную область Ig λ человека.

25. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 12-24, где легкая цепь антитела или ее фрагмент включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 42.

26. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 1-25, где антитело включает тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, включающую HCDR1, и HCDR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 45: X1Y AIS, где X1 является S или T, и где HCDR1 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat.

27. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по варианту осуществления 26, где тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает HCDR2, HCDR2 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48, и где HCDR2 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat.

28. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 26-27, где тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает HCDR3, и HCDR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 49: TMX1X2YX3X4GNX5DY, где X1 является D, E или G, X2 является G или E, X3 является S или G, X4 является Y или F, X5 является F или Y, и где HCDR3 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat.

29. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по варианту осуществления 28, где HCDR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50-52.

30. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 26-29, где тяжелая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает каркасные области H-FR1, H-FR2, H-FR3, и H-FR4.

31. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по вариантам осуществления 30, где каркасные области выбраны из группы, состоящей из консенсусных каркасных последовательностей человека и последовательностей зародышевой линии человека.

32. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 30-31, где С-конец H-FR1 прямо или косвенно связан с N-концом HCDR1, и H-FR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 65-67.

33. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 30-32, где H-FR2 находится между HCDR1 и HCDR2, и HFR2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 68.

34. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 30-33, где H-FR3 находится между HCDR2 и HCDR3, и HFR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 69.

35. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 30-34, где N-конец H-FR4 прямо или косвенно связан с C-концом HCDR3, и H-FR4 включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70.

36. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 26-35, где тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает переменную область тяжелой цепи VH, и переменная область тяжелой цепи VH включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 35.

37. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 26-36, где тяжелая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает константную область человека, и константная область человека включает константную область IgG1 человека.

38. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 26-37, где тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 36.

39. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 1-38, где белок PD-L1 выбран из группы, состоящей из белка PDL1 человека, белка PD-L1 обезьяны и белка PD-L1 мыши.

40. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, связывающееся с белком CD137 с K_D 5×10^{-9} М или менее.

41. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по варианту осуществления 40, связывающееся с белком CD137 с K_D 3×10^{-9} М или менее.

42. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 40-41, имеющее CD137-агонистическую активность.

43. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 40-42, способное приводить к облегчению или лечению опухолей.

44. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по варианту осуществления 43, где опухоль включает рак толстого кишечника.

45. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из

вариантов осуществления 40-44, где антитело выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела, одноцепочечного антитела, химерного антитела, гуманизированного антитела и полностью человеческого антитела.

46. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 40-45, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab-, Fab'-, F(ab)₂- и Fv-фрагмента.

47. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 40-46, где вариант выбран из группы, состоящей из:

1) белка или полипептида, полученного посредством замены, делеции или добавления одной или более аминокислот в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте; и

2) белка или полипептида, имеющего 90% или более идентичности последовательности по отношению к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту.

48. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 40-47, конкурирующее с референсным антителом за связывание с белком CD137, где референсное антитело включает переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, переменная область легкой цепи референсного антитела включает LCDR1-3, и аминокислотные последовательности LCDR1-3 последовательно приведены в SEQ ID NO: 80-82, и переменная область тяжелой цепи референсного антитела включает HCDR1-3, и аминокислотные последовательности HCDR1-3 последовательно приведены в SEQ ID NO: 77-79.

49. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по варианту осуществления 48, где переменная область легкой цепи референсного антитела включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20, и переменная область тяжелой цепи референсного антитела включает аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 25.

50. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 48-49, где легкая цепь референсного антитела включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23; и тяжелая цепь референсного антитела включает аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 27.

51. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 40-50, где антитело включает легкую цепь антитела или ее фрагмент.

52. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по варианту осуществления 51, где легкая цепь антитела или ее фрагмент включает LCDR1, и LCDR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 80.

53. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 51-52, где легкая цепь антитела или ее фрагмент включает

LCDR2, и LCDR2 включает аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 81.

54. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 51-53, где легкая цепь антитела или ее фрагмент включает LCDR3, и LCDR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 82.

55. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 51-54, где легкая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает каркасные области L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4.

56. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по варианту осуществления 55, где каркасные области выбраны из группы, состоящей из консенсусных каркасных последовательностей человека и последовательностей зародышевой линии человека.

57. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 55-56, где С-конец L-FR1 прямо или косвенно связан с N-концом LCDR1, и L-FR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 89.

58. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 55-57, где L-FR2 находится между LCDR1 и LCDR2, и LFR2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 90.

59. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 55-58, где L-FR3 находится между LCDR2 и LCDR3, и LFR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 91.

60. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 55-59, где N-конец L-FR4 прямо или косвенно связан с С-концом LCDR3, и L-FR4 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 92.

61. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 51-60, где легкая цепь антитела или ее фрагмент включает переменную область легкой цепи VL, и переменная область легкой цепи VL включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 20.

62. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 51-61, где легкая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает константную область человека, и константная область человека включает константную область IgL человека.

63. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 51-62, где легкая цепь антитела или ее фрагмент включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23.

64. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 40-63, где антитело включает тяжелую цепь антитела или ее

фрагмент.

65. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по варианту осуществления 64, где тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает HCDR1, и HCDR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 77.

66. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 64-65, где тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает HCDR2, и HCDR2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 78.

67. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 64-66, где тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает HCDR3, и HCDR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 79.

68. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 64-67, где тяжелая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно включает каркасные области H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4.

69. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по варианту осуществления 68, где каркасные области выбраны из группы, состоящей из консенсусных каркасных последовательностей человека и последовательностей зародышевой линии человека.

70. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 68-69, где С-конец H-FR1 прямо или косвенно связан с N-концом HCDR1, и H-FR1 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 84-85.

71. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 68-70, где H-FR2 находится между HCDR1 и HCDR2, и HFR2 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 86.

72. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 68-71, где H-FR3 находится между HCDR2 и HCDR3, и HFR3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 87.

73. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 68-72, где N-конец H-FR4 прямо или косвенно связан с С-концом HCDR3, и H-FR4 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 88.

74. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 68-73, где тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает переменную область тяжелой цепи VH, и переменная область тяжелой цепи VH включает аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 25.

75. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 64-74, где тяжелая цепь антитела или ее фрагмент

дополнительно включает константную область человека, и константная область человека включает константную область IgG человека.

76. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по варианту осуществления 75, где константная область IgG включает константную область IgG1 человека.

77. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 64-76, где тяжелая цепь антитела или ее фрагмент включает аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 27.

78. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 40-77, где белок CD137 включает белок CD137 человека.

79. Биспецифическое антитело, связывающееся с белком PD-L1 с K_D 2×10^{-9} М или менее и связывающееся с белком CD137 с K_D 8×10^{-9} М или менее.

80. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 30, включающее первый нацеливающий фрагмент, специфически связывающийся с белком PD-L1, где первый нацеливающий фрагмент включает антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 1-39.

81. Биспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 30-31, включающее второй нацеливающий фрагмент, специфически связывающийся с белком CD137, где второй нацеливающий фрагмент включает антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 40-78.

82. Биспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 79-81, включающее первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь включает переменную область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, переменную область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, и переменную область легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137; и вторую полипептидную цепь включает переменную область легкой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1.

83. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 82, где в первой полипептидной цепи переменная область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, находится на N-конце переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, и переменная область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, находится на N-конце переменной области легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137; альтернативно, переменная область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, находится на N-конце переменной области легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, и переменная область легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, находится на N-конце переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137.

84. Биспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 82-83, где

вариабельная область легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, и вариабельная область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, в первой полипептидной цепи составляют scFv.

85. Биспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 82-84, где первая полипептидная цепь дополнительно включает константную область IgG человека, и константная область IgG человека находится на С-конце вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PDL1, и находится на N-конце вариабельной области легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137; альтернативно, константная область IgG человека находится на С-конце вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, и находится на N-конце вариабельной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137.

86. Биспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 82-85, где первая полипептидная цепь включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44.

87. Биспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 82-86, где вторая полипептидная цепь включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 34.

88. Одна или более выделенных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 1-39, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 40-78 или биспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 79-87.

89. Вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 88.

90. Клетка, включающая молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 88 или вектор по варианту осуществления 89.

91. Способ получения антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из вариантов осуществления 1-39, антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из вариантов осуществления 40-78 или биспецифического антитела по любому из вариантов осуществления 79-87, включающий культивирование клетки по варианту осуществления 90 в условиях, делающих возможной экспрессию антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из вариантов осуществления 1-39, антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из вариантов осуществления 40-78 или биспецифического антитела по любому из вариантов осуществления 79-87.

92. Фармацевтическая композиция, включающая антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 1-39, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из вариантов осуществления 40-78 или биспецифическое антитело по любому из вариантов осуществления 79-87, молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 88,

вектор по варианту осуществления 89 и/или клетку по варианту осуществления 90 и, необязательно, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

93. Применение антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из вариантов осуществления 1-39, антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из вариантов осуществления 40-78 или биспецифического антитела по любому из вариантов осуществления 79-87, молекулы нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 88, вектора по варианту осуществления 89, клетки по варианту осуществления 90 и/или фармацевтической композиции по варианту осуществления 92 в производстве лекарственного средства для облегчения или лечения опухолей.

94. Применение по варианту осуществления 93, где опухоль включает рак толстого кишечника.

95. Способ ингибирования связывания белка PD-L1 с белком PD-1, включающий введение антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из вариантов осуществления 1-39, антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из вариантов осуществления 40-78 или биспецифического антитела по любому из вариантов осуществления 79-87, молекулы нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 88, вектора по варианту осуществления 89, клетки по варианту осуществления 90 и/или фармацевтической композиции по варианту осуществления 92.

96. Способ повышения функции Т-клеток, включающий введение антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из вариантов осуществления 1-39, антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из вариантов осуществления 40-78 или биспецифического антитела по любому из вариантов осуществления 79-87, молекулы нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 88, вектора по варианту осуществления 89, клетки по варианту осуществления 90 и/или фармацевтической композиции по варианту осуществления 92.

[00197] Не ограничиваемые какой-либо теорией, следующие примеры представлены исключительно для иллюстрирования рабочих способов в случае устройства, способа и системы по настоящему изобретению, но не ограничивают объем настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Скрининг антитела против PD-L1 с использованием фаговой библиотеки антител

[00198] Белок PD-L1-Fc человека (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) использовали в качестве антигена для сортировки фаговой библиотеки природных антител человека (Origincell Therapeutics Co., Ltd.). Пробирку для ELISA покрывали буфером CBS, содержащим 20 мкг/мл (первый и второй раунды) или 10 мкг/мл (третий и четвертый раунды) белка PD-L1, при 4°C в течение ночи. Затем пробирку промывали буфером PBS. Добавляли 10% обезжиренного порошкового молока для блокирования пробирки для ELISA, а затем добавляли 1 мл заблокированного фага и инкубировали при комнатной

температуре ($20\pm 5^{\circ}\text{C}$) в течение 1 часа. После тщательной промывки PBS добавляли 800 мкл буферного раствора Gly-HCl, pH 2,2, для элюции, а затем незамедлительно добавляли 400 мкл буферного раствора Трис-HCl, pH 8,0, для нейтрализации. Затем смесь добавляли к 20 мл *E. coli* SS320 в логарифмической фазе роста со значением OD приблизительно 0,8, тщательно смешивали и отстаивали при 37°C в течение 1 часа. Отбирали 500 мкл микробного раствора для измерения титра фага и использовали глицерин для защиты микроорганизмов, оставшийся микробный раствор использовали для покрывания планшета и культивировали при 37°C в течение ночи. На следующий день бактерии на планшете пропорционально инокулировали в 80 мл среды 2YT-Amp таким образом, что микробный раствор имел значение OD 0,2, и культивировали в течение нескольких часов. Когда значение OD достигало 0,8, добавляли 160 мкл хелперного фага, тщательно смешивали и отстаивали при 37°C в течение 1 часа. Затем добавляли IPTG и антибиотик канамицин и культивировали при встряхивании при 250 об./мин. при 30°C в течение ночи. Затем супернатант собирали для осаждения фага раствором PEG/NaCl, который ресуспендировали в 1,5 мл буфера PBS для скрининга с обогащением.

[00199] 96-луночные планшеты для ELISA покрывали растворами, содержащими 1 мкг/мл белка PD-L1-Fc человека (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) и белка PD-L1-Fc мыши (M5251, приобретенного в ACROBiosystems Inc.) при 4°C в течение ночи. Затем планшет блокировали 10% обезжиренным порошковым молоком по неспецифическим участкам связывания. После тщательной промывки отбирали супернатант моноклонального фага, и добавляли в 96-луночные планшеты и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. После тщательной промывки в каждую лунку добавляли HRP-меченое антитело против M13 (27-9421-01, GE Healthcare) и проводили реакцию при 37°C в течение 45 минут. После тщательной промывки в каждую лунку добавляли ТМВ для проявления цвета. После реакции при комнатной температуре ($20\pm 5^{\circ}\text{C}$) в течение 5-10 минут в каждую лунку добавляли серную кислоту для остановки реакции. Для измерения значения OD в каждой лунке при 450 нм использовали спектрофотометр для чтения микропланшетов.

[00200] Фаг с клоном антитела 1B10, которое может специфически связываться с PD-L1 человека и PD-L1 мыши, идентифицировали посредством ELISA. В соответствии с результатами секвенирования, нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи VH фагового антитела 1B10, приведена в SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи VH фагового антитела 1B10 приведена в SEQ ID NO: 2; нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи VL фагового антитела 1B10, приведена в SEQ ID NO: 3, и аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи VL фагового антитела 1B10 приведена в SEQ ID NO: 4.

ПРИМЕР 2. Экспрессия и очистка полностью человеческого интактного антитела против PD-L1

[00201] Конструировали праймер для ПЦР-амплификации VH фагового антитела 1B10 и продукт ПЦР клонировали посредством рекомбинации в вектор pCMV-IgG1NDL,

дважды расщепленный с помощью AgeI и SalI. Конструировали праймер для ПЦР-амплификации VL фагового антитела 1B10 и продукт ПЦР клонировали посредством рекомбинации в вектор pCMV- λ , дважды расщепленный с помощью AgeI и BsiWI. После секвенирования клетки 293F котрансфицировали с помощью экспрессирующих векторов для тяжелой цепи и легкой цепи для транзиторной экспрессии и очищали с помощью колонки с протеином А для получения интактного антитела IgG1, λ из фагового антитела 1B10. Это полностью человеческое антитело против PD-L1 обозначали YN-002.

[00202] В соответствии с результатами секвенирования, нуклеотидная последовательность VH, кодирующая антитело YN-002, приведена в SEQ ID NO: 1, и аминокислотная последовательность VH антитела YN-002 приведена в SEQ ID NO: 2. Нуклеотидная последовательность VL, кодирующая антитело YN-002, приведена в SEQ ID NO: 3, и аминокислотная последовательность VL антитела YN-002 приведена в SEQ ID NO: 4. Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи, кодирующая антитело YN-002, приведена в SEQ ID NO: 5, и аминокислотная последовательность тяжелой цепи YN-002 приведена в SEQ ID NO: 6. Нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь антитела YN-002, приведена в SEQ ID NO: 7, и аминокислотная последовательность легкой цепи антитела YN-002 приведена в SEQ ID NO: 8.

ПРИМЕР 3. Версия зародышевой линии полностью человеческого антитела против PD-L1 YN-002

[00203] Сравнивая последовательность тяжелой цепи антитела YN-002 с известной последовательностью тяжелой цепи иммуноглобулина зародышевой линии человека, подтверждали, что в тяжелой цепи антитела YN-002 использовали сегмент VH из IGHV1-69*09 зародышевой линии человека, сегмент D из IGHD5-18*01 зародышевой линии человека и сегмент JH из IGHJ4*02 зародышевой линии человека.

[00204] Сравнивая последовательность легкой цепи антитела YN-002 с известной последовательностью легкой цепи иммуноглобулина зародышевой линии человека, подтверждали, что в легкой цепи антитела YN-002 использовали сегмент VL из IGLV2-14*01 зародышевой линии человека и сегмент JL из IGLJ2 *01 зародышевой линии человека.

[00205] Последовательность области CDR антитела YN-002 анализировали по системе Kabat (см. фиг. 1).

[00206] В соответствии с результатами секвенирования, аминокислотные последовательности LCDR1-3 антитела YN-002 приведены в SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60 и SEQ ID NO: 63, соответственно; и аминокислотные последовательности HCDR1-3 приведены в SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48 и SEQ ID NO: 50, соответственно.

[00207] Для минимизации иммуногенности антитела YN-002 некоторые аминокислотные остатки можно подвергать обратной мутации в последовательность зародышевой линии. Антитело YN-003 является версией зародышевой линии антитела YN-002, полученной посредством мутации одной аминокислоты в области FR1 варибельной области тяжелой цепи YN-002 обратно в последовательность зародышевой

линии и мутации 1 аминокислоты в области FR2 и 6 аминокислот в области FR3 в варибельной области легкой цепи YN-002 обратно в последовательность зародышевой линии (см. фиг. 1). Экспрессирующий вектор тяжелой цепи полностью человеческого антитела против PD-L1 YN-003 получают посредством сайт-специфического мутагенеза с использованием набора для мутагенеза (набора для точечной мутации Tiangen, KM101) на основе сконструированной экспрессирующей плазмиды тяжелой цепи YN-002. Экспрессирующий вектор легкой цепи YN-003 получают посредством сайт-специфического мутагенеза с использованием набора для мутагенеза (набора для точечной мутации Tiangen, KM101) на основе экспрессирующей плазмиды легкой цепи YN-002.

