

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202392856 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.02.14

(22) Дата подачи заявки  
2022.04.14

(51) Int. Cl. C07K 16/46 (2006.01)  
C12N 15/13 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61K 45/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 35/02 (2006.01)  
G01N 33/68 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛА В ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

(31) 202110404963.8

(32) 2021.04.14

(33) CN

(86) PCT/CN2022/086870

(87) WO 2022/218383 2022.10.20

(71) Заявитель:

АКЕСО ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК.; АД ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ КО.,  
ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:

Ся Юй, Ван Чжунминь Максвелл, Ли  
Байюн (CN)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу против CTLA4 и PD-1, при этом антитело используют для лечения опухолей, вводят в комбинации с анти-VEGFR2 моноклональным антителом или анти-VEGF моноклональным антителом, и оно включает первую функциональную область белка, нацеленную на PD-1, и вторую функциональную область белка, нацеленную на CTLA4, при этом первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело, или первая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело, а вторая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин.

A1

202392856

202392856

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579318EA/019

### ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛА В ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

#### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области молекулярной иммунологии и, в частности, относится к применению моноклонального антитела к рецептору сосудистого эндотелиального фактора роста VEGFR2, или анти-VEGF моноклонального антитела, в комбинации с анти-PD-1/CTLA-4 биспецифическим антителом в лечении опухоли.

#### Предпосылки создания изобретения

Опухоль является серьезным заболеванием, угрожающим здоровью, и существует острая необходимость в разработке эффективных методов лечения и лекарственных средств.

Рецептор 2 сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR2) представляет собой рецептор, который специфически действует на фактор роста сосудистой эндотелиальной клетки и также называется KDR или FLK1. В настоящее время обнаружено в основном 5 типов VEGFR: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, NP-1 и NP-2, при этом VEGFR-1 и VEGFR2 преимущественно присутствуют в эндотелиальных клетках сосудов, а VEGFR3 преимущественно присутствует в лимфатических эндотелиальных клетках. NP-1 и NP-2 экспрессируются не только в эндотелиальных клетках, но и в некоторых опухолевых клетках. Однако VEGF проявляет свою биологическую активность, такую как промотирование пролиферации сосудистых эндотелиальных клеток, главным образом, путем связывания с VEGFR2.

Образование новых кровеносных сосудов играет важную роль при различных заболеваниях человека, таких как ретинопатия, артрит, эндометриоз и т.п. Рост опухоли обычно сопровождается образованием новых кровеносных сосудов. Еще в 1971 г. Дж. Фолкман предположил, что рост и метастазирование опухоли можно ингибировать, блокируя ангиогенез опухоли. В последние годы все больше и больше злокачественных опухолей, что касается их развития, метастазирования и прогноза, определяются как связанные с факторами роста эндотелия сосудов и семействами их рецепторов. Таким образом, снова представляют интерес противоопухолевые терапии, нацеленные на VEGF и его рецепторы, а среди семейств рецепторов в качестве мишени наиболее широко исследуемым является VEGFR-2.

PD-1 представляет собой рецептор, являющийся ключевой иммунной контрольной точкой, который экспрессируется активированными Т-лимфоцитами и В-лимфоцитами и опосредует иммуносупрессию, и его лиганды включают по меньшей мере PD-L1 и PD-L2. Анти-PD-1 антитела специфически связываются с рецептором-1 программируемой гибели клеток (PD-1) и блокируют ингибирующий путь PD-1/PD-1 лиганда (Topalian *et al.*, (2012a) *N Engl J Med* 366: 2443-54).