[00208] Аминокислотная последовательность VH антитела YN-003 приведена в SEQ ID NO: 9, которую можно получать посредством мутации одного аминокислотного остатка в аминокислотной последовательности VH антитела YN-002. Нуклеотидная последовательность, кодирующая VH YN-003, приведена в SEQ ID NO: 10. Аминокислотная последовательность VL антитела YN-003 приведена в SEQ ID NO: 11, которую можно получать посредством мутации 7 аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности VL антитела YN-002, и нуклеотидная последовательность, соответствующая VL YN-003, приведена в SEQ ID NO: 12. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела YN-003 приведена в SEQ ID NO: 13; нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь YN-003, приведена в SEQ ID NO: 14; аминокислотная последовательность легкой цепи антитела YN-003 приведена в SEQ ID NO: 15; и нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь антитела YN-003, приведена в SEQ ID NO: 16.

[00209] В случае экспрессии и очистки антитела YN-003 см. стадии экспрессии и очистки антитела YN-002 в примере 2.

ПРИМЕР 4. Тестирование аффинности связывания антитела против PD-L1

[00210] Аффинность связывания антитела YN-002 и антитела YN-003 с рекомбинантными белками PD-L1 человека, *Macaca fascicularis*, мыши и собаки измеряли с помощью анализатора молекулярных взаимодействий (Octet RED384, приобретенного в Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). Следующие белки метили биотином (сульфо-NHS-LC-биотином EZ-Link, Pierce, 21327): рекомбинантный PD-L1-Fc человека, рекомбинантный PD-L1-Fc *Macaca fascicularis* (90251-C02H, приобретенный в Sino Biological Inc.), рекомбинантный PD-L1-Fc мыши (M5251, приобретенный в ACROBiosystems Inc.), рекомбинантный PD-L1-Fc собаки (70110-D02H, приобретенный в Sino Biological Inc.). Кинетику связывания антигена-антитела анализировали с помощью технологии биослойной интерферометрии (BLI) с использованием анализатора молекулярных взаимодействий (Octet RED384, приобретенного в Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) и буфера PBS, содержащего 0,1% BSA и 0,02% Tween 20. Биотин-связанный антигенный белок в концентрации 50 нМ фиксировали на сенсоре SA (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) и связывали при 1500 об./мин. в течение 10 минут; затем его связывали с дважды

разведенным раствором антитела при 1500 об./мин. в течение 10 минут; и наконец подвергали диссоциации при 1500 об./мин. в течение 10 минут. Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения Octet Data Analysis 9.0 (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) для получения K_D , K_{on} (1/Мс) и K_{off} (1/с).

[00211] Результаты измерения аффинности связывания антител против PD-L1 YN-002 и YN-003 приведены в таблицах 1-4.

Таблица 1. Аффинность связывания антитела против PD-L1 с PD-L1-Fc человека

Антитело	PD-L1-Fc человека-биотин		
	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_D (М)
YN-002	$6,69 \times 10^5$	$5,94 \times 10^{-4}$	$8,88 \times 10^{-10}$
YN-003	$1,50 \times 10^6$	$6,11 \times 10^{-4}$	$4,08 \times 10^{-10}$

Таблица 2. Аффинность связывания антитела против PD-L1 с PD-L1-Fc мыши

Антитело	PD-L1-Fc мыши-биотин		
	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_D (М)
YN-002	$9,77 \times 10^5$	$1,68 \times 10^{-3}$	$1,72 \times 10^{-9}$
YN-003	$1,03 \times 10^6$	$9,97 \times 10^{-4}$	$9,96 \times 10^{-10}$

Таблица 3. Аффинность связывания антитела против PD-L1 с PD-L1-Fc *Macaca Fascicularis*

Антитело	PD-L1-Fc <i>Macaca Fascicularis</i> -биотин		
	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_D (М)
YN-002	$1,77 \times 10^6$	$1,90 \times 10^{-3}$	$1,07 \times 10^{-9}$
YN-003	$2,08 \times 10^6$	$1,36 \times 10^{-3}$	$6,54 \times 10^{-10}$

Таблица 4. Аффинность связывания антитела против PD-L1 с PD-L1-Fc собаки

Антитело	PD-L1-Fc собаки-биотин		
	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_D (М)
YN-002	$1,02 \times 10^6$	$7,59 \times 10^{-4}$	$7,43 \times 10^{-10}$
YN-003	$8,64 \times 10^5$	$5,14 \times 10^{-4}$	$5,94 \times 10^{-10}$

ПРИМЕР 5: Антитело против PD-L1 ингибирует связывание PD-L1 человека и PD-1 человека

[00212] Белок PD-1-Fc человека (ACROBiosystems Inc., H5257) метили биотином (сульфо-NHS-LC-биотином EZ-Link, Pierce, 21327). PD-1-Fc человека, меченный субнасыщенной концентрацией биотина, добавляли к 1×10^6 /мл клеток CHO, стабильно экспрессирующих PD-L1 человека, а затем добавляли каждое антитело, разведенное в пять раз, тщательно смешивали и инкубировали (4°C, 1 ч.). После промывки клеток добавляли конъюгат стрептавидин R-PE (Life Technology, SA10041) и инкубировали (4°C, 30 мин). После промывки клеток определяли интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитометра (Intellicyt iQue Screener). Результаты показаны на фиг. 2: YN-002 и

YN-003 могут эффективно ингибировать связывание PD-1 человека с клетками CHO, экспрессирующими PD-L1 человека.

ПРИМЕР 6: Антитело против PD-L1 ингибирует связывание PD-L1 *Macaca fascicularis* с PD-1 *Macaca fascicularis*.

[00213] Способность антител против PD-L1 YN-002 и YN-003 блокировать связывание PD-L1-Fc *Macaca fascicularis* (Sino Biological Inc., 90251-C02H) с PD-1-Fc *Macaca fascicularis* (Sino Biological Inc., 90311-C02H) оценивали с помощью устройства Octet RED384 ((Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). Сначала PD-1-Fc *Macaca fascicularis* метили биотином (сульфо-NHS-LC-биотином EZ-Link, Pierce, 21327). Анализ кинетики связывания антитела против PD-L1 в случае ингибирования связывания PD-L1 *Macaca fascicularis* с PD-1 *Macaca fascicularis* осуществляли с помощью технологии биослойной интерферометрии (BLI) с использованием устройства Fortebio Octet RED384 (PALL) для анализа молекулярных взаимодействий (антиген и антитело разводили 0,1% BSA и 0,02% Tween 20 в буфере PBS). 100 нМ биотин-связанный рекомбинантный PD-1-Fc человека фиксировали на сенсоре SA при 1500 об./мин и связывали в течение 10 мин. PD-L1 *Macaca fascicularis* в конечной концентрации 75 нМ смешивали с разведенным в три раза раствором антитела, инкубировали в течение 60 минут, а затем объединяли в устройстве в течение 10 минут при 1500 об./мин., и наконец подвергали диссоциации в течение 10 минут при 1500 об./мин. Полученные результаты подвергали анализу с помощью программного обеспечения Octet Data Analysis 9.0 (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). Результаты показаны на фиг. 3: YN-002 и YN-003 могут эффективно ингибировать связывание PD-L1-Fc *Macaca fascicularis* с PD-1-Fc *Macaca fascicularis*.

ПРИМЕР 7: Антитело против PD-L1 ингибирует связывание PD-L1 мыши с PD-1 мыши.

[00214] PD-1-Fc мыши (ACROBiosystems Inc., M5259) метили биотином (сульфо-NHS-LC-биотином EZ-Link, Pierce, 21327), PD-1-Fc мыши, меченый субнасыщенной концентрацией биотина, добавляли к 1×10^6 /мл клеток CHO, стабильно экспрессирующих PD-L1 мыши, а затем добавляли каждое антитело, разведенное в пять раз, тщательно смешивали и инкубировали (4°C, 1 ч.). После промывки клеток добавляли конъюгат стрептавидин R-PE (Life Technology, SA10041) и инкубировали (4°C, 30 мин). После промывки клеток определяли интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитометра (Intellicyt iQue Screener). Результаты показаны на фиг. 4: YN-002 и YN-003 могут эффективно ингибировать связывание PD-1 мыши с клетками CHO, экспрессирующими PD-L1 мыши.

ПРИМЕР 8: Исследования противоопухолевого эффекта моноклонального антитела против PD-L1 на мышях, несущих рак толстого кишечника

[00215] В день 0 самкам мышей C57BL/6 возрастом 6-8 недель подкожно инокулировали 3×10^6 клеток колоректального рака мыши MC38 (Shanghai Linyuan Biological Technology Co., Ltd.). В день 3 мышей равномерно распределяли по 7 группам с 8-9 мышами в каждой группе. Несущим опухоли мышам в каждой группе

интраперитонеально инъецировали белок антитела IgG-Fc человека (10 мг/кг, дважды в неделю, всего две недели), антитело YN-003 (10 мг/кг, дважды в неделю, всего две недели), атезолизумаб (10 мг/кг, дважды в неделю, всего две недели), соответственно. Мышей в каждой группе регулярно обследовали на предмет изменения массы тела и размера опухоли. Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что, по сравнению с контрольным IgG1-Fc, YN-003 и атезолизумаб могут эффективно ингибировать рост опухоли, где противоопухолевый эффект YN-003 является более значимым (фиг. 5).

ПРИМЕР 9: Скрининг антитела против CD137 с помощью фаговой библиотеки антител

[00216] Белок CD137 (приобретенный в Sino Biological Inc.) использовали в качестве антигена для сортировки фаговой библиотеки природных антител человека (Origincell Therapeutics Co., Ltd.). Пробирку для ELISA покрывали буфером CBS, содержащим 20 мкг/мл (первый и второй раунды) или 10 мкг/мл (третий и четвертый раунды) белка CD137 при 4°C в течение ночи. Затем пробирку промывали буфером PBS. Добавляли 10% обезжиренное порошковое молоко для блокирования пробирки для ELISA, а затем добавляли 1 мл заблокированного фага и инкубировали при комнатной температуре (20±5°C) в течение 1 часа. После тщательной промывки PBST добавляли 800 мкл буферного раствора Gly-HCl, pH 2,2, для элюции, а затем незамедлительно добавляли 400 мкл буферного раствора Трис-HCl, pH 8,0, для нейтрализации. Затем смесь добавляли к 20 мл *E. coli* SS320 в логарифмической фазе роста со значением OD приблизительно 0,8, тщательно смешивали и отстаивали при 37°C в течение 1 часа. Отбирали 500 мкл микробного раствора для измерения титра фага и использовали глицерин для защиты микроорганизмов, оставшийся раствор микроорганизмов использовали для покрывания планшета и культивировали при 37°C в течение ночи. На следующий день бактерии на планшете пропорционально инокулировали в 80 мл среды 2YT-Amp таким образом, что раствор микроорганизмов имел значение OD 0,2, и культивировали в течение нескольких часов. Когда значение OD достигало 0,8, добавляли 160 мкл хелперного фага, тщательно смешивали и отстаивали при 37°C в течение 1 часа. Затем добавляли IPTG и антибиотик канамицин и культивировали со встряхиванием при 250 об./мин. при 30°C в течение ночи. Затем супернатант собирали для осаждения фага раствором PEG/NaCl, который ресуспендировали в 1,5 мл буфера PBS для скрининга с обогащением.

[00217] 96-луночные планшеты для ELISA покрывали растворами, содержащими 1 мкг/мл белка CD137 человека, при 4°C в течение ночи. Затем планшет блокировали 10% обезжиренным порошковым молоком по неспецифическим участкам связывания. После тщательной промывки отбирали супернатант моноклонального фага, добавляли в 96-луночные планшеты и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. После тщательной промывки в каждую лунку добавляли HRP-меченое антитело против M13 (27-9421-01, GE Healthcare) и проводили реакцию при 37°C в течение 45 минут. После тщательной промывки в каждую лунку добавляли TMB для проявления цвета. После реакции при комнатной температуре (20±5°C) в течение 5-10 минут в каждую лунку добавляли серную

кислоту для остановки реакции. Для измерения значения OD в каждой лунке при 450 нм используют спектрофотометр для чтения микропланшетов.

[00218] Клон фагового антитела 1A6, который может специфически связываться с CD137 человека, идентифицировали с помощью ELISA, и последовательности генов VH и VL получали посредством секвенирования. В соответствии с результатами секвенирования, нуклеотидная последовательность, кодирующая VH фагового антитела 1A6, приведена в SEQ ID NO: 17, аминокислотная последовательность VH фагового антитела 1A6 приведена в SEQ ID NO: 18; нуклеотидная последовательность, кодирующая VL фагового антитела 1A6, приведена в SEQ ID NO: 19, и аминокислотная последовательность VL фагового антитела 1A6 приведена в SEQ ID NO: 20.

ПРИМЕР 10. Экспрессия и очистка полностью человеческого интактного антитела против CD137

[00219] Конструировали праймер для ПЦР-амплификации VH фагового антитела 1A6. Продукт ПЦР клонировали посредством рекомбинации в вектор pCMV-IgG2, дважды расщепленный с помощью AgeI и SalI. Конструировали праймер для ПЦР-амплификации VL фагового антитела 1A6, и продукт ПЦР клонировали посредством рекомбинации в вектор pCMV- λ , расщепленный AgeI и BsiWI. После правильного секвенирования клетки 293F котрансфицировали с помощью экспрессирующих векторов для тяжелой цепи и легкой цепи для транзитной экспрессии и очищали с помощью колонки с протеином А. Интактное антитело IgG2, λ 1A6, полностью человеческого антитело против CD137, обозначали как YN-005.

[00220] В соответствии с результатами секвенирования аминокислотная последовательность VH антитела YN-005 приведена в SEQ ID NO: 18, нуклеотидная последовательность, кодирующая VH антитела YN-005, приведена в SEQ ID NO: 17; и аминокислотная последовательность VL антитела YN-005 приведена в SEQ ID NO: 20, и нуклеотидная последовательность, кодирующая VL антитела YN-005, приведена в SEQ ID NO: 19. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела YN-005 приведена в SEQ ID NO: 21, нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь антитела YN-005, приведена в SEQ ID NO: 22; аминокислотная последовательность легкой цепи антитела YN-005 приведена в SEQ ID NO: 23, и нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь антитела YN-005, приведена в SEQ ID NO: 24.

ПРИМЕР 11: Версия зародышевой линии полностью человеческого антитела против CD137 YN-005

[00221] Сравнивая последовательность тяжелой цепи антитела YN-005 с известной последовательностью тяжелой цепи иммуноглобулина зародышевой линии человека, подтверждали, что в тяжелой цепи антитела YN-005 использовали сегмент VH изIGHV3-23*04 зародышевой линии человека, сегмент D изIGHD7-27*01 зародышевой линии человека и сегмент JH изIGHJ3*02 зародышевой линии человека.

[00222] Сравнивая последовательность легкой цепи иммуноглобулина YN-005 с известной последовательностью легкой цепи иммуноглобулина зародышевой линии

человека, подтверждали, что в легкой цепи антитела YN-005 использовали сегмент VL из IGLV1-44*01 зародышевой линии человека и сегмент JL из IGLJ1*01 зародышевой линии человека.

[00223] Для анализа последовательности области CDR антитела YN-005 использовали систему Kabat (см. фиг. 6), и в соответствии с результатами секвенирования, аминокислотная последовательность HCDR1-3 антитела YN-005 приведена в SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 79, соответственно. Аминокислотная последовательность LCDR1-3 антитела YN-005 приведена в SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81 и SEQ ID NO: 82, соответственно.

[00224] Для минимизации иммуногенности антитела YN-005 некоторые аминокислотные остатки можно подвергать обратной мутации в последовательность зародышевой линии. Антитело YN-006 является версией зародышевой линии антитела YN-005, полученной посредством мутации одной аминокислоты в области FR1 в вариательной области тяжелой цепи YN-005 обратно в последовательность зародышевой линии (см. фиг. 6). Экспрессирующий вектор для тяжелой цепи полностью человеческого антитела против CD137 YN-006 получают посредством сайт-специфического мутагенеза с использованием набора для мутации (набора для точечной мутации Tiangen, KM101) на основе сконструированной экспрессирующей плазмиды тяжелой цепи YN-005.

[00225] В соответствии с результатами секвенирования, аминокислотная последовательность VH антитела YN-006 приведена в SEQ ID NO: 25, и нуклеотидная последовательность, кодирующая VH YN-006, приведена в SEQ ID NO: 26. Аминокислотная последовательность VL антитела YN-006 приведена в SEQ ID NO: 20, и нуклеотидная последовательность, кодирующая VL YN-006, приведена в SEQ ID NO: 19. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела YN-006 приведена в SEQ ID NO: 27; нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь антитела YN-006, приведена в SEQ ID NO: 28; и аминокислотная последовательность легкой цепи антитела YN-006 приведена в SEQ ID NO: 23, и нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь YN-006, приведена в SEQ ID NO: 24.

[00226] В случае экспрессии и очистки антитела YN-006, см. конкретные стадии экспрессии и очистки антитела YN-005 в примере 9.

ПРИМЕР 12: Определение аффинности связывания антитела против CD137

[00227] Аффинность связывания антитела YN-005 и антитела YN-006 с рекомбинантным белком CD137-His человека (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) измеряли с помощью анализатора молекулярных взаимодействий (Octet RED384, приобретенного в Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). Кинетику связывания антигена-антитела анализировали с помощью технологии биослойной интерферометрии (BLI) с использованием анализатора молекулярных взаимодействий (Octet RED384, приобретенного в Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) и буфера PBS, содержащего 0,1% BSA и 0,02% Tween 20. Антитело в концентрации 50 нМ фиксировали на сенсоре АНС и связывали при 1500 об./мин. в течение 5 минут; затем его связывали с разведенным в два раза раствором

рекомбинантного антигенного белка CD137-His (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 нМ) при 1500 об./мин. в течение 5 минут; и наконец подвергали диссоциации при 1500 об./мин. в течение 10 минут. Сенсор АНС регенерировали импульсным введением глицина, а затем использовали повторно. Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения Octet Data Analysis 9.0 (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) для получения K_D , K_{on} (1/Мс) и K_{off} (1/с). Результаты измерения аффинности связывания антитела против CD137 YN-005 и YN-006 показаны в таблице 5.