PD-L1 (лиганд-1 белка программируемой гибели клеток), также известный как CD274 или B7-H1, представляет собой трансмембранный белок 1 типа 40 кДа, кодируемый

геном CD274, и является лигандом PD-1. PD-L1 широко распространен не только на лейкоцитах и негемопоэтических клетках в лимфоидной и нелимфоидной ткани, но также в различных раковых клетках, и он высокоэкспрессируется на поверхности различных опухолевых клеток, и степень злокачественности и плохой прогноз опухолей тесно связаны с уровнем экспрессии PD-L1. Оба PD-L1 и PD-1 относятся к суперсемейству иммуноглобулинов и имеют два внеклеточных Ig домена. Интерфейс связывания PD-L1 с рецептором-1 программируемой гибели клеток (PD-1) и B7-1 (CD80) находится на IgV-подобном домене (Lin *et al.*, (2008) *PNAS* 105: 3011-3016). PD-L1 содержит консервативный короткий внутриклеточный хвост (около 30 аминокислот), а PD-1 содержит два цитоплазматических сигнальных мотива на основе тирозина, а именно тирозинсодержащий ингибиторный мотив иммунорецептора (ITIM) и тирозинсодержащий переключающий мотив иммунорецептора (ITSM). После T-клеточной стимуляции PD-1 рекрутирует тирозинфосфатазу SHP-2 к ITSM мотиву в его цитоплазматическом хвосте, приводя к дефосфорилированию эффекторных молекул (таких как CD3 $\xi$ , PKC $\theta$  и ZAP70), вовлеченных в CD3+ T-клеточный сигнальный каскад (Freeman *et al.*, (2000) *J Exp Med* 192: 1027-34; Latchman *et al.*, (2001) *Nat Immunol* 2: 261-8; Carter *et al.*, (2002) *Eur J Immunol* 32: 634-43). На основании клинических данных предполагается, что высокая экспрессия PD-L1 в опухоли связана с повышенной инвазивностью опухоли и плохим прогнозом.

PD-1/PD-L1 является важной специфической иммунной контрольной точкой. Образованный PD-1/PD-L1 комплекс передает ингибирующие сигналы и отрицательно регулирует T-клеточный иммунный ответ; он ингибирует TCR-опосредованную T-клеточную активацию, продукцию цитокинов и T-клеточную пролиферацию (Fife *et al.*, (2011) *Nature Immunology* 10: 1185-1193), индуцирует истощение или анергию среди когнатный антиген-специфических T клеток (Hofmeier *et al.*, (2011) *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011: 1-9), промотирует дифференцировку Th1 клеток в Foxp3+ регуляторные T-клетки (Armanath *et al.*, (2011) *Science TransMed* 3: 1-13; Francisco *et al.*, (2009) *J.Exp.Med.*206: 3015-3029) и индуцирует апоптоз эффекторных T-клеток. Разрушение PD-L1 генов приводит к повышенному T-клеточному ответу и продукции аутореактивных T-клеток (Latchman *et al.*, (2004) *PNAS*, 101:10691-10696). Блокада PD-1 или PD-L1 антителом приводит к повышенному противоопухолевому иммунитету (Iwai *et al.*, (2002) *PNAS*, 99:12293-12297).

CTLA-4 также является одним из репрезентативных белков специфических иммунных контрольных точек. CTLA-4 является первой мишенью для клинического применения. Анти-CTLA-4 антитело может способствовать активации T-клеток и улучшать их противоопухолевый эффект. Ипилиумаб является первым ингибитором иммунной контрольной точки CTLA-4, продемонстрировавшим улучшение общей выживаемости ранее проходивших лечение пациентов с метастатической меланомой, и одобренный FDA. Текущие исследования показывают, что CTLA-4 ингибирует ответ T-клеток главным образом двумя путями. Одним из них является конкурентное связывание с B7, за связывание с которым он конкурирует с CD28, или рекрутмент фосфатаз к

внутриклеточному домену CTLA-4, со снижением таким образом сигнала TCR (Т-клеточного рецептора) и CD28. Другой путь включает снижение уровня экспрессии CD80 и CD86 на антигенпрезентирующих клетках (APC) или удаление их из APC путем трансэндоцитоза, тем самым уменьшая Т-клеточную активацию с вовлечением CD28. Кроме того, CTLA-4 также опосредует связывание дендритных клеток с CD80/CD86 и индуцирует экспрессию расщепляющего триптофан фермента IDO, что приводит к ингибированию TCR. Антитела к CTLA-4 уменьшают Treg и активируют TCR путем связывания с CTLA-4.

Комбинированное применение антител к PD-1 и лекарственного средства на основе антител к CTLA-4 (белок 4, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами) демонстрирует лучшую эффективность на многих различных опухолях по сравнению антителом к PD-1, применяемым отдельно. Однако, повышение эффективности комбинированного применения всегда сопровождается более высокой токсичностью, и применение сильно ограничено.

Бевацизумаб, направленный против ангиогенеза препарат, препятствует росту кровеносных сосудов и ингибирует метастазы опухолей путем связывания с сосудистым эндотелиальным фактором роста (VEGF), и он представляет собой противораковое лекарственное средство широкого спектра действия. С момента выведения на рынок бевацизумаб был одобрен преимущественно для лечения различных типов рака, таких как рак головного мозга (например, агрессивный рак головного мозга, например глиобластома), рак почки, рак легкого (например, метастатический неплоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого), рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак шейки матки (например, метастатический рак шейки матки), рак эндометрия, рак яичника (например, прогрессирующий рак яичника) или рак фаллопиевых труб, рак почки и т.п.

### **Сущность изобретения**

Авторы изобретения обнаружили, что анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело в комбинации с анти-VEGFR2 моноклональным антителом или в комбинации с анти-VEGF моноклональным антителом может эффективно предотвращать и лечить опухоли и имеет низкие токсические и побочные эффекты. Настоящее изобретение подробно описано ниже.

В частности, настоящее изобретение относится к следующему:

1. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело, где анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело предпочтительно используется для лечения опухоли; предпочтительно анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело вводят в комбинации с компонентом А, где компонент А выбран из анти-VEGFR2 моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, анти-VEGF моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или их комбинации,

где

(1) анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело включает:  
первую функциональную область белка, нацеленную на PD-1, и

вторую функциональную область белка, нацеленную на CTLA4,

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

где

иммуноглобулин включает HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 27-29, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 14, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 30-32, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 16; одноцепочечное антитело включает HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 33-35, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 36-38, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 4;

или

иммуноглобулин включает HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 33-35, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 36-38, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 4; одноцепочечное антитело включает HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 27-29, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 14, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 30-32, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 16;

(2) анти-VEGFR2 моноклональное антитело включает HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 53-55, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 50, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 56-58, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 52; или

(3) анти-VEGF моноклональное антитело включает HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 63-65, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 60, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 66-68, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 62.

2. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело в соответствии с пунктом 1, где

(1) аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина выбрана из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18 или их варианта; аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи иммуноглобулина

выбрана из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20 или их варианта; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43 или их варианта; аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 или их варианта;

или

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина выбрана из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43 или их варианта; аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина выбрана из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 или их варианта; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18 или их варианта; аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20 или их варианта;

(2) аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи анти-VEGFR2 моноклонального антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50, или ее вариант; аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи анти-VEGFR2 моноклонального антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52, или ее вариант; или

(3) аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи анти-VEGF моноклонального антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60, или ее вариант; аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи анти-VEGF моноклонального антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62, или ее вариант.

3. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело в соответствии с любым из пунктов 1-2, где биспецифическое антитело выбрано из любого из следующих (1) - (20):

(1) аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или ее вариант, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или ее вариант; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, или ее вариант, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, или ее вариант;

(2) аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или ее вариант, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой











(20) аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, или ее вариант, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, или ее вариант; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, или ее вариант, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, или ее вариант,

где вариант имеет гомологию с соответствующей последовательностью по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере 99%.

4. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело в соответствии с любым из пунктов 1-3, где

аминокислотная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40, или ее вариант, и аминокислотная последовательность легкой цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, или ее вариант, где последовательность варианта имеет гомологию с соответствующей последовательностью по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере 99%.

5. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело в соответствии с любым из пунктов 1-4, где первая функциональная область белка связана с второй функциональной областью белка либо непосредственно, либо через линкерный фрагмент; и/или вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с вариабельной областью легкой цепи одноцепочечного антитела либо непосредственно, либо через линкерный фрагмент.

6. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело в соответствии с пунктом 5, где линкерный фрагмент представляет собой  $(GGGS)_n$ ,  $n$  представляет собой положительное целое число; предпочтительно  $n$  имеет значение 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

7. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело в соответствии с любым из пунктов 1-6, где количество первой и второй функциональных областей белка, каждой независимо, равно 1, 2 или более.

8. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело в соответствии с любым из пунктов 1-7, где одноцепочечное антитело (предпочтительно вариабельная область тяжелой цепи) связано с C-концом тяжелой цепи иммуноглобулина.

9. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело в соответствии с любым из пунктов 1-8, где

иммуноглобулин относится к подтипу IgG1 человека;

где, в соответствии с системой нумерации EU, иммуноглобулин включает

константную область тяжелой цепи, имеющую А мутацию, выбранную из следующих мутаций:

L234A и L235A; или

L234A и G237A; или

L235A и G237A; или

L234A, L235A и G237A; и,

в соответствии с системой нумерации EU, иммуноглобулин включает константную область тяжелой цепи, имеющую В мутацию, выбранную из одной или нескольких из следующих мутаций:

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

или, в соответствии с системой нумерации EU, иммуноглобулин включает константную область тяжелой цепи, имеющую комбинацию А мутации и В мутации;

или

константная область тяжелой цепи анти-VEGFR2 моноклонального антитела или анти-VEGF моноклонального антитела представляет собой С-область гамма-1 цепи Ig, ACCESSION P01857; константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, ACCESSION P01834.

10. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело в соответствии с любым из пунктов 1-9,

где биспецифическое антитело включает:

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

вторую функциональную область белка, нацеленную на CTLA4,

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

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

аминокислотная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40, или ее вариант, и аминокислотная последовательность легкой цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, или ее вариант, где вариант имеет гомологию с соответствующей последовательностью по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере 99%;

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, или ее вариант, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представляет собой последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 44, или ее вариант, где вариант имеет гомологию с соответствующей последовательностью по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере 99%;

одноцепочечное антитело связано с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина;

первая функциональная область белка связана с второй функциональной областью белка через первый линкерный фрагмент; переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с переменной областью легкой цепи одноцепочечного антитела через второй линкерный фрагмент; первый линкерный фрагмент и второй линкерный фрагмент являются одинаковыми или отличными друг от друга;

предпочтительно первый линкерный фрагмент и второй линкерный фрагмент каждый имеют аминокислотную последовательность, независимо выбранную из SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26;

предпочтительно аминокислотные последовательности первого линкерного фрагмента и второго линкерного фрагмента представлены в SEQ ID NO: 26,

предпочтительно легкая цепь анти-PD-1/CTLA-4 биспецифического антитела имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72, а тяжелая цепь анти-PD-1/CTLA-4 биспецифического антитела имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70;

предпочтительно антигенсвязывающий фрагмент выбран из Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, dAb, Fab/c, фрагмента определяющей комплементарность области (CDR), одноцепочечного антитела (например, scFv), бивалентного антитела или доменного антитела.