Таблица 5. Аффинность антитела против CD137 к CD137-His человека

Антитело	CD137-His		
	K_{on} (1/Мс)	K_{off} (1/с)	K_D (М)
YN-005	$9,38 \times 10^4$	$4,55 \times 10^{-5}$	$4,85 \times 10^{-10}$
YN-006	$9,68 \times 10^4$	$1,33 \times 10^{-5}$	$1,37 \times 10^{-10}$

ПРИМЕР 13: Исследования противоопухолевого эффекта моноклонального антитела против CD137 у мышей, несущих рак толстого кишечника

[00228] В день 0 самкам мышей C57BL/6 возрастом 6-8 недель с геном CD137 человека (мышам B-hTNFRSF9 (4-1BB), приобретенным в Beijing BioCytogen Co., Ltd.) подкожно инокулировали $1,5 \times 10^6$ клеток колоректального рака мыши MC38. В день 3 мышей равномерно разделяли по 3 группам с 7 мышами в каждой группе. Несущим опухоли мышам в каждой группе интраперитонеально инъецировали белок антитела IgG-Fc человека (3 мг/кг, дважды в неделю, всего две недели), антитело против CD137 YN-006 (3 мг/кг, дважды в неделю, всего две недели) и антитело против CD137 утомилумаб (3 мг/кг, дважды в неделю, всего две недели), соответственно. Мышей в каждой группе регулярно обследовали на предмет изменения массы тела и размера опухоли. Результаты эксперимента показали, что, по сравнению с контрольным IgG1-Fc, YN-006 и утомилумаб могут эффективно ингибировать рост опухоли, и стоит отметить, что противоопухолевый эффект YN-006 является более значимым, чем у утомилумаба (например, как показано на фиг. 7).

ПРИМЕР 14: Конструирование биспецифического антитела против PD-L1/CD137 YN-007

[00229] Ген первого полипептида биспецифического антитела против PD-L1/CD137 YN-007 конструировали способом молекулярного клонирования, таким как ПЦР с достройкой перекрывающихся участков, сайт-специфический мутагенез или т.п. с использованием гена тяжелой цепи антитела против PD-L1 YN-003 и генов тяжелой цепи и легкой цепи антитела против CD137 человека YN-006, и клонировали посредством комбинации в векторе pCMVlgG1AEM, дважды расщепленном с помощью AgeI и BamHI, для конструирования экспрессирующего вектора первого полипептида YN-007.

[00230] Ген второго полипептида YN-007 является тем же, что и ген легкой цепи YN-003. Экспрессирующий вектор второго полипептида YN-007 является описанным выше сконструированным экспрессирующим вектором легкой цепи YN-003.

[00231] После правильного секвенирования клетки 293F котрансфицировали с помощью экспрессирующих векторов первого полипептида и второго полипептида для транзиторной экспрессии и очищали с помощью колонки с протеином А для получения биспецифического антитела против PD-L1/CD137 YN-007.

[00232] Нуклеотидная последовательность, кодирующая первый полипептид антитела YN-007, приведена в SEQ ID NO: 29, и аминокислотная последовательность первого полипептида антитела YN-007 приведена в SEQ ID NO: 30; нуклеотидная последовательность, кодирующая второй полипептид антитела YN-007, приведена в SEQ ID NO: 16, и аминокислотная последовательность второго полипептида антитела YN-007 приведена в SEQ ID NO: 15.

ПРИМЕР 15: Определение аффинности связывания биспецифического антитела против PD-L1/CD137 YN-007

[00233] Аффинность связывания биспецифического антитела против PD-L1/CD137 YN-007 с рекомбинантным белком PD-L1-Fc человека и рекомбинантным PD-L1-Fc мыши измеряли с помощью анализатора молекулярных взаимодействий (Octet RED384, приобретенного в Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). Рекомбинантный белок PD-L1-Fc человека и рекомбинантный PD-L1-Fc мыши метили биотином (сульфо-NHS-LC-биотином EZ-Link, Pierce, 21327). Кинетику связывания антигена-антитела анализировали с помощью технологии биослойной интерферометрии (BLI) с использованием анализатора молекулярных взаимодействий (Octet RED384, приобретенного в Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) и буфера PBS, содержащего 0,1% BSA и 0,02% Tween 20. Биотин-связанный антигенный белок в концентрации 50 нМ фиксировали на сенсоре SA (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) и связывали при 1500 об./мин. в течение 10 минут; затем его связывали с разведенным в два раза раствором антитела YN-007 при 1500 об./мин. в течение 10 минут; и наконец подвергали диссоциации при 1500 об./мин. в течение 10 минут. Полученные результаты будут анализировать с помощью программного обеспечения Octet Data Analysis 9.0 (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) для получения K_D , K_{on} (1/Мс) и K_{off} (1/с).

[00234] Результаты измерения аффинности связывания YN-007 с PD-L1-Fc человека приведены в таблице 6.

[00235] Результаты измерения аффинности связывания YN-007 с PD-L1-Fc мыши приведены в таблице 7.

Таблица 6. Аффинность связывания биспецифического антитела против PD-L1/CD137 YN-007 с PD-L1-Fc человека

Антитело	PD-L1-Fc человека-биотин		
	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_D (М)
YN-007	$1,13 \times 10^6$	$5,92 \times 10^{-4}$	$5,25 \times 10^{-10}$

Таблица 7. Аффинность связывания биспецифического антитела против PD-L1/CD137 YN-007 с PDL1-Fc мыши

Антитело	PD-L1-Fc мыши-биотин		
	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_D (М)
YN-007	$8,1 \times 10^5$	$1,09 \times 10^{-3}$	$1,34 \times 10^{-9}$

[00236] Аффинность связывания биспецифического антитела против PD-L1/CD137 YN-007 с рекомбинантным белком CD137-His человека измеряли с помощью анализатора молекулярных взаимодействий (Octet RED384, приобретенного в Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). Кинетику связывания антигена-антитела анализировали с помощью технологии биослойной интерферометрии (BLI) с использованием анализатора молекулярных взаимодействий (Octet RED384, приобретенного в Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) и буфера PBS, содержащего 0,1% BSA и 0,02% Tween 20. Антитело в концентрации 50 нМ фиксировали на сенсоре АНС и связывали при 1500 об./мин. в течение 5 минут; затем его связывали с разведенным в два раза раствором рекомбинантного антигенного белка CD137-His человека (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 нМ) при 1500 об./мин. в течение 5 минут; и наконец подвергали диссоциации 1500 об./мин. в течение 10 минут. Сенсор АНС регенерировали посредством импульсного введения глицина, а затем использовали повторно. Полученные результаты будут анализировать с помощью программного обеспечения Octet Data Analysis 9.0 (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) для вычисления силы связывания между антигеном и антителом для получения K_D , K_{on} (1/Мс) и K_{off} (1/с).

[00237] Результаты измерения аффинности связывания биспецифического антитела против PD-L1/CD137 YN-007 с CD137 человека приведены в таблице 8.

Таблица 8. Аффинность связывания биспецифического антитела против PD-L1/CD137 YN-007 с CD137-His человека

Антитело	CD137-His человека		
	k_{on} (1/Мс)	k_{off} (1/с)	K_D (М)
YN-007	$8,96 \times 10^4$	$9,83 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-9}$

ПРИМЕР 16: Созревание аффинности антитела против PD-L1 YN-003

[00238] Конструировали праймер для конструирования гена одноцепочечного антитела (ScFv) из антитела против PD-L1 YN-003 посредством ПЦР с достройкой перекрывающихся фрагментов, клонировали в фагмидный вектор pDF и обозначали как ScFv pDF-YN-003. ScFv pDF-YN-003 использовали в качестве матрицы для конструирования вырожденного праймера для рандомизации 6 областей CDR (включая некоторые аминокислотные остатки в областях CDR и отдельные аминокислотные остатки в областях FR, смежных с областями CDR) антитела YN-003 посредством ПЦР с достройкой перекрывающихся фрагментов, соответственно (как показано на фиг. 8).

[00239] Рандомизированные по области CDR фрагменты гена scFv, полученные посредством ПЦР с достройкой перекрывающихся фрагментов, дважды расщепляли с помощью BssHII и NheI, а затем лигировали с фагмидным вектором pDF, дважды расщепленным с помощью BssHII и NheI. 1 мкг продукта лигирования подвергали электропорации в электрокомпетентные клетки TG1 и покрывали им чашку 2YT+AG

после множественных разведений. На следующий день с чашки соскребали "газон" и переносили в 300 мл среды 2YT+Amp. Клетки культивировали при 37°C до OD приблизительно 0,8. Добавляли хелперный фаг и тщательно смешивали, отстаивали в течение 1 часа и добавляли IPTG в конечной концентрации 1 mM и 50 мкг/мл канамицина и встряхивали при 30°C в течение ночи. На следующий день супернатант собирали посредством центрифугирования и фильтровали через фильтр 0,45. К осажденному фагу добавляли 1/5 объема PEG-NaCl и центрифугировали для сбора осадка. Использовали 1/10 объема PBS для ресуспендирования осадка и измеряли OD₂₆₀ для вычисления БОЕ фага. Продукт хранили при 4°C. Фаговую библиотеку антител можно использовать напрямую для последующего пэннинга.

[00240] Белок PD-L1-His человека (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) использовали в качестве антигена для сортировки указанной выше фаговой библиотеки антител. В пробирках для ELISA буфер CBS использовали для покрытия антигеном PD-L1 (1 мл) в концентрации 100 нМ (первый и второй раунд) или 5 нМ (третий раунд) при 4°C в течение ночи. На следующий день 2 мл буфера PBS, содержащего 10% обезжиренное порошковое молоко, использовали для блокирования пробирки. Добавляли 1 мл блокированного фага в пробирку и инкубировали в течение 1 ч. при комнатной температуре; промывали PBST 20 раз (первый раунд), 50 раз (второй раунд) или 100 раз (третий раунд). Добавляли 800 мкл буфера Gly-HCl (pH 2,2) для элюции и незамедлительно добавляли 400 мкл буфера Трис-HCl (pH 8,0) для нейтрализации. Его добавляли к 20 мл *E. coli* TG1 в фазе логарифмического роста с OD приблизительно 0,8, тщательно смешивали и отстаивали при 37°C в течение 1 ч. Отбирали 500 мкл для определения титра фага и использовали глицерин для защиты микроорганизмов. Оставшуюся микробную жидкость распределяли по чашке и инкубировали при 37°C в инкубаторе в течение ночи. На следующий день микроорганизмы на планшете и инокулировали в 80 мл среды 2YT+Amp в некоторой пропорции для достижения OD 0,2. Смесь инкубировали в течение нескольких часов до достижения OD 0,8. Добавляли 160 мкл хелперного фага, тщательно смешивали и отстаивали при 37°C в течение 1 ч. Добавляли IPTG и антибиотик канамицин и инкубировали при встряхивании при 250 об./мин и 30°C в течение ночи. Супернатант собирали и обрабатывали раствором PEG/NaCl для осаждения фага, который ресуспендировали в 1,5 мл буфера PBS. Ресуспендированного фага использовали для следующего раунда скрининга с обогащением. После 3 раундов сортировки наблюдали значительное обогащение. Сортированных фаговых клонов антитела идентифицировали посредством ELISA: белком PD-L1-His человека покрывали 96-луночный планшет для ELISA в концентрации 1 мкг/мл при 4°C в течение ночи. Затем неспецифические участки связывания блокировали 10% обезжиренным порошковым молоком. После достаточной промывки супернатант моноклонального фага добавляли в 96-луночный планшет и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. После тщательной промывки добавляли HRP-меченое антитело против M13 (GE Healthcare, 27-9421-01) и проводили реакцию при 37°C в течение 45 минут. После тщательной промывки добавляли TMB для проявления цвета и

проводили реакцию при комнатной температуре в течение 5-10 минут. И наконец, реакцию останавливали серной кислотой. Значение OD в каждой лунке измеряли при 450 нм и для секвенирования выбирали фаговый клон антитела с более высоким значением OD₄₅₀. После получения последовательностей генов варибельной области тяжелой цепи и легкой цепи каждого клона фагового антитела, каждое фаговое антитело реконструировали в виде полноразмерного антитела IgG1, λ : конструировали праймер для осуществления ПЦР-амплификации VH каждого клона фагового антитела и продукт ПЦР клонировали посредством рекомбинации в экспрессирующий вектор тяжелой цепи антитела pCMV-IgG1NDL, дважды расщепленный с помощью AgeI и SalI. Конструировали праймер для ПЦР-амплификации VL каждого клона фагового антитела, и продукт ПЦР клонировали в экспрессирующий вектор легкой цепи антитела pCMV- λ , дважды расщепленный с помощью AgeI и BsiWI. После правильного секвенирования клетки 293F котрансфицировали с помощью экспрессирующих векторов для тяжелой цепи и легкой цепи каждого антитела для транзиторной экспрессии. Через 7 дней культивирования в бессывороточной среде, собирали супернатант культуры клеток и очищали с помощью колонки с протеином А для получения белка антитела. Очищенное антитело диализовали с помощью PBS и в конечном итоге количественно анализировали с помощью набора для анализа белка BCA (Pierce, 23225). Аффинность связывания указанного полноразмерного антитела с рекомбинантным белком PDL1-His человека (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) с использованием анализатора молекулярных взаимодействий (Octet RED384, приобретенного в Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). Кинетику связывания антигена-антитела анализировали с помощью технологии биослойной интерферометрии (BLI) с использованием анализатора молекулярных взаимодействий (Octet RED384, приобретенного в Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) и буфера PBS, содержащего 0,1% BSA и 0,02% Tween 20. Антитело в концентрации 50 нМ фиксировали на сенсоре АНС и связывали при 1500 об./мин в течение 5 минут; затем связывали с разведенным в два раза раствором антигена (50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 нМ) с 7 градиентами концентрации при 1500 об./мин. в течение 5 минут, и наконец подвергали диссоциации 1500 об./мин в течение 10 минут. Сенсор АНС регенерировали посредством импульсного введения глицина, а затем использовали повторно. Полученные результаты будут анализировать с помощью программного обеспечения Octet Data Analysis 9.0 (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) для получения K_D , K_{on} (1/Мс) и K_{off} (1/с). После скрининга полученные мутантные клоны с повышенной аффинностью точечные мутации аминокислот с повышенной аффинностью в разных областях CDR комбинировали способами, такими как ПЦР с достройкой перекрывающихся фрагментов, а затем белок антитела экспрессировали и очищали указанным выше способом и определяли аффинность. После множества раундов скрининга и комбинации лучшие 5 мутантных клонов антитела YN-003 с высокой аффинностью обозначали как антитело YN-035, антитело YN-036, антитело YN-037, антитело YN-038 и антитело YN-039, соответственно. Значения аффинности 5 антител, полученных указанным выше способом, приведены в

таблице 9. Результаты показали, что аффинность антитела YN-035, антитела YN-036, антитела YN-037, антитела YN-038 и антитела YN-039 была выше, чем у антител против PD-L1 атезолизумаба и авелумаба.

Таблица 9. Аффинность связывания антитела против PD-L1 с PD-L1-His человека

Антите ло	PD-L1-His человека						
	K_D (M)	Ошибка K_D	K_{on} (1/Мс)	Ошибка K_{on}	K_{off} (1/с)	Ошибка а K_{off}	Полн ый R^2
Атезол изумаб	$9,16 \times 10^{-10}$	$8,79 \times 10^{-12}$	$3,78 \times 10^5$	$1,95 \times 10^3$	$3,46 \times 10^{-4}$	$2,80 \times 10^{-6}$	0,998 4
Авелу маб	$1,03 \times 10^{-9}$	$9,20 \times 10^{-12}$	$2,96 \times 10^5$	$1,31 \times 10^3$	$3,05 \times 10^{-4}$	$2,37 \times 10^{-6}$	0,999 1
YN- 035	$4,52 \times 10^{-10}$	$3,54 \times 10^{-12}$	$4,27 \times 10^5$	$1,16 \times 10^3$	$1,93 \times 10^{-4}$	$1,42 \times 10^{-6}$	0,999 5
YN- 036	$4,74 \times 10^{-10}$	$4,95 \times 10^{-12}$	$3,69 \times 10^5$	$1,22 \times 10^3$	$1,75 \times 10^{-4}$	$1,73 \times 10^{-6}$	0,999 4
YN- 037	$3,82 \times 10^{-10}$	$5,66 \times 10^{-12}$	$3,55 \times 10^5$	$1,36 \times 10^3$	$1,36 \times 10^{-4}$	$1,94 \times 10^{-6}$	0,999 1
YN- 038	$4,47 \times 10^{-10}$	$4,61 \times 10^{-12}$	$3,50 \times 10^5$	$1,05 \times 10^3$	$1,56 \times 10^{-4}$	$1,54 \times 10^{-6}$	0,999 5
YN- 039	$4,85 \times 10^{-10}$	$4,41 \times 10^{-12}$	$3,56 \times 10^5$	$1,02 \times 10^3$	$1,73 \times 10^{-4}$	$1,49 \times 10^{-6}$	0,999 5

[00241] Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела YN-035 (VH YN-035) приведена в SEQ ID NO: 31, аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела YN-035 приведена в SEQ ID NO: 32, аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела YN-035 (YN-035 VL) приведена в SEQ ID NO: 33, и аминокислотная последовательность легкой цепи антитела YN-035 приведена в SEQ ID NO: 34.