11. Фармацевтическая композиция для лечения опухоли (в частности, злокачественной опухоли), включающая эффективное количество анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела в соответствии с любым из пунктов 1-10 и компонента А, определенного в любом из пунктов 1-10, где фармацевтическая композиция предпочтительно находится в форме твердого вещества или жидкости; предпочтительно, массовое соотношение анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела и компонента А выбрано из (1:5)-(5:1), такого как 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1; необязательно, фармацевтическая композиция дополнительно включает одно или несколько химиотерапевтических средств (предпочтительно химиотерапевтическое средство представляет собой алкилирующее средство, антиметаболит, антибиотик, лекарственное средство растительного происхождения и/или гормональное лекарственное средство, лекарственное средство на основе платины (например, цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин), адриамицин, циклофосфамид, паклитаксел, альбумин-связанный паклитаксел, липосомальный паклитаксел, доцетаксел, этопозид, гемцитабин, пеметрексед, капецитабин, олапариб, рукапариб, нирапариб, талазопариб, флузопариб, алкалоид барвинка, тамоксифен, мегестрол, госерелин, аспарагиназу и/или противоопухолевое средство фторурацил).

12. Применение анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела в соответствии с любым из пунктов 1-10 для получения лекарственного средства или набора для

профилактики и/или лечения опухоли (в частности, злокачественной опухоли), где лекарственное средство или набор предпочтительно дополнительно включает компонент А, определенный в любом из пунктов 1-10; необязательно, лекарственное средство или набор дополнительно включает одно или несколько лекарственных средств для лечения опухоли (предпочтительно лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое средство или ингибитор роста (например, алкилирующее средство, антрациклин, антигормональное средство, ингибитор ароматазы, антиандрогеновое средство, ингибитор протеинкиназы, ингибитор липидкиназы, антисмысловый олигонуклеотид, рибозим, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы, цитотоксин или противоопухолевый антибиотик, ингибитор протеасомы, средство против микротрубочек, антагонист EGFR, антагонист VEGF, антагонист ангиопоэтина 2, ретиноид, ингибитор тирозинкиназы, ингибитор гистондеацетилазы и их комбинацию), средство таргетной терапии (например, ингибитор B-raf, ингибитор MEK, ингибитор K-ras, ингибитор c-Met, ингибитор Alk, ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы, ингибитор Akt, ингибитор mTOR, ингибитор VEGF, ингибитор PARP, двойной ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы/mTOR и их комбинацию), конъюгат антитело-лекарственное средство (такой как майтансин, монометил ауристатин Е, калихемицин, эсперамицин и хелатор радиоизотопов), Т-клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ингибитор ангиогенеза, противоопухолевое средство, вакцину против рака, адъювант и их комбинацию, алкилирующее средство, антиметаболит, антибиотик, лекарственное средство растительного происхождения и/или гормональное лекарственное средство, лекарственное средство на основе платины (например, цисплатин, карбоплатин, и оксалиплатин), адриамицин, циклофосфамид, паклитаксел, альбумин-связанный паклитаксел, липосомальный паклитаксел, доцетаксел, этопозид, гемцитабин, пеметрексед, капецитабин, олапариб, рукапариб, нирапариб, талазопариб, флузопариб, алкалоид барвинка, тамоксифен, мегестрол, гoserелин, аспарагиназу и/или противоопухолевое средство фторурацил).

13. Способ для профилактики и/или лечения опухоли (в частности, злокачественной опухоли), включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела в соответствии с любым из пунктов 1-10 в комбинации с компонентом А, определенным в любом из пунктов 1-10, и более предпочтительно также в комбинации с одним или несколькими лекарственными средствами для лечения опухоли (предпочтительно, лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое средство или ингибитор роста (например, алкилирующее средство, антрациклин, антигормональное средство, ингибитор ароматазы, антиандрогеновое средство, ингибитор протеинкиназы, ингибитор липидкиназы, антисмысловый олигонуклеотид, рибозим, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы, цитотоксин или противоопухолевый антибиотик, ингибитор протеасомы, средство против микротрубочек, антагонист EGFR, антагонист VEGF, антагонист ангиопоэтина 2, ретиноид, ингибитор тирозинкиназы, ингибитор гистондеацетилазы и их комбинацию), средство

таргетной терапии (например, ингибитор B-raf, ингибитор MEK, ингибитор K-ras, ингибитор c-Met, ингибитор Akt, ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы, ингибитор Akt, ингибитор mTOR, ингибитор VEGF, ингибитор PARP, двойной ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы/mTOR и их комбинацию), конъюгат антитело-лекарственное средство (такой как майтансин, монометил ауристин Е, калихемицин, эсперамицин и хелатор радиоизотопов), Т-клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ингибитор ангиогенеза, противоопухолевое средство, вакцину против рака, адьювант и их комбинацию, антиметаболит, антибиотик, лекарственное средство растительного происхождения и/или гормональное лекарственное средство, лекарственное средство на основе платины (например, цисплатин, карбоплатин, и оксалиплатин), адриамицин, циклофосфамид, паклитаксел (например, альбумин-связанный паклитаксел, липосомальный паклитаксел, и доцетаксел), этопозид, гемцитабин, пеметрексед, капецитабин, олапариб, рупапариб, нирапариб, талазопариб, флузопариб, алкалоид барвинка, тамоксифен, мегестрол, госерелин, аспарагиназу и/или противоопухолевое средство фторурацил), при этом анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело, компонент А и противоопухолевое химиотерапевтическое средство предпочтительно вводят одновременно или последовательно.

14. Набор для профилактики и/или лечения опухоли (в частности, злокачественной опухоли), включающий (а) первую фармацевтическую композицию, включающую анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело в соответствии с любым из пунктов 1-10 в качестве активного ингредиента; (b) вторую фармацевтическую композицию, включающую компонент А, определенный в любом из пунктов 1-10, в качестве активного ингредиента; и необязательно (с) одно или несколько лекарственных средств для лечения опухоли (предпочтительно, лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое средство или ингибитор роста (например, алкилирующее средство, антрациклин, антигормональное средство, ингибитор ароматазы, антиандроеновое средство, ингибитор протеинкиназы, ингибитор липидкиназы, антисмысловый олигонуклеотид, рибозим, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы, цитотоксин или противоопухолевый антибиотик, ингибитор протеасомы, средство против микротрубочек, антагонист EGFR, антагонист VEGF, антагонист ангиопоэтина 2, ретиноид, ингибитор тирозинкиназы, ингибитор гистондеацетилазы и их комбинацию), средство таргетной терапии (например, ингибитор B-raf, ингибитор MEK, ингибитор K-ras, ингибитор c-Met, ингибитор Akt, ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы, ингибитор Akt, ингибитор mTOR, ингибитор VEGF, ингибитор PARP, двойной ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы/mTOR и их комбинацию), конъюгат антитело-лекарственное средство (такой как майтансин, монометил ауристин Е, калихемицин, эсперамицин и хелатор радиоизотопов), Т-клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ингибитор ангиогенеза, противоопухолевое средство, вакцину против рака, адьювант и их комбинацию, алкилирующее средство,

антиметаболит, антибиотик, лекарственное средство растительного происхождения и/или гормональное лекарственное средство, лекарственное средство на основе платины (например, цисплатин, карбоплатин, и оксалиплатин), адриамицин, циклофосфамид, паклитаксел (например, альбумин-связанный паклитаксел, липосомальный паклитаксел, и доцетаксел), этопозид, гемцитабин, пеметрексед, капецитабин, олапариб, рукапариб, нирапариб, талазопариб, флузопариб, алкалоид барвинка, тамоксифен, мегестрол, госерелин, аспарагиназу и/или противоопухолевое средство фторурацил).