[00242] Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела YN-036 (YN-036 VH) приведена в SEQ ID NO: 35, аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела YN-036 приведена в SEQ ID NO: 36, аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи антитела YN-036 (YN-036VL) приведена в SEQ ID NO: 33, и аминокислотная последовательность легкой цепи антитела YN-036 приведена в SEQ ID NO: 34.

[00243] Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи антитела YN-037 (YN-037 VH) приведена в SEQ ID NO: 35, аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела YN-037 приведена в SEQ ID NO: 36,

аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела YN-037 (YN-037VL) приведена в SEQ ID NO: 37, и аминокислотная последовательность легкой цепи антитела YN-037 приведена в SEQ ID NO: 38.

[00244] Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелая цепь антитела YN-038 (YN-038 VH) приведена в SEQ ID NO: 35, аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела YN-038 приведена в SEQ ID NO: 36, аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела YN-038 (YN-038VL) приведена в SEQ ID NO: 39, и аминокислотная последовательность легкой цепи антитела YN-038 приведена в SEQ ID NO: 40.

[00245] Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелая цепь антитела YN-039 (YN-039VH) приведена в SEQ ID NO: 35, аминокислотная последовательность тяжелой цепи антитела YN-039 приведена в SEQ ID NO: 36, аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела YN-039 (YN-039 VL) приведена в SEQ ID NO: 41, и аминокислотная последовательность легкой цепи антитела YN-039 приведена в SEQ ID NO: 42.

[00246] На фиг. 9 показано выравнивание аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи и соответствующих последовательностей зародышевой линии антител YN-003 и YN-035-YN-039, где подчеркнуты CDR, определенные способом Kabat. На фиг. 10 показано выравнивание аминокислотных последовательностей вариабельных областей легкой цепи и соответствующих последовательностей зародышевой линии антител YN-003 и YN-035-YN-039, где подчеркнуты CDR, определенные способом Kabat. Из них, аминокислотная последовательность HCDR1 антитела YN-003 приведена в SEQ ID NO: 46, аминокислотная последовательность HCDR1 YN-035-YN-039 приведена в SEQ ID NO: 47; аминокислотная последовательность HCDR2 антитела YN-003 и аминокислотная последовательность HCDR2 антител YN-035-YN-039 приведена в SEQ ID NO: 48; аминокислотная последовательность HCDR3 YN-003 приведена в SEQ ID NO: 50; аминокислотная последовательность HCDR3 YN-035 приведена в SEQ ID NO: 51; и аминокислотная последовательность HCDR3 антител YN-036-YN-039 приведена в SEQ ID NO: 52.

[00247] Аминокислотная последовательность LCDR1 антитела YN-003 приведена в SEQ ID NO: 54, аминокислотная последовательность LCDR1 антител YN-035-YN-036 приведена в SEQ ID NO: 55, аминокислотная последовательность LCDR1 антитела YN-037 приведена в SEQ ID NO: 56, аминокислотная последовательность LCDR1 антитела YN-038 приведена в SEQ ID NO: 57, аминокислотная последовательность LCDR1 антитела YN-039 приведена в SEQ ID NO: 58; аминокислотная последовательность LCDR2 антитела YN-003 и антител YN-035- YN-036 приведена в SEQ ID NO: 60, аминокислотная последовательность LCDR2 антител YN-037-YN-039 приведена в SEQ ID NO: 61; аминокислотная последовательность LCDR3 антитела YN-003 приведена в SEQ ID NO: 63; и аминокислотная последовательность LCDR3 антител YN-035-YN-039

приведена в SEQ ID NO: 64.

[00248] Связывающая активность антител против PD-L1 YN-035, YN-036, YN-037, YN-038, YN-039 с PD-L1 человека определяли посредством проточной цитометрии: к 1×10^6 /мл клеток CHO, стабильно экспрессирующих PD-L1 человека, добавляли отдельные разведенные в два раза антитела против PD-L1. Смесь тщательно смешивали и инкубировали при 4°C в течение 1 ч. После промывки клеток добавляли F(ab')₂ козы против IgG-Fc человека (DyLight 650) (ab98593, Abcam) и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. После промывки клеток определяли интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитометра (Intellicyt iQue Screener). Результаты эксперимента показаны на фиг. 11: все из YN-035, YN-036, YN-037, YN-038, YN-039 могут эффективно связываться с клетками CHO, экспрессирующими PD-L1 человека.

[00249] Ингибиторную способность антител против PD-L1 YN-035, YN-036, YN-037, YN-038, YN-039 в отношении PD-L1 человека/PD-1 человека определяли посредством проточной цитометрии: белок PD-1-Fc человека (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) метили биотином (сульфо-NHS-LC-биотином EZ-Link, Pierce, 21327). PD-1-Fc человека, меченый субнасыщенной концентрацией биотина, добавляли к 1×10^6 /мл клеток CHO, стабильно экспрессирующих PD-L1 человека, а затем незамедлительно добавляли отдельные разведенные в два раза антитела, тщательно смешивали и инкубировали (4°C, 1 ч.). После промывки клеток добавляли конъюгат стрептавидин R-PE (Life Technology, SA10041) и инкубировали (4°C, 30 мин). После промывки клеток определяли интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитометра (Intellicyt iQue Screener). Результаты эксперимента показаны на фиг. 12: все из антител против PD-L1 YN-035, YN-036, YN-037, YN-038, YN-039 могут эффективно ингибировать связывание PD-1 человека с клетками CHO, экспрессирующими человек PD-L1.

[00250] Связывающую активность антител против PD-L1 YN-035, YN-036, YN-037, YN-038, YN-039 с PD-L1 мыши определяли посредством проточной цитометрии: к 1×10^6 /мл клеток CHO, стабильно экспрессирующих PD-L1 мыши, добавляли отдельные разведенные в два раза антитела против PD-L1. Смесь тщательно смешивали и инкубировали при 4°C в течение 1 ч. После промывки клеток добавляли F(ab')₂ козы против IgG-Fc человека (DyLight 650) (ab98593) и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. После промывки клеток определяли интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитометра (Intellicyt iQue Screener). Результаты эксперимента показаны на фиг. 13: все из YN-035, YN-036, YN-037, YN-038, YN-039 могут эффективно связываться с клетками CHO, экспрессирующими мышью PD-L1.

[00251] Ингибиторную способность антител против PD-L1 YN-035, YN-036, YN-037, YN-038, YN-039 в отношении PD-L1 мыши/PD-1 мыши определяли посредством проточной цитометрии: PD-1-Fc мыши (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) метили биотином (сульфо-NHS-LC-биотином EZ-Link, Pierce, 21327). PD-1-Fc мыши, меченый субнасыщенной концентрацией биотина, добавляли к 1×10^6 /мл клеток CHO, стабильно экспрессирующих PD-L1 мыши, а затем незамедлительно добавляли отдельные

разведенные в два раза антитела, тщательно смешивали и инкубировали (4°C, 1 ч.). После промывки клеток добавляли конъюгат стрептавидин R-PE (Life Technology, SA10041) и инкубировали (4°C, 30 мин). После промывки клеток определяли интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитометра (Intellicyt iQue Screener). Результаты показаны на фиг. 14: все из антител против PD-L1 YN-035, YN-036, YN-037, YN-038, YN-039 могут эффективно ингибировать связывание PD-1 мыши с клетками CHO, стабильно экспрессирующими PD-L1 мыши.

ПРИМЕР 17: Конструирование и идентификация биспецифических антител против PD-L1/CD137 YN-051 и YN-052

[00252] Ген первого полипептида биспецифического антитела против PD-L1/CD137 YN-051 конструировали способом молекулярного клонирования, таким как ПЦР с достройкой перекрывающихся участков, сайт-специфический мутагенез или т.п., с использованием гена тяжелой цепи антитела против PD-L1 YN-035 и генов тяжелой цепи и легкой цепи антитела против CD137 человека YN-006 и клонировали посредством рекомбинации в вектор pCMV-IgG1AEM, дважды расщепленный с помощью AgeI и BamHI, для конструирования экспрессирующего вектора первого полипептида YN-051. Ген второго полипептида YN-051 является тем же, что и ген легкой цепи YN-035. Экспрессирующий вектор второго полипептида YN-035 является экспрессирующим вектором легкой цепи YN-035.

[00253] После правильного секвенирования клетки 293F котрансфецировали с помощью экспрессирующих векторов первого полипептида и второго полипептида биспецифического антитела против PD-L1/CD137 YN-051 для транзиторной экспрессии. После культивирования в бессывороточной среде в течение 7 дней собирали супернатант культуры клеток и очищали с помощью колонки с протеином А для получения белка антитела. Очищенное антитело диализовали с помощью PBS и в конечном итоге количественно анализировали с помощью набора для анализа белка BCA (Pierce, 23225).

[00254] Аминокислотная последовательность первого полипептида YN-051 приведена в SEQ ID NO: 43, и аминокислотная последовательность второго полипептида YN-051 приведена в SEQ ID NO: 34.

[00255] Ген первого полипептида биспецифического антитела против PD-L1/CD137 YN-052 конструировали способом молекулярного клонирования, таким как ПЦР с достройкой перекрывающихся участков, сайт-специфический мутагенез или т.п., с использованием гена тяжелой цепи антитела против PD-L1 YN-036 и генов тяжелой цепи и легкой цепи антитела против CD137 человека YN-006 и клонировали посредством рекомбинации в вектор pCMV-IgG1AEM, дважды расщепленный с помощью AgeI и BamHI, для конструирования экспрессирующего вектора первого полипептида YN-052. Ген второго полипептида YN-052 является тем же, что и ген легкой цепи YN-036. Экспрессирующий вектор второго полипептида YN-052 является экспрессирующим вектором легкой цепи YN-036.

[00256] После правильного секвенирования клетки 293F котрансфецировали с

помощью экспрессирующих векторов первого полипептида и второго полипептида биспецифического антитела против PD-L1/CD137 YN-052 для транзиторной экспрессии. После культивирования в бессывороточной среде в течение 7 дней собирали супернатант культуры клеток и очищали с помощью колонки с протеином А для получения белка антитела. Очищенное антитело диализовали с помощью PBS и в конечном итоге количественно анализировали с помощью набора для анализа белка BCA (Pierce, 23225).

[00257] Аминокислотная последовательность первого полипептида YN-052 приведена в SEQ ID NO: 44, и аминокислотная последовательность второго полипептида YN-052 приведена в SEQ ID NO: 34.

[00258] Аффинность связывания биспецифических антител против PD-L1/CD137 YN-051 и YN-051 с рекомбинантным белком PD-L1-His человека (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) измеряли с помощью анализатора молекулярных взаимодействий (Octet RED384, приобретенного в Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). Кинетику связывания антигена-антитела анализировали с помощью технологии биослойной интерферометрии (BLI) с использованием анализатора молекулярных взаимодействий (Octet RED384, приобретенного в Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) и буфера PBS, содержащего 0,1% BSA и 0,02% Tween 20. Антитело в концентрации 50 нМ фиксировали на сенсоре АНС и связывали при 1500 об./мин. в течение 5 минут; затем его связывали с разведенным в два раза раствором антигена (50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 нМ) с 7 градиентами концентрации при 1500 об./мин. в течение 5 минут; и наконец подвергали диссоциации 1500 об./мин. в течение 10 минут.

Сенсор АНС регенерировали посредством импульсного введения глицина, а затем использовали повторно. Полученные результаты будут анализировать с помощью программного обеспечения Octet Data Analysis 9.0 (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) для получения K_D , K_{on} (1/Мс) и K_{off} (1/с). Результаты измерения аффинности связывания YN-007 с PD-L1-Fc человека приведены в таблице 10.

Таблица 10. Аффинность связывания биспецифического антитела против PD-L1/CD137 с PD-L1-His человека

Антитело	PD-L1-His человека						
	K_D (М)	Ошибка K_D	K_{on} (1/Мс)	Ошибка K_{on}	K_{off} (1/с)	Ошибка K_{off}	Полны й R ²
YN-051	$5,17 \times 10^{-10}$	$4,97 \times 10^{-12}$	$5,32 \times 10^5$	$2,54 \times 10^3$	$2,75 \times 10^{-4}$	$2,29 \times 10^{-6}$	0,9981
YN-052	$5,72 \times 10^{-10}$	$5,69 \times 10^{-12}$	$4,48 \times 10^5$	$2,06 \times 10^3$	$2,57 \times 10^{-4}$	$2,26 \times 10^{-6}$	0,9984

[00259] Аффинность связывания биспецифических антител против PD-L1/CD137 YN-051 и YN-052 с рекомбинантным белком CD137-His человека (Origincell Therapeutics Co., Ltd.) измеряли с помощью анализатора молекулярных взаимодействий (Octet RED384, приобретенного в Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.). Кинетику связывания

антигена-антитела анализировали с помощью технологии биослойной интерферометрии (BLI) с использованием анализатора молекулярных взаимодействий (Octet RED384, приобретенного в Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) и буфера PBS, содержащего 0,1% BSA и 0,02% Tween 20. Антитело в концентрации 50 нМ фиксировали на сенсоре АНС и связывали при 1500 об./мин. в течение 5 минут; затем его связывали с разведенным в два раза растворе антигена рекомбинантного белка CD137-His человека (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 нМ) при 1500 об./мин. в течение 5 минут; и наконец подвергали диссоциации 1500 об./мин. в течение 10 минут. Сенсор АНС регенерировали посредством импульсного введения глицина, а затем использовали повторно. Полученные результаты будут анализировать с помощью программного обеспечения Octet Data Analysis 9.0 (Pall ForteBio Analytics Co., Ltd.) для получения K_D , K_{on} (1/Мс) и K_{off} (1/с).

[00260] Результаты измерения аффинности связывания биспецифических антител против PD-L1/CD137 YN-051 и YN-052 с CD137 человека приведены в таблице 11.

Таблица 11. Аффинность связывания биспецифического антитела против PD-L1/CD137 с CD137-His человека

Антитело	4-1BB-His человека						
	K_D (М)	Ошибка K_D	K_{on} (1/Мс)	Ошибка K_{on}	k_{dis} (1/с)	Ошибка k_{dis}	Полны й R^2
YN-051	$1,64 \times 10^{-9}$	$3,93 \times 10^{-11}$	$8,99 \times 10^4$	$7,25 \times 10^2$	$1,47 \times 10^{-4}$	$3,33 \times 10^{-6}$	0,9981
YN-052	$2,08 \times 10^{-9}$	$4,36 \times 10^{-11}$	$8,37 \times 10^4$	$6,93 \times 10^2$	$1,74 \times 10^{-4}$	$3,35 \times 10^{-6}$	0,9982

[00261] Линия клеток молочной железы человека MDA-MB-231 (Библиотека клеток Китайской академии наук в Шанхае) высоко экспрессирует молекулу PD-L1 человека. Связывание антител против PD-1 YN-035, YN-036 и биспецифических антител против PD-L1/CD137 YN-051 и YN-052 с клетками MDA-MB-231 определяли посредством проточной цитометрии: к 1×10^6 /мл клеток MDA-MB-231 добавляли отдельные разведенные в два раза антитела, соответственно, тщательно смешивали и инкубировали при 4°C в течение 1 ч. После промывки клеток добавляли F(ab')₂ козы против IgG-Fc человека (DyLight 650) (ab98593, Abcam) и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. После промывки клеток, определяли интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитометра (Intellicyt iQue Screener). Результаты эксперимента показаны на фиг. 15: все из YN-035, YN-036, YN-051 и YN-052 могут эффективно связываться с клетками MDA-MB-231.

[00262] Связывающую активность антител против PD-1 YN-035, YN-036 и биспецифических антител против PDL1/CD137 YN-051 и YN-052 с PD-L1 человека определяли посредством проточной цитометрии: к 1×10^6 /мл клеток CHO, стабильно экспрессирующих PD-L1 человека, добавляли отдельные разведенные в два раза антитела, соответственно, тщательно смешивали и инкубировали при 4°C в течение 1 ч. После

промывки клеток добавляли F(ab')₂ козы против IgG-Fc человека (DyLight 650) (ab98593, Abscam) и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. После промывки клеток, определяли интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитометра (Intellicyt iQue Screener). Результаты эксперимента показаны на фиг. 16: все из YN-035, YN-036, YN-051, YN-052, YN-007 могут эффективно связываться с клетками CHO, экспрессирующими PD-L1 человека.

[00263] Ингибиторную способность антител против PD-1 YN-035, YN-036 и биспецифических антител против PDL1/CD137 YN-051, YN-052, YN-007 с PD-L1 человека/PD-1 человека определяли посредством проточной цитометрии: белок PD-1-Fc человека метили биотином (сульфо-NHS-LC-биотином EZ-Link, Pierce, 21327). PD-1-Fc человека, меченый субнасыщенной концентрацией биотина, добавляли к 1×10^6 /мл клеток CHO, стабильно экспрессирующих PD-L1 человека, а затем незамедлительно добавляли отдельные разведенные в два раза антитела, тщательно смешивали и инкубировали (4°C, 1 ч.). После промывки клеток добавляли конъюгат стрептавидин R-PE (Life Technology, SA10041) и инкубировали (4°C, 30 мин). После промывки клеток определяли интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитометра (Intellicyt iQue Screener). Результаты эксперимента показаны на фиг. 17: все антитела против PD-L1 YN-035, YN-036, YN-051, YN-052, YN-007 могут эффективно ингибировать связывание PD-1 человека с клетками CHO, экспрессирующими PD-L1 человека.

[00264] Связывающую активность антител против PD-1 YN-035, YN-036 и биспецифических антител против PDL1/CD137 YN-007, YN-051 и YN-052 с PD-L1 мыши определяли посредством проточной цитометрии: к 1×10^6 /мл клеток CHO, стабильно экспрессирующих PD-L1 мыши, добавляли отдельные разведенные в два раза антитела, соответственно, тщательно смешивали и инкубировали при 4°C в течение 1 ч. После промывки клеток добавляли F(ab')₂ козы против IgG-Fc человека (DyLight 650) (ab98593, Abscam) и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. После промывки клеток определяли интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитометра (Intellicyt iQue Screener). Результаты эксперимента показаны на фиг. 18: все из YN-035, YN-036, YN-051, YN-052, YN007 могут эффективно связываться с клетками CHO, экспрессирующими PD-L1 мыши.

[00265] Ингибиторную способность антител против PD-1 YN-035, YN-036 и биспецифических антител против PDL1/CD137 YN-007, YN-051 и YN-052 в отношении PD-L1 мыши/PD-1 мыши определяли посредством проточной цитометрии: PD-1-Fc мыши, меченый биотином (сульфо-NHS-LC-биотином EZ-Link, Pierce, 21327). PD-1-Fc мыши, меченый субнасыщенной концентрацией биотина, добавляли к 1×10^6 /мл клеток CHO, стабильно экспрессирующих PD-L1 мыши, а затем незамедлительно добавляли отдельные разведенные в два раза антитела, тщательно смешивали и инкубировали (4°C, 1 ч.). После промывки клеток добавляли конъюгат стрептавидин R-PE (Life Technology, SA10041) и инкубировали (4°C, 30 мин). После промывки клеток определяли интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитометра (Intellicyt iQue Screener). Результаты показаны на фиг. 19: все антитела против PD-L1 YN-035, YN-036, YN-051, YN052, YN-

007 могут эффективно ингибировать связывание PD-1 мыши с клетками CHO, экспрессирующими PD-L1 мыши.

[00266] Связывающую активность антитела против CD137 YN-006 и биспецифических антител против PD-L1/CD137 YN-007, YN-051 и YN-052 в отношении CD137 человека определяли посредством проточной цитометрии: к 1×10^6 /мл клеток 293Т, стабильно экспрессирующих CD137 человека, добавляли отдельные разведенные в два раза антитела, соответственно, тщательно смешивали и инкубировали при $4 \times C$ в течение 1 ч. После промывки клеток добавляли F(ab')₂ козы против IgG-Fc человека (DyLight 650) (ab98593, Abcam) и инкубировали при $4^\circ C$ в течение 30 мин. После промывки клеток определяли интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитометра (Intellicyt iQue Screener). Результаты эксперимента показаны на фиг. 20: все из YN-006, YN-007, YN-051 и YN-052 могут эффективно связываться с клетками 293Т, экспрессирующими CD137 человека.

ПРИМЕР 18: Анализ электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии SDS

[00267] После очистки, как описано выше, измеряли молекулярные массы антител YN-003, YN-006, YN-007, YN-035, YN-036, YN-051, YN-052 посредством электрофореза в ПААГ с SDS в восстановительных и невосстановительных условиях. Результаты показаны на фиг. 21: в невосстановительных условия (как показано на фиг. 21a) все из моноклональных антител YN-003, YN006, YN-035 и YN-036 выглядели как полоса с молекулярной массой приблизительно 150 кДа, в то время как все из биспецифических антител YN-007, YN -051, YN-052 выглядели как полоса с молекулярной массой приблизительно 200 кДа. В восстановительных условиях (как показано на фиг. 21b) все из моноклональных антител YN-003, YN006, YN-035 и YN-036 выглядели как две полосы с молекулярной массой приблизительно 55кДа и 25кДа, в то время как все из биспецифических антител YN-007, YN-051, YN-052 выглядели как две полосы с молекулярной массой приблизительно 75 кДа и 25 кДа.

ПРИМЕР 19: Агонистическая активность биспецифического антитела против PD-L1/CD137 (анализ активности люциферазы)

[00268] Получали клетки 293Т, экспрессирующие CD137 человека, и в которые стабильно встроен репортерный ген NFκB-люциферазы. Клетки собирали, промывали и ресуспендировали в полной среде без фенолового красного (среде DMEM, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку, буфер HEPES, заменимые аминокислоты и L-глутамин) при плотности 6×10^5 клеток/мл. Использовали 96-луночные планшеты (приобретенные в PerkinElmer) и в каждую лунку добавляли 50 мкл суспензии клеток. Добавляли перекрестно-сшитое антитело (антитело козы против IgG Fc человека) в соотношении 2,5:1, затем добавляли YN-006 (10 мкг/мл), YN-035 (10 мкг/мл), YN-035+YN-006 (10 мкг/мл+10 мкг/мл), YN-051 (10 мкг/мл), YN-003+YN006 (10 мкг/мл+10 мкг/мл), YN-007 (10 мкг/мл) и контрольное антитело IgG Fc (10 мкг/мл), соответственно, и инкубировали при $37^\circ C$ в течение 5 часов. Затем добавляли 75 мкл реагента люциферазы

Bright-Glo (приобретенного в Promega) и измеряли активность люциферазы с использованием спектрофотометра для чтения микропланшетов (приобретенного в Tecan). Сравнивали соотношения значений флуоресценции из каждой группы обработанных антителом клеток с группой необработанных антителом клеток (см. фиг. 22). Результаты показали, что по сравнению с контрольным IgG Fc, все из YN-006, YN035+YN006, YN003+YN006, YN-007, YN-051 имели очевидную агонистическую активность, в то время как антитело против PD-L1 YN-035 не имело ее (см. фиг. 22).

ПРИМЕР 20: Исследования противоопухолевого эффекта биспецифического антитела против PD-L1/CD137 у мышей, несущих рак толстого кишечника

[00269] В день 0 самкам мышей C57BL/6 возрастом 6-8 недель с 4-1BB человека (мышей B-hTNFRSF9 (4-1BB), приобретенных в Beijing Biocytogen Co., Ltd.) подкожно инокулировали 3×10^6 клеток колоректального рака мыши MC38 (Shanghai Linyuan Biotechnology Co., Ltd.). В день 6 мышей равномерно разделяли на 8 групп. Несущим опухоли мышам в каждой группе интраперитонеально инъецировали PBS (дважды в неделю, всего две недели), контрольное антитело IgG-Fc человека (7,5 мг/кг, дважды в неделю, всего две недели), антитело против CD137 YN-006 (3 мг/кг, дважды в неделю, всего две недели), антитело против PD-L1 YN-035 (7,5 мг/кг, дважды в неделю, всего две недели), антитело против CD137 YN-006 (3 мг/кг, дважды в неделю, всего две недели) + антитело против PD-L1 YN-035 (7,5 мг/кг, дважды в неделю, всего две недели), биспецифическое антитело против PDL1/CD137 YN-051 (7,5 мг/кг, дважды в неделю, всего две недели), антитело против PD-L1 атезолизумаб (7,5 мг/кг, дважды в неделю, всего две недели) и антитело против PD-L1 авелумаб (7,5 мг/кг, дважды в неделю, всего две недели), соответственно. За исключением группы PBS, включавшей 5 мышей, каждая из остальных 7 групп включала 6 мышей. Мышей в каждой группе регулярно обследовали на предмет изменения массы тела и размера опухоли. Результаты эксперимента показаны на фиг. 23 и в таблице 12. На фиг. 23 показано, что все из YN006, YN035, YN006+YN035, YN051, атезолизумаба и авелумаба имели значительную противоопухолевую активность по сравнению с группой PBS или группой контрольного антитела IgG-Fc человека. Среди них, противоопухолевая активность YN006+YN035 и YN051 была значительно выше, чем у YN006, YN035, атезолизумаба и авелумаба. В таблице 12 показано, что к концу эксперимента на животных у 5 мышей в группе YN051 опухоли полностью регрессировали, в то время как только у 1 мыши в группе YN006+YN035 опухоли полностью регрессировали, что свидетельствует о том, что терапевтический эффект YN051 был лучше, чем у YN006+YN035.

Таблица 12. Количество мышей в каждой группе, у которых опухоли полностью исчезли

Антитело	Количество мышей, у которых опухоли полностью исчезли/общее количество экспериментальных животных в каждой группе
----------	---

PBS	0/5
IgG1-Fc человека	0/6
Атезолизумаб	0/6
Авелумаб	0/6
YN-006	0/6
YN-035	1/6
YN-006+YN-035	1/6
YN-051	5/6

Изложенное выше подробное описание представлено в виде объяснения и примеров и не предназначено для ограничения объема формулы изобретения. В настоящее время различные изменения вариантов осуществления, приведенных в настоящем описании, очевидны специалистам в этой области и входят в объем формулы изобретения и ее эквивалентов.

1. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, связывающееся с белком PD-L1 с $K_D 3 \times 10^{-9}$ М или менее.

2. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по п.1, где указанное антитело содержит легкую цепь антитела или ее фрагмент, содержащую LCDR1, и указанная LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53: TGTX₁SX₂VGGYX₃X₄VS; где X₁ является S, R или V; X₂ является D, E или S; X₃ является N или R; X₄ является Y или E, и где указанную LCDR1 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat.

3. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по п.2, где указанная LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54-58.

4. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.1-3, где указанная легкая цепь антитела или ее фрагмент содержит LCDR2, и указанная LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59: X₁NSX₂RPS, где X₁ является G или E; X₂ является N или I, и где указанную LCDR2 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat.

5. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по п.4, где указанная LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 60-61.

6. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.1-5, где указанная легкая цепь антитела или ее фрагмент содержит LCDR3, и указанная LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62: QSYDSSLGX₁V, где X₁ является S или T, и где указанная LCDR3 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat.

7. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.1-6,

где указанная легкая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно содержит каркасные области L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4.

8. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по п.7, где указанные каркасные области выбраны из группы, состоящей из консенсусных каркасных последовательностей человека и последовательностей зародышевой линии человека.

9. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.7-8, где С-конец указанной L-FR1 прямо или косвенно связан с N-концом указанной LCDR1, и указанная L-FR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 71.

10. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.7-9, где указанная L-FR2 находится между указанной LCDR1 и указанной LCDR2, и указанная L-FR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 72.

11. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.7-10, где указанная L-FR3 находится между указанной LCDR2 и указанной LCDR3, и указанная L-FR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73-75.

12. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.7-11, где N-конец указанной L-FR4 прямо или косвенно связан с С-концом указанной LCDR3, и указанная L-FR4 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 76.

13. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.2-12, где указанная легкая цепь антитела или ее фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи VL, и указанная вариабельная область легкой цепи VL содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 41.

14. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.2-13, где указанная легкая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно содержит константную область человека, и указанная константная область человека содержит константную область IgL человека.

15. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.2-14, где указанная легкая цепь антитела или ее фрагмент содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 42.

16. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.1-15, где указанное антитело содержит тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, содержащую HCDR1, и указанная HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 45: X₁Y AIS, где X₁ является S или T, и где указанная HCDR1 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat.

17. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по п.16, где

указанная тяжелая цепь антитела или ее фрагмент содержит HCDR2, указанная HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48, и где указанную HCDR2 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat.

18. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.16-17, где указанная тяжелая цепь антитела или ее фрагмент содержит HCDR3, и указанная HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49: $TMX_1X_2YX_3X_4GNX_5DY$, где X_1 является D, E или G, X_2 является G или E, X_3 является S или G, X_4 является Y или F, X_5 является F или Y, и где указанную HCDR3 определяют в соответствии с индексом нумерации антител Kabat.

19. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по п.18, где указанная HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50-52.

20. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.16-19, где указанная тяжелая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно содержит каркасные области H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4.

21. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по п.20, где указанные каркасные области выбраны из группы, состоящей из консенсусных каркасных последовательностей человека или последовательностей зародышевой линии человека.

22. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.20-21, где С-конец указанной H-FR1 прямо или косвенно связан с N-концом указанной HCDR1, и указанная H-FR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 65-67.

23. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.20-22, где указанная H-FR2 находится между указанной HCDR1 и указанной HCDR2, указанная H-FR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 68.

24. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.20-23, где указанная H-FR3 находится между указанной HCDR2 и указанной HCDR3, указанная H-FR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 69.

25. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.20-24, где N-конец указанной H-FR4 прямо или косвенно связан с С-концом указанной HCDR3, указанная H-FR4 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70.

26. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.16-25, где указанная тяжелая цепь антитела или ее фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи VH, и указанная вариабельная область тяжелой цепи VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 31 и SEQ ID NO: 35.

27. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.16-

26, где указанная тяжелая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно содержит константную область человека, и указанная константная область человека содержит константную область IgG1 человека.

28. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.16-27, где указанная тяжелая цепь антитела или ее фрагмент содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 36.

29. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.1-28, где указанный белок PD-L1 выбран из группы, состоящей из белка PD-L1 человека и белка PD-L1 мыши.

30. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант, связывающееся с белком CD137 с K_D 5×10^{-9} М или менее.

31. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по п.30, связывающееся с белком CD137 с K_D 3×10^{-9} М или менее.

32. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.30-31, способное приводить к облегчению или лечению опухолей.

33. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по п.32, где указанная опухоль включает рак толстого кишечника.

34. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.30-33, где указанное антитело содержит легкую цепь антитела или ее фрагмент.

35. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по п.34, где указанная легкая цепь или ее фрагмент содержит LCDR1-3, аминокислотные последовательности указанной LCDR1-3 последовательно приведены в SEQ ID NO: 80-82.

36. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.34-35, где указанная легкая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно содержит каркасные области L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4.

37. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по п.36, где указанные каркасные области выбраны из группы, состоящей из консенсусных каркасных последовательностей человека или последовательностей зародышевой линии человека.

38. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.36-37, где С-конец указанной L-FR1 прямо или косвенно связан с N-концом указанной LCDR1, указанная L-FR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89.

39. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.36-38, где указанная L-FR2 находится между указанной LCDR1 и указанной LCDR2, указанная L-FR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90.

40. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.38-39, где указанная L-FR3 находится между указанной LCDR2 и указанной LCDR3, указанная L-FR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID

NO: 91.

41. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.38-40, где N-конец указанной L-FR4 прямо или косвенно связан с C-концом указанной LCDR3, указанная L-FR4 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 92.

42. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.34-41, где указанная легкая цепь антитела или ее фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи VL, и указанная вариабельная область легкой цепи VL содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20.

43. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.34-42, где указанная легкая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно содержит константную область человека, и указанная константная область человека содержит константную область Ig λ человека.

44. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.34-43, где указанная легкая цепь антитела или ее фрагмент содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23.

45. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.30-44, где указанное антитело содержит тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, где указанная тяжелая цепь или ее фрагмент содержит HCDR1-3, и аминокислотные последовательности указанной HCDR1-3 последовательно приведены в SEQ ID NO: 77-79.

46. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по п.45, где указанная тяжелая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно содержит каркасные области H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4.

47. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.46, где указанные каркасные области выбраны из группы, состоящей из консенсусных каркасных последовательностей человека или последовательностей зародышевой линии человека.

48. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.46-47, где C-конец указанной H-FR1 прямо или косвенно связан с N-концом указанной HCDR1, указанная H-FR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 84-85.

49. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.46-48, где указанная H-FR2 находится между указанной HCDR1 и указанной HCDR2, указанная H-FR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86.

50. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.46-49, где указанная H-FR3 находится между указанной HCDR2 и указанной HCDR3, указанная H-FR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87.

51. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.46-

50, где N-конец указанной H-FR4 прямо или косвенно связан с C-концом указанной HCDR3, указанная H-FR4 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 88.

52. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.46-51, где указанная тяжелая цепь антитела или ее фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи VH, и указанная вариабельная область тяжелой цепи VH содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 25.

53. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.45-52, где указанная тяжелая цепь антитела или ее фрагмент дополнительно содержит константную область человека, и указанная константная область человека содержит константную область IgG человека.

54. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.45-53, где указанная тяжелая цепь антитела или ее фрагмент содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 27.

55. Антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.30-54, где указанный белок CD137 содержит белок CD137 человека.

56. Биспецифическое антитело, связывающееся с белком PD-L1 с K_D 2×10^{-9} М или менее и связывающееся с белком CD137 с K_D 8×10^{-9} М или менее.

57. Биспецифическое антитело по п.56, содержащее первый нацеливающий фрагмент, специфически связывающийся с указанным белком PD-L1, где указанный первый нацеливающий фрагмент содержит антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.1-29.

58. Биспецифическое антитело по любому из пп.56-57, содержащее второй нацеливающий фрагмент, специфически связывающийся с указанным белком CD137, где указанный второй нацеливающий фрагмент содержит антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.30-55.

59. Биспецифическое антитело по любому из пп.57-58, где указанное антитело, связывающееся с белком CD137, содержит scFv, и указанный scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 83.

60. Биспецифическое антитело по любому из пп.56-59, содержащее первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где указанная первая полипептидная цепь содержит указанную вариабельную область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, указанную вариабельную область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, и указанную вариабельную область легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137; и указанная вторая полипептидная цепь содержит указанную вариабельную область легкой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1.

61. Биспецифическое антитело по п.60, где в указанной первой полипептидной

цепи указанная переменная область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, находится на N-конце указанной переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, и указанная переменная область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, находится на N-конце указанной переменной области легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137; альтернативно, указанная переменная область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, находится на N-конце указанной переменной области легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, и указанная переменная область легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, находится на N-конце указанной переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137.

62. Биспецифическое антитело по любому из пп.60-61, где указанная переменная область легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, и указанная переменная область тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137, в первой полипептидной цепи составляет scFv.

63. Биспецифическое антитело по любому из пп.60-62, где указанная первая полипептидная цепь дополнительно содержит константную область IgG человека, и указанная константная область IgG человека находится на C-конце указанной переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, и находится на N-конце указанной переменной области легкой цепи антитела, связывающегося с белком CD137; альтернативно, указанная константная область IgG человека находится на C-конце указанной переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком PD-L1, и находится на N-конце указанной переменной области тяжелой цепи антитела, связывающегося с белком CD137.

64. Биспецифическое антитело по любому из пп.60-63, где указанная первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44.

65. Биспецифическое антитело по любому из пп.60-64, где указанная вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 34.

66. Одна или более выделенных молекул нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.1-29, антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.30-55 или биспецифическое антитело по любому из пп.56-65.

67. Вектор, содержащий указанную молекулу нуклеиновой кислоты по п.66.

68. Клетка, содержащая указанную молекулу нуклеиновой кислоты по п.66 или указанный вектор по п.67.

69. Способ получения указанного антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из пп.1-29, указанного антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из пп.30-55 или указанного биспецифического антитела по любому из пп.56-65, включающий культивирование клетки по п.68 в

условиях, делающих возможной экспрессию указанного антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из пп.1-29, указанного антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из пп.30-55 или указанного биспецифического антитела по любому из пп.56-65.

70. Фармацевтическая композиция, содержащая указанное антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.1-29, указанное антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или вариант по любому из пп.30-55 или указанное биспецифическое антитело по любому из пп.56-65, указанную молекулу нуклеиновой кислоты по п.66, указанный вектор по п.67 и/или указанную клетку по п.68 и, необязательно, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

71. Применение указанного антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из пп.1-29, указанного антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из пп.30-55 или указанного биспецифического антитела по любому из пп.56-65, указанной молекулы нуклеиновой кислоты по п.66, указанного вектора по п.67, указанной клетки по п.68 и/или указанной фармацевтической композиции по п.70 в производстве лекарственного средства для облегчения или лечения опухолей.

72. Способ ингибирования связывания белка PD-L1 с белком PD-1, включающий введение указанного антитела, его антигенсвязывающего фрагмента или варианта по любому из пп.1-29, или указанного биспецифического антитела по любому из пп.56-65, указанной молекулы нуклеиновой кислоты по п.66, указанного вектора по п.67, указанной клетки по п.68 и/или указанной фармацевтической композиции по п.70.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с белком CD137, содержащий вариабельную область легкой цепи VL, которая содержит LCDR1-3 и вариабельную область тяжелой цепи VH, которая содержит HCDR1-3, где аминокислотные последовательности указанных LCDR1-3 последовательно представлены в SEQ ID NO: 80-82, и аминокислотные последовательности указанных HCDR1-3 последовательно представлены в SEQ ID NO: 77-79.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где указанная вариабельная область легкой цепи VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, и указанная вариабельная область тяжелой цепи VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 25.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-2, включающее легкую цепь и тяжелую цепь, где указанная легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, и указанная тяжелая цепь или ее фрагмент содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 27.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, которое имеет CD137-агонистическую активность.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, где указанное антитело выбрано из группы, состоящей из моноклонального антитела, одноцепочечного антитела, химерного антитела, гуманизированного антитела и полностью человеческого антитела; где указанный said антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab)₂ и Fv-фрагмента.

6. Биспецифическое антитело, содержащее первый нацеливающий фрагмент, который специфически связывается с белком PD-L1, и второй нацеливающий фрагмент, который специфически связывается с белком CD137, где указанный второй нацеливающий фрагмент включает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5.

7. Одна или более выделенных молекул нуклеиновой кислоты, которые кодируют антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, или биспецифическое антитело по п. 6.

8. Вектор, который включает указанную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 7.

9. Клетка, которая включает указанную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 7 или указанный вектор по п. 8.

10. Фармацевтическая композиция, включающая указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, или указанное биспецифическое антитело по п. 6, указанную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 7, указанный вектор по п. 8 и/или указанную клетку по п. 9, и фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

11. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.

1-5, или биспецифического антитела по п. 6, или фармацевтической композиции по п. 10 в производстве лекарственного средства для лечения опухолей.

По доверенности

ФИГ.1

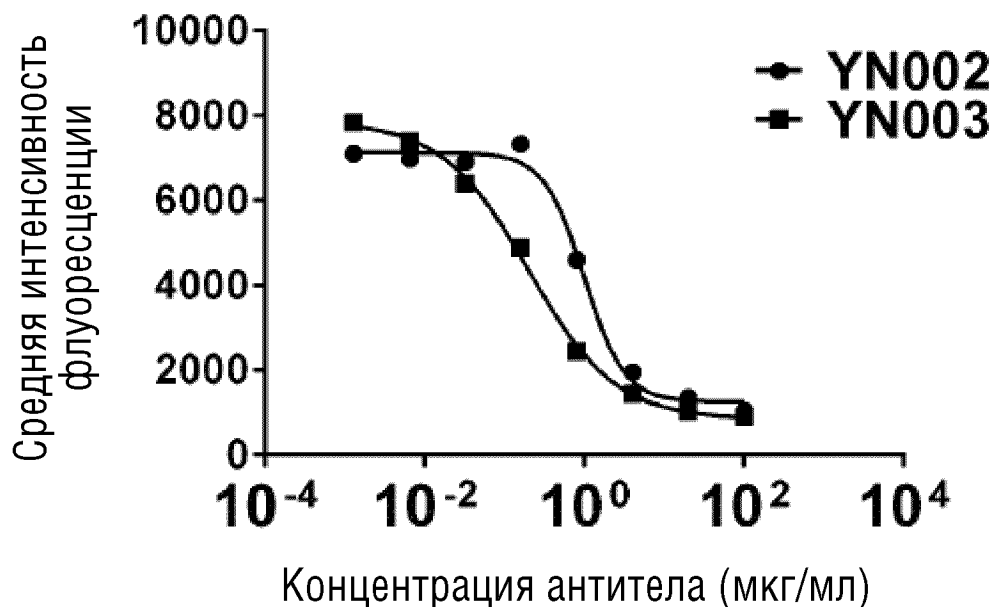
Вариабельная область тяжелой цепи (CDR подчеркнуты)

IGHV1-69 зародышевой линии	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILG</u> <u>IANYA</u> <u>QKFOGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR---</u> <u>GYSYGNFDYWGQ</u> <u>GLTVTVSS</u>
YN-002VH	<u>QVQLVQSGAEV</u> R <u>KPGSSVKV</u> <u>SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILG</u> <u>IANYA</u> <u>QKFOGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR</u> TMD <u>GYSYGNFDYWGQ</u> <u>GLTVTVSS</u>
YN-003VH	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILG</u> <u>IANYA</u> <u>QKFOGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR</u> TMD <u>GYSYGNFDYWGQ</u> <u>GLTVTVSS</u>

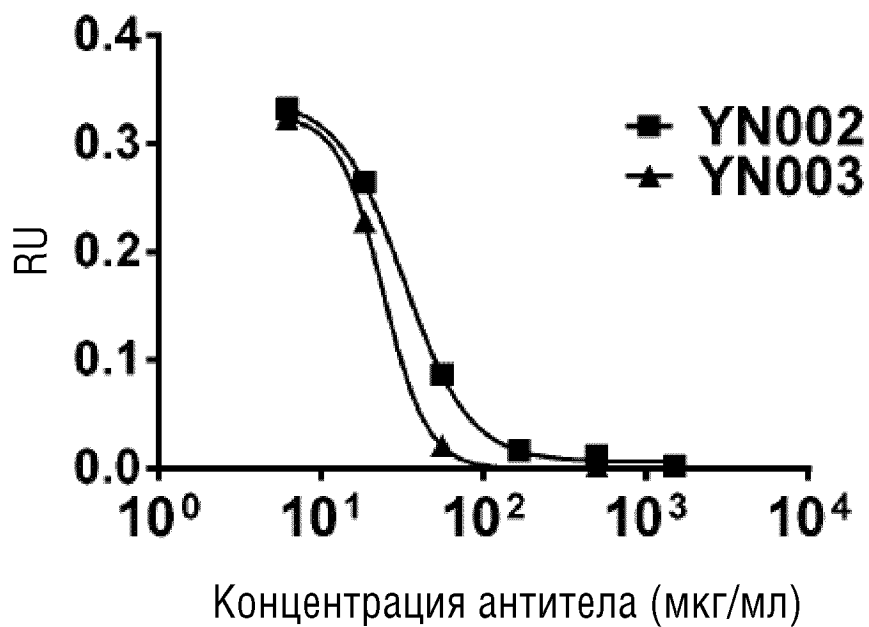
Вариабельная область легкой цепи (CDR подчеркнуты)

IGLV2-14 зародышевой линии	<u>QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSNRPSGV</u> <u>SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSS----</u> <u>VFGGGTKLTVLG</u>
YN-002VL	<u>QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLLI</u> YGN <u>SNRPSGV</u> PDR <u>FSGSKSGT</u> TSASLAIT <u>GLQAEDEADYYC</u> QSYDSSL SGSV <u>VFGGGTKLTVLG</u>
YN-003VL	<u>QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSNRPSGV</u> <u>SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC</u> QSYDSSL SGSV <u>VFGGGTKLTVLG</u>

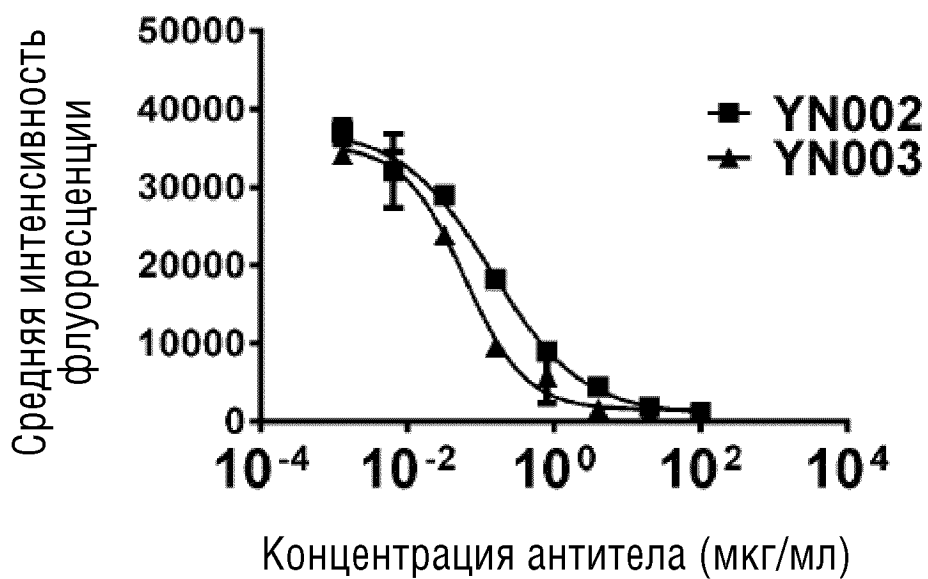
ФИГ.2



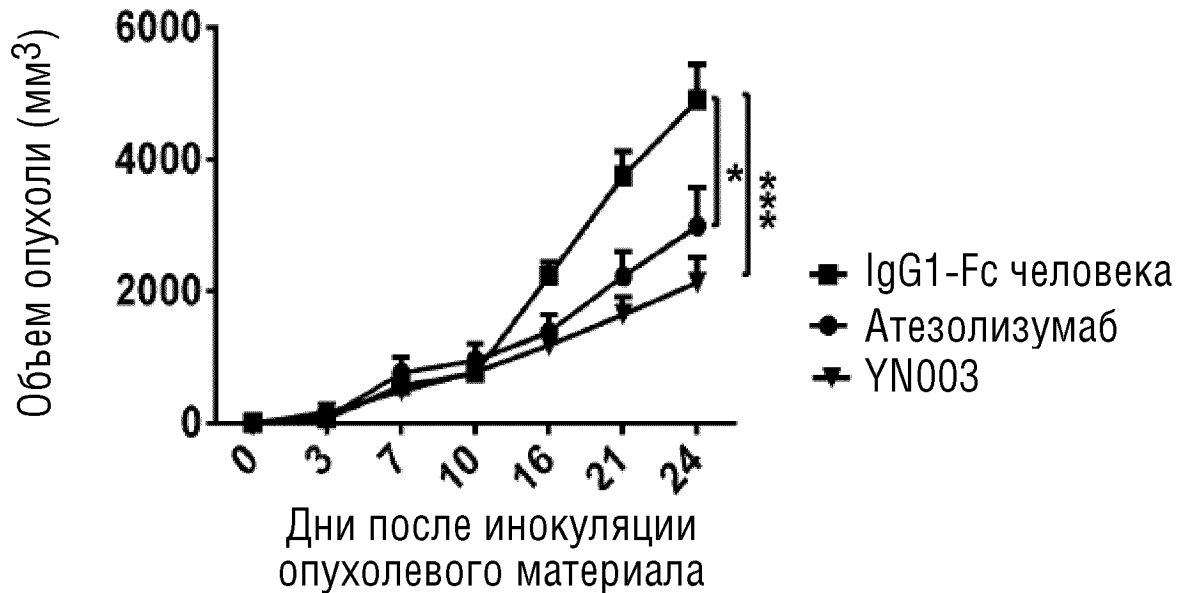
ФИГ.3



ФИГ.4



ФИГ.5



ФИГ.6

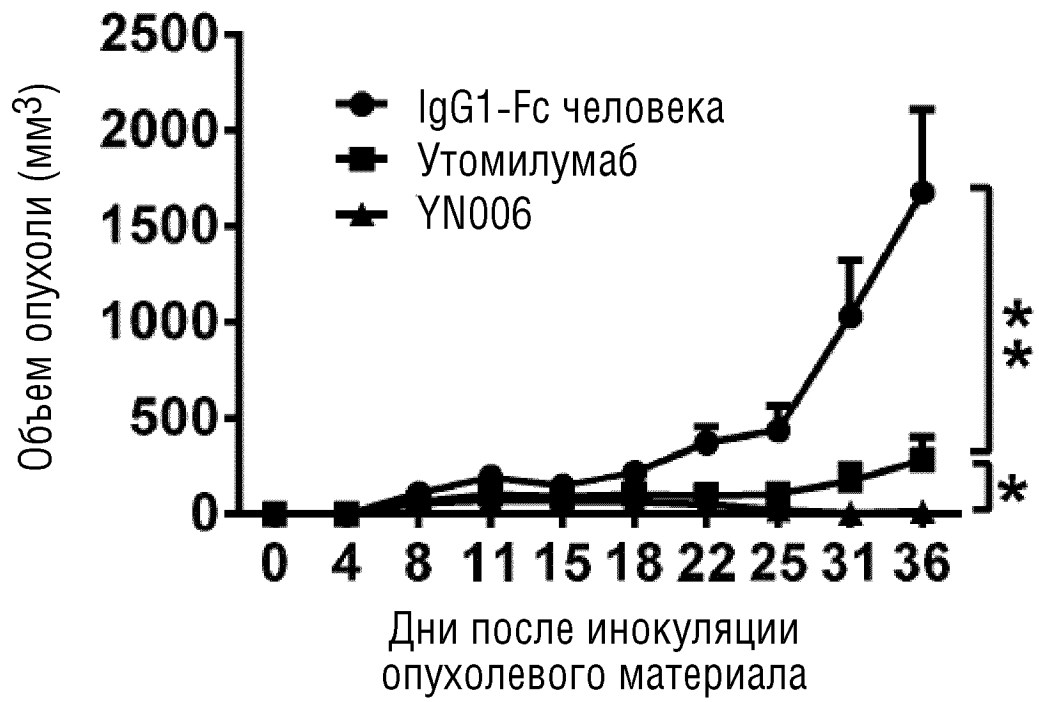
Вариабельная область тяжелой цепи (CDR подчеркнуты)

IGHV 3-23 зародышевой линии	<u>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS</u> <u>CAASGFTFSSYAMS</u> <u>WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAD</u> <u>SVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCAKTNWG--DAFDIWGQGTMTV</u> <u>VSS</u>
YN-005VH	<u>QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLS</u> <u>CAASGFTFSSYAMS</u> <u>WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAD</u> <u>SVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCAKTNWGP</u> <u>SDAFDIWGQGTMTV</u> <u>VSS</u>
YN-006VH	<u>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS</u> <u>CAASGFTFSSYAMS</u> <u>WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAD</u> <u>SVKGRFTISRDN</u> <u>SKNTLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCAKTNWGP</u> <u>SDAFDIWGQGTMTV</u> <u>VSS</u>

Вариабельная область легкой цепи (CDR подчеркнуты)

IGLV1-44 зародышевой линии	<u>QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNORPSGVPDR</u> <u>FSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGTGKLT</u> <u>VLG</u>
YN-005VL	<u>QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSG</u> <u>STSDIGSY</u> <u>SNWYQQLPGTAPKLLIYSNNORPSGVPDR</u> <u>FSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGTGKLT</u> <u>VLG</u>
YN-006VL	<u>QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSG</u> <u>STSDIGSY</u> <u>SNWYQQLPGTAPKLLIYSNNORPSGVPDR</u> <u>FSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGTGKLT</u> <u>VLG</u>

ФИГ.7



ФИГ.8

Вариабельная область тяжелой цепи (CDR подчеркнуты)

IGHV1-69 зародышевой линии QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKCAKSGTFS⁵¹YAI⁵²SWVRQRFQCGLEMMGRIPILGIAN⁵³YAQKFKQGRVTITADKSTSTAYMELSLRSED⁵⁴TAVYYC⁵⁵AR⁵⁶---GYSYGNFDYWGQGTLLVTVSS
YN003VH QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKCAKSGTFS⁵¹YAI⁵²SWVRQRFQCGLEMMGRIPILGIAN⁵³YAQKFKQGRVTITADKSTSTAYMELSLRSED⁵⁴TAVYYC⁵⁵AR⁵⁶TMDGYSYGNFDYWGQGTLLVTVSS

5/15

Вариабельная область легкой цепи (CDR подчеркнуты)

IGLV2-14 зародышевой линии QSALTQPA¹SVSGSPGQSIITISCTGTSSDYGGY²NSWYQQHPGKAPK³LM⁴YEVS⁵NRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD⁶YCYSSYTSS⁷---VFGGGTKLTVIG
YN003VL QSALTQPA¹SVSGSPGQSIITISCTGTSSDYGGY²NSWYQQHPGKAPK³LM⁴GNSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEAD⁶YCY⁷QSYDSSLSGSVFGGGTKLTVIG

ФИГ.9

Вариабельная область тяжелой цепи (CDR подчеркнуты)

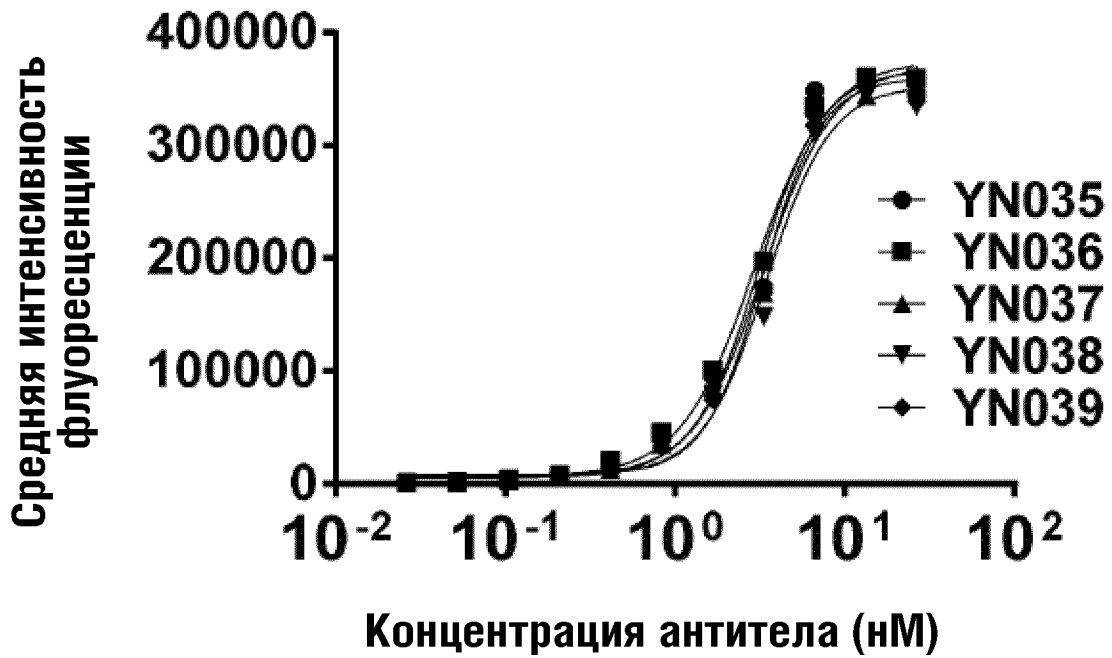
IGHV1-69 зародышевой линии QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIPILGIANYAOKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR---GISIGNFDYWGQGITLVTVSS
YN033VH QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIPILGIANYAOKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**TMDC**GISIGNFDYWGQGITLVTVSS
YN035VH QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASRGPESTYIAISWVRQAPGQGLEWMGRIPILGIANYAOKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**TMDE**GISIGNFDYWGQGITLVTVSS
YN036VH QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASRGPESTYAISWVRQAPGQGLEWMGRIPILGIANYAOKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**TMGE**YSIGNYDYNWGQGITLVTVSS
YN037VH QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASRGPESTYAISWVRQAPGQGLEWMGRIPILGIANYAOKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**TMGE**YSIGNYDYNWGQGITLVTVSS
YN038VH QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASRGPESTYAISWVRQAPGQGLEWMGRIPILGIANYAOKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**TMGE**YSIGNYDYNWGQGITLVTVSS
YN039VH QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASRGPESTYAISWVRQAPGQGLEWMGRIPILGIANYAOKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR**TMGE**YSIGNYDYNWGQGITLVTVSS

ФИГ.10

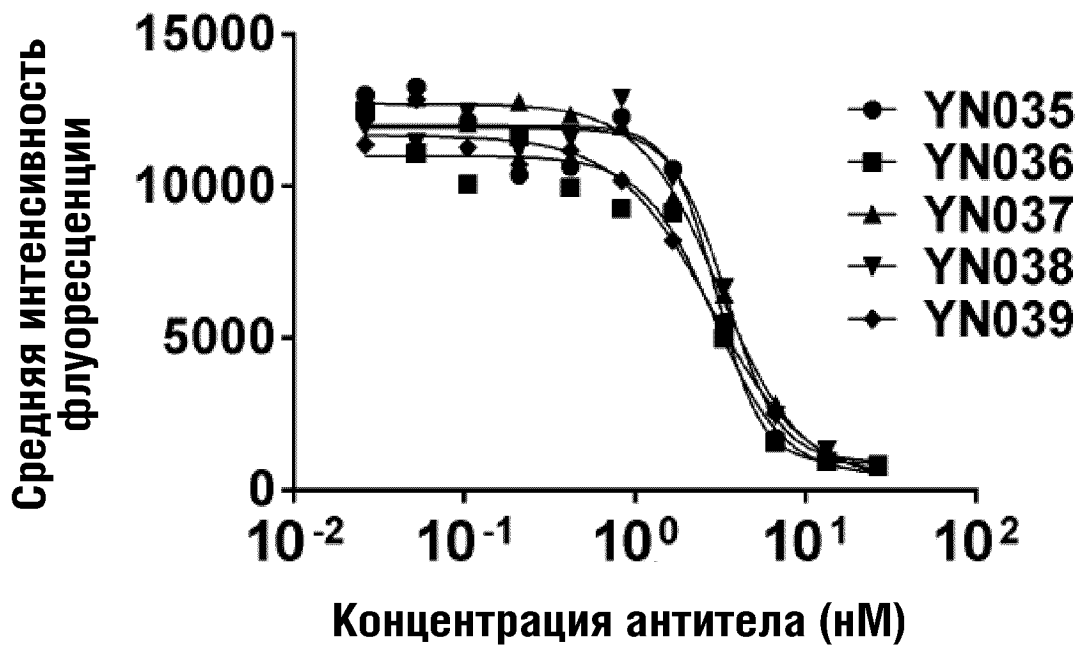
IGLV2-14 зародышевой линии

YN035VL	QSALTQPASVSGSPGQSIITISCTGTSSDYGGYVSWYQQHPGKAPKLMIEVSNRPPSGVSNRFGSKSGNTASLTIISGLQAEDEADYCCSSYTSS--VFEGGTKLTVLG
YN036VL	QSALTQPASVSGSPGQSIITISCTGTSSDYGGYVSWYQQHPGKAPKLMIYGNRNPPSGVSNRFGSKSGNTASLTIISGLQAEDEADYCCQSYDSSLSGSVFGGKTLTVLG
YN037VL	QSALTQPASVSGSPGQSIITISCTGTVEYGGYNEVSWYQQHPGKAPKLMIYGNRNPPSGVSNRFGSKSGNTASLTIISGLQAEDEADYCCQSYDSSLSGTVFGGKTLTVLG
YN038VL	QSALTQPASVSGSPGQSIITISCTGTVEYGGYNEVSWYQQHPGKAPKLMIYGNRNPPSGVSNRFGSKSGNTASLTIISGLQAEDEADYCCQSYDSSLSGTVFGGKTLTVLG
YN039VL	QSALTQPASVSGSPGQSIITISCTGTSSDYGGYREVSWYQQHPGKAPKLMIYENSIRPPSGVSNRFGSKSGNTASLTIISGLQAEDEADYCCQSYDSSLSGTVFGGKTLTVLG
YN039VL	QSALTQPASVSGSPGQSIITISCTGTRSDYGGYNEVSWYQQHPGKAPKLMIYENSIRPPSGVSNRFGSKSGNTASLTIISGLQAEDEADYCCQSYDSSLSGTVFGGKTLTVLG
YN039VL	QSALTQPASVSGSPGQSIITISCTGTVSDYGGYNEVSWYQQHPGKAPKLMIYENSIRPPSGVSNRFGSKSGNTASLTIISGLQAEDEADYCCQSYDSSLSGTVFGGKTLTVLG

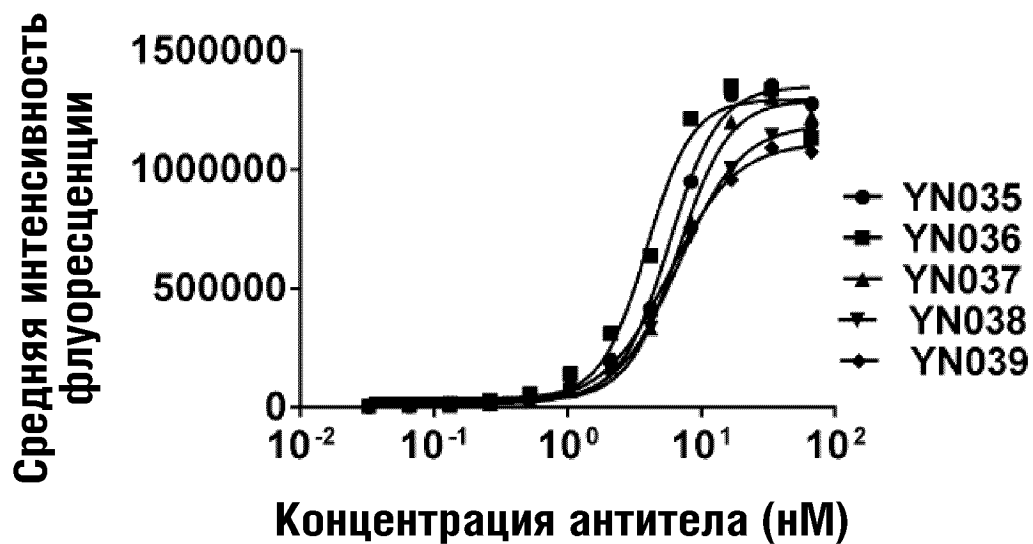
ФИГ.11



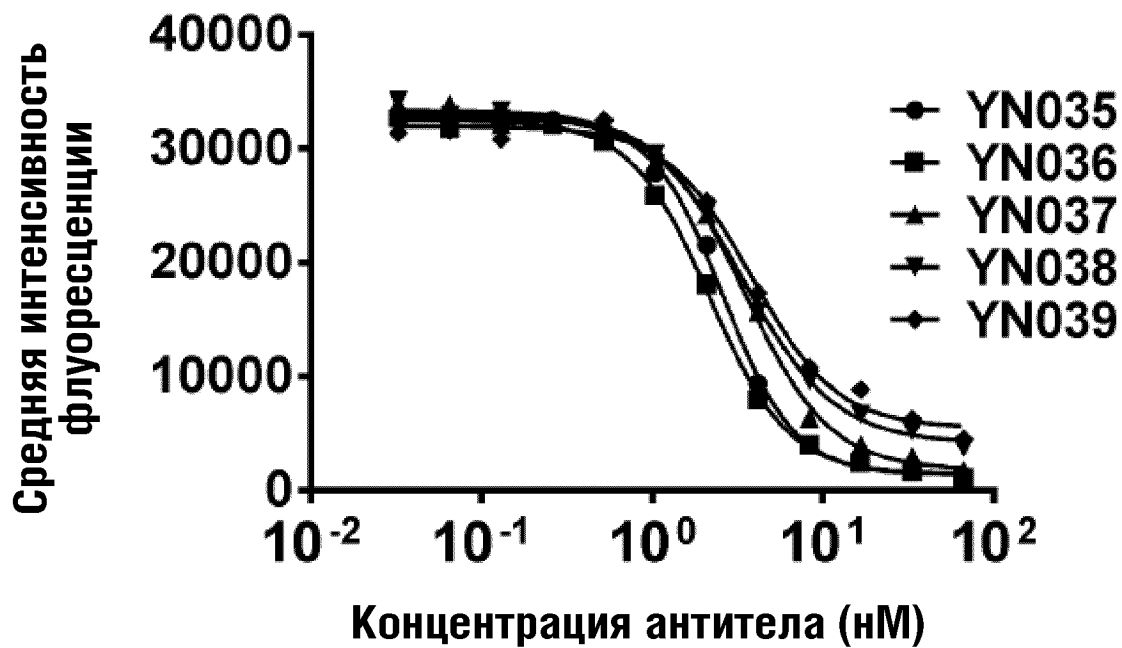
ФИГ.12



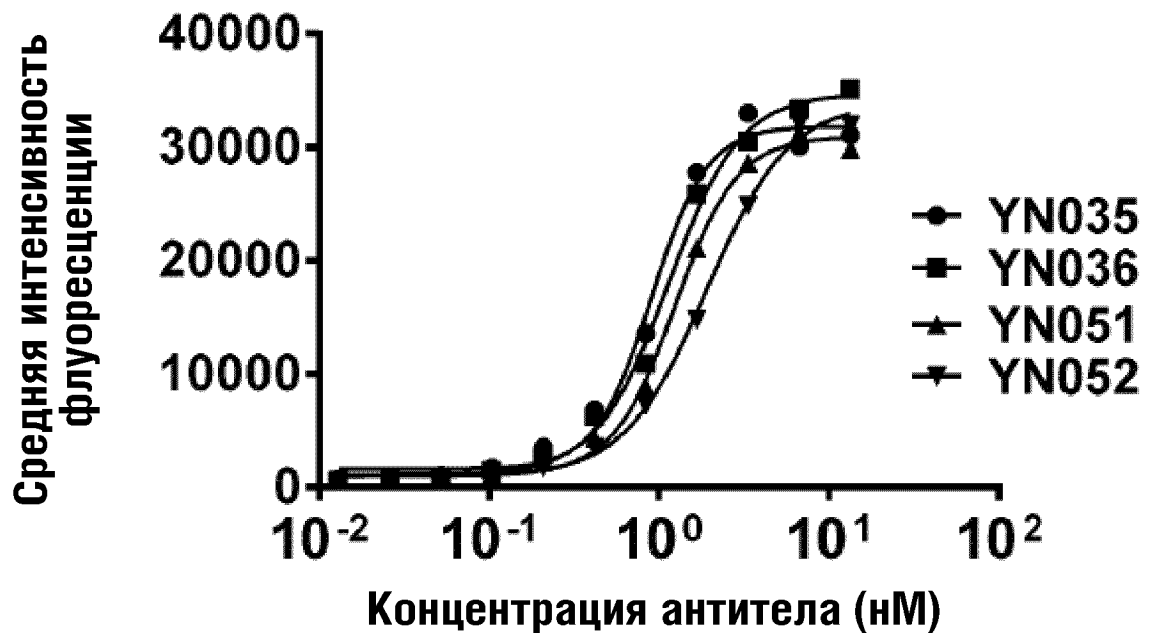
ФИГ.13



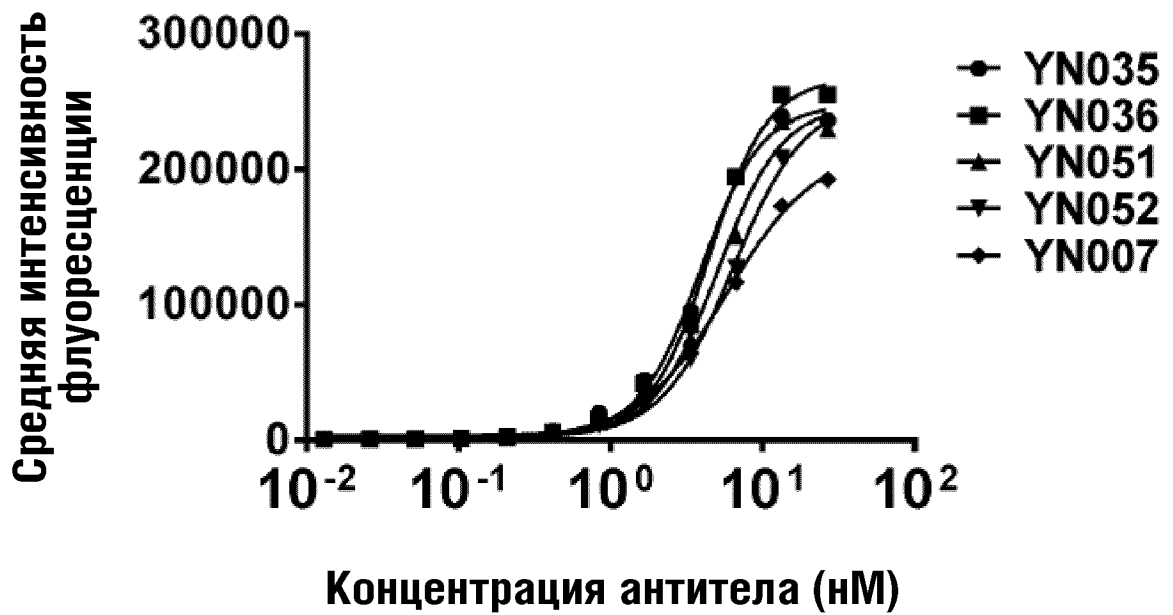
ФИГ.14



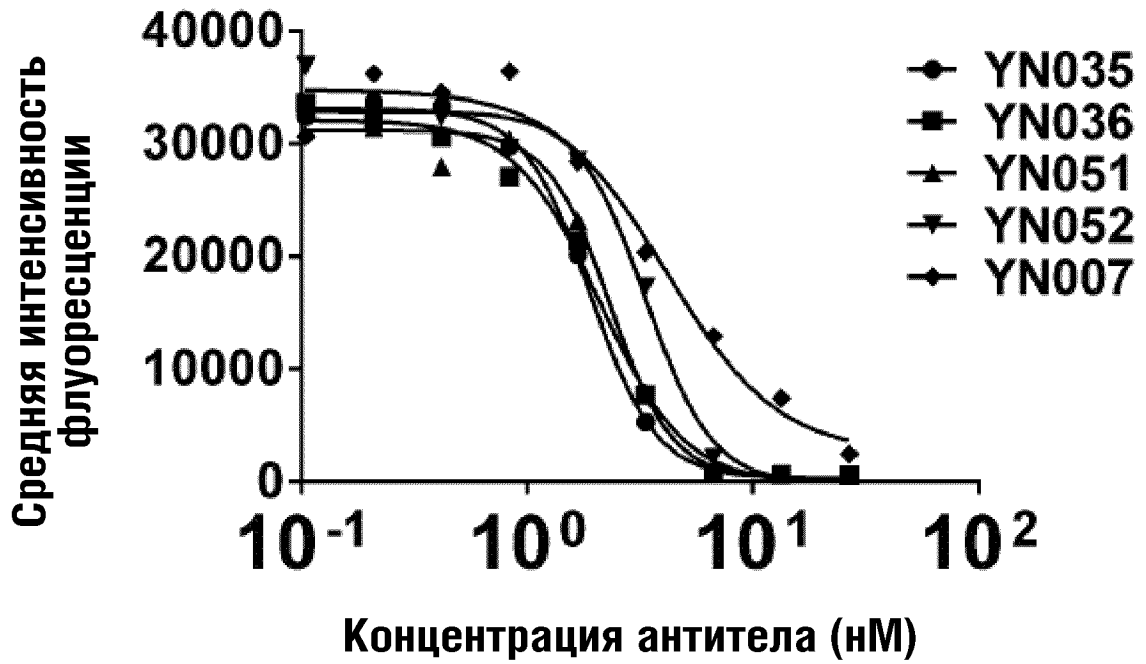
ФИГ.15



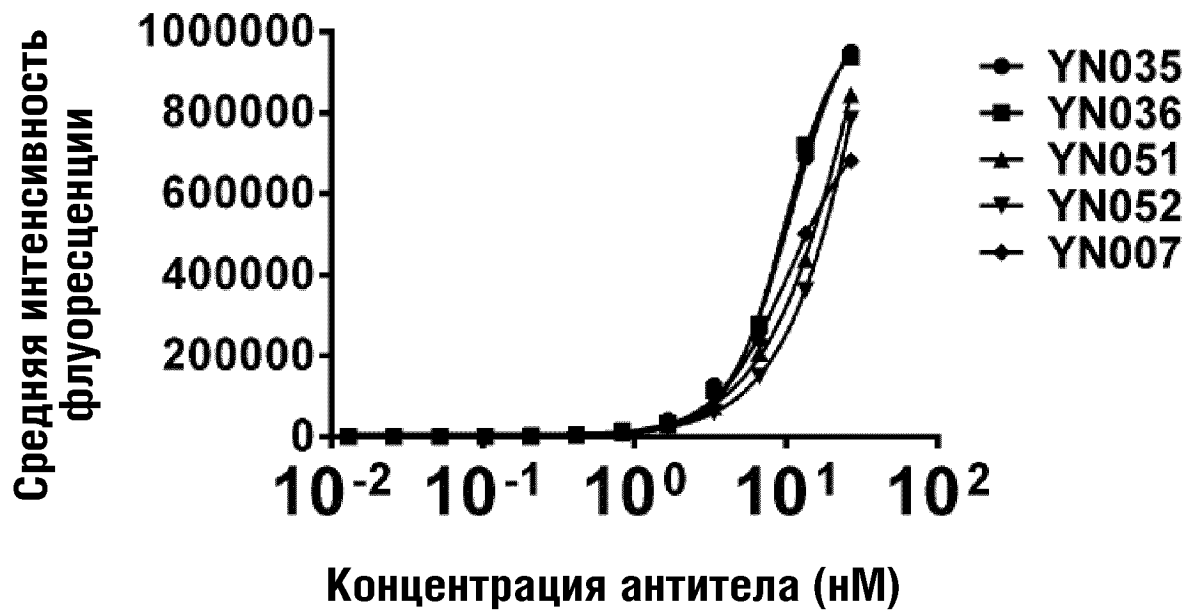
ФИГ.16



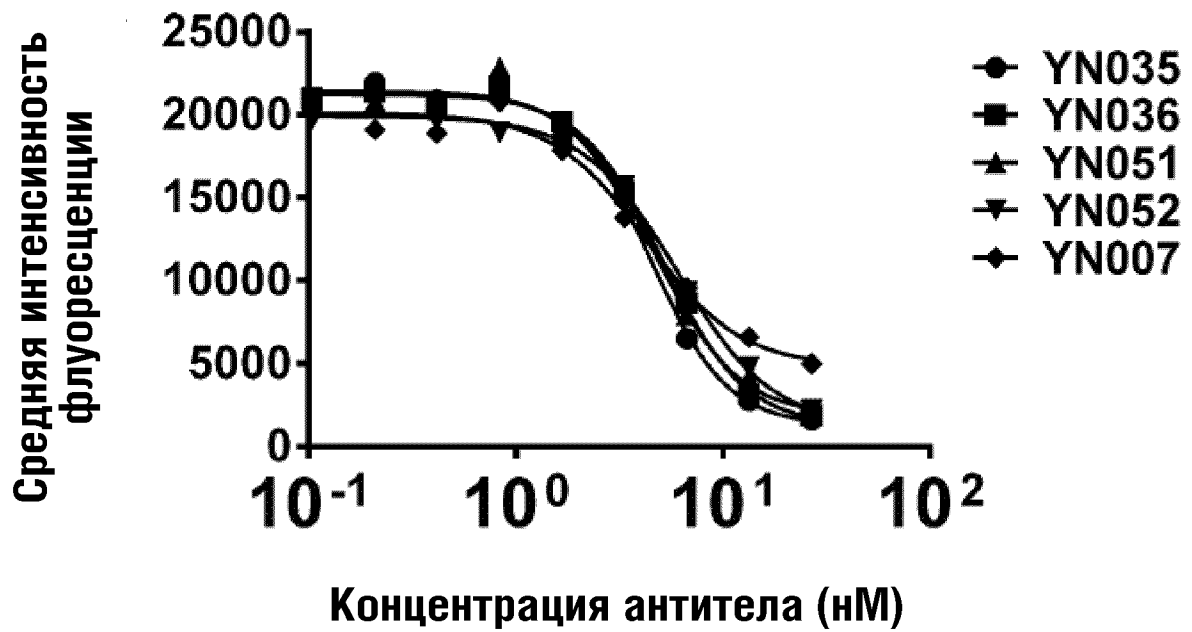
ФИГ.17



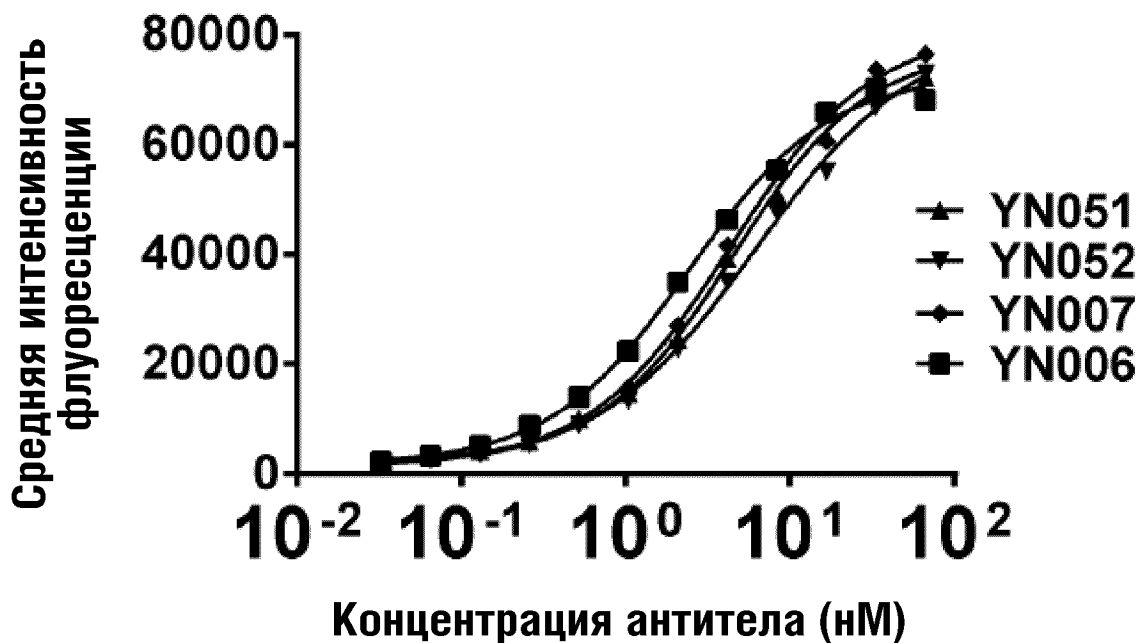
ФИГ.18



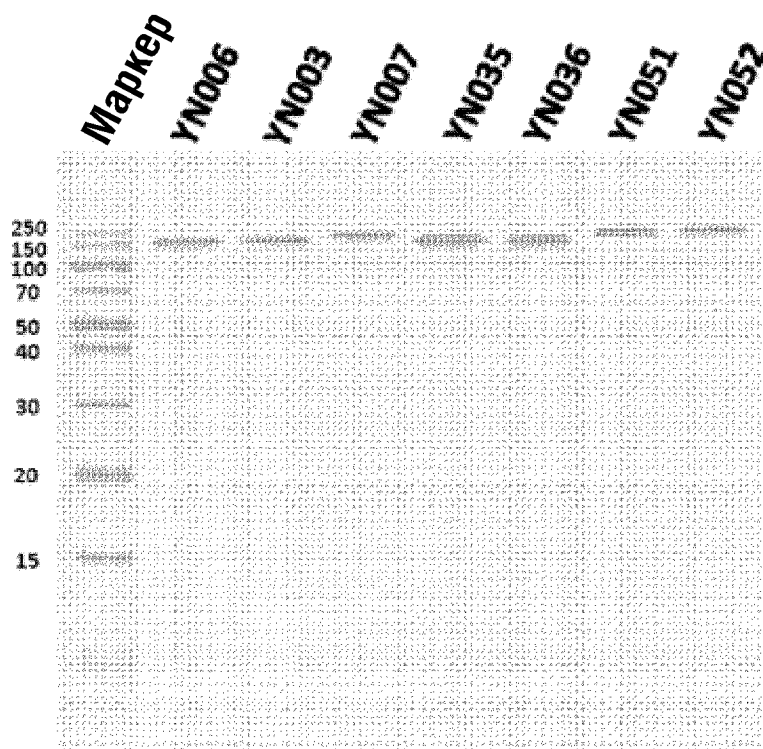
ФИГ.19



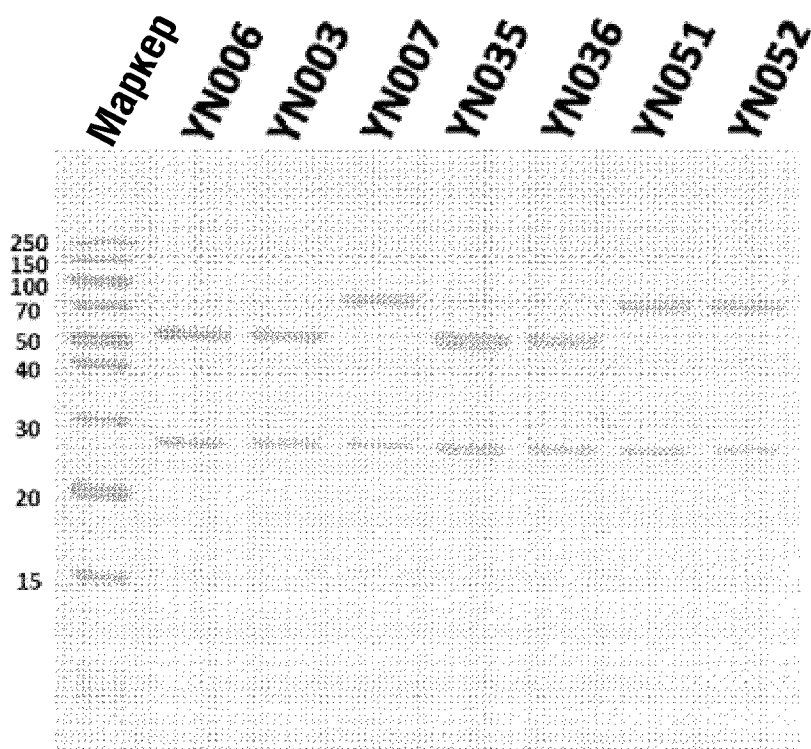
ФИГ.20



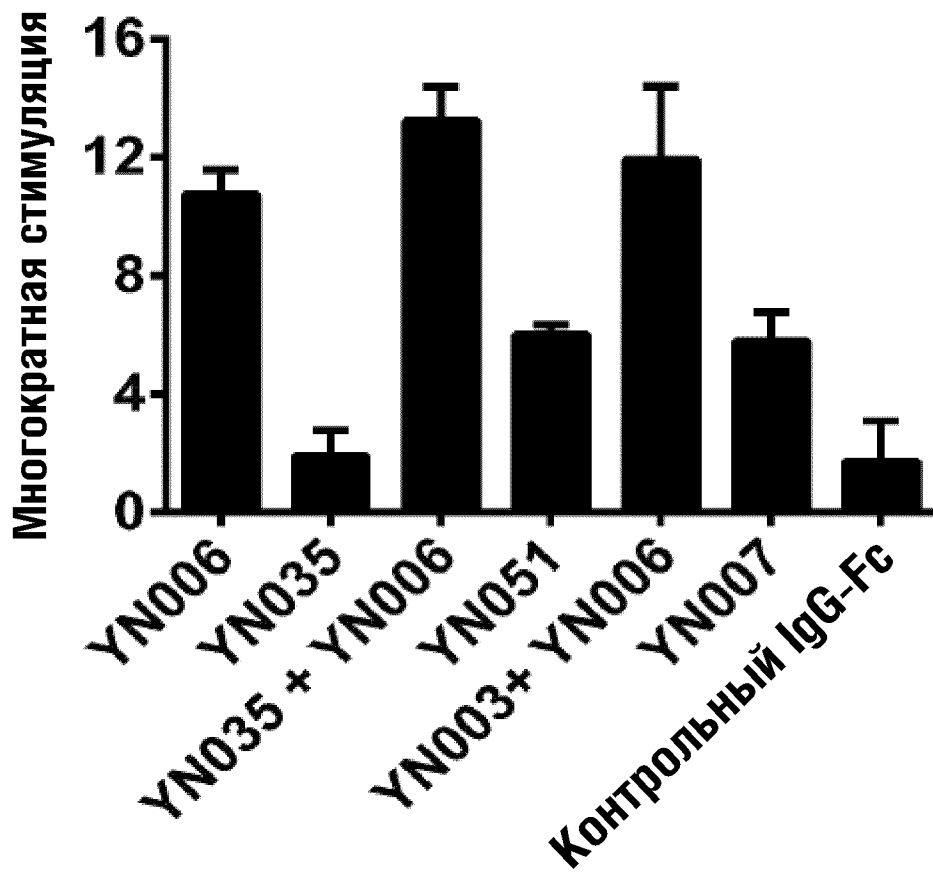
ФИГ.21а



ФИГ.21б



ФИГ.22



ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202391538А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

C07K 16/28, C12N 15/13, C12N 15/63, C12N 5/10, A61K 39/395, A61P 35/00, C12N 15/09

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, EAPATIS, Google, PATENTSCOPE, NCBI, EMBL-EBI, PubMed, USPTO, ScienceDirect, E-Library

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2012032433 A1 (PFIZER INC et al.) 2012-03-15 формула, с.36, строки 6-15, с.37, строки 30-31, с.39, строки 31-33, с.46, строки 11-26, примеры	1-11
A	CHESTER C. et al. Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. BLOOD. 2018-01-04, Vol. 131, No. 1, p.49-57 doi: 10.1182/blood-2017-06-741041 весь документ	1-11
A	PEREZ-RUIZ E. et al. Anti-CD137 and PD-1/PD-L1 Antibodies En Route toward Clinical Synergy. CLIN CANCER RES. 2017, Vol. 23, No. 18, p.5326-5328 doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1799 с.5326-5327	1-11
A	YI L. et al. Human and Mouse CD137 Have Predominantly Different Binding CRDs to Their Respective Ligands. PLOS ONE. 2014, Vol.9, No. 1, p.1-10 doi: 10.1371/journal.pone.0086337 Abstract, с.7-9, раздел «Discussion»	1-11

 последующие документы указаны в продолжении графы

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

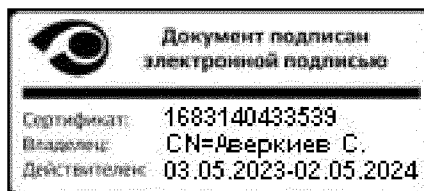
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 22 марта 2024 (22.03.2024)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202391538

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

МПК:

C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

СПК:

C07K 16/2878
A61P 35/00
C07K 2317/21
C07K 2317/24
C07K 2317/31
C07K 2317/54
C07K 2317/55
C07K 2317/56
C07K 2317/565
C07K 2317/75