15. Стандартная лекарственная форма, предпочтительно используемая для лечения опухоли (в частности, злокачественной опухоли), где стандартная лекарственная форма включает 1-1000 мг (предпочтительно 10-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг или 200 мг) анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела в соответствии с любым из пунктов 1-10, 1-1000 мг (предпочтительно 10-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг или 200 мг) компонента А, определенного в любом из пунктов 1-10, и необязательно одно или несколько лекарственных средств для лечения опухоли (предпочтительно, лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое средство или ингибитор роста (например, алкилирующее средство, антрациклин, антигормональное средство, ингибитор ароматазы, антиандрогеновое средство, ингибитор протеинкиназы, ингибитор липидкиназы, антисмысловый олигонуклеотид, рибозим, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы, цитотоксин или противоопухолевый антибиотик, ингибитор протеасомы, средство против микротрубочек, антагонист EGFR, антагонист VEGF, антагонист ангиопоэтина 2, ретиноид, ингибитор тирозинкиназы, ингибитор гистондеацетилазы и их комбинацию), средство таргетной терапии (например, ингибитор B-raf, ингибитор MEK, ингибитор K-ras, ингибитор c-Met, ингибитор Alk, ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы, ингибитор Akt, ингибитор mTOR, ингибитор VEGF, ингибитор PARP, двойной ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы/mTOR и их комбинацию), конъюгат антитело-лекарственное средство (такой как майтансин, монометил ауристатин Е, калихемицин, эсперамицин и хелатор радиоизотопов), Т-клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ингибитор ангиогенеза, противоопухолевое средство, вакцину против рака, адъювант и их комбинацию, алкилирующее средство, антиметаболит, антибиотик, лекарственное средство растительного происхождения и/или гормональное лекарственное средство, лекарственное средство на основе платины (например, цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин), адриамицин, циклофосфамид, паклитаксел (например, альбумин-связанный паклитаксел, липосомальный паклитаксел и доцетаксел), этопозид, гемцитабин, пеметрексед, капецитабин, олапариб, рукапариб, нирапариб, талазопариб, флузопариб, алкалоид барвинка, тамоксифен, мегестрол, госерелин, аспарагиназу и/или противоопухолевое средство фторурацил); где анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело, компонент А и химиотерапевтическое средство упакованы отдельно.

16. Способ для профилактики или лечения рака или опухоли, где способ включает



введение субъекту, нуждающемуся в этом, одной или нескольких стандартных лекарственных форм в соответствии с пунктом 15; предпочтительно каждый из анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела, компонента А и химиотерапевтического средства в стандартной лекарственной форме вводят отдельно.

17. Отдельная дозированная единица, предпочтительно используемая для лечения опухоли (в частности, злокачественной опухоли) и включающая 0,1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг) анти-CTLA4 анти-PD-1 биспецифического антитела в соответствии с любым из пунктов 1-10 и 0,1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг) компонента А, определенного в любом из пунктов 1-10.

18. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело в соответствии с любым из пунктов 1-10, фармацевтическая композиция в соответствии с пунктом 11, применение в соответствии с пунктом 12, способ в соответствии с пунктом 13, набор в соответствии с пунктом 14, стандартная лекарственная форма в соответствии с пунктом 15 или способ в соответствии с пунктом 16, где

опухоль выбрана из одной или нескольких из следующих:

рак шейки матки (например, метастатический рак шейки матки), рак легкого так как немелкоклеточный рак легкого (например, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого или неплюскоклеточный немелкоклеточный рак легкого), рак пищевода, плоскоклеточный рак пищевода, илеоцекальная аденокарцинома, пузырьчатая аденокарцинома, мелкоклеточный рак легкого, рак желудка (например, прогрессирующий рак желудка, аденокарцинома желудка или аденокарцинома пищеводно-желудочного перехода), рак почки, рак эндометрия, аденокортикальная карцинома, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, перитонеальный рак, аденокарцинома, рак поджелудочной железы, глиома, рак головы и шеи, рак кости, тестикулярный рак, лейкоз, миелома, лимфома, саркома, мезотелиома, гепатоцеллюлярная карцинома, рак толстой кишки, рак желчных протоков, холангиокарцинома, рак прямой кишки, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак яичника (например, прогрессирующий рак яичника) или рак фаллопиевых труб, крупноклеточный нейроэндокринный рак, уротелиальная карцинома (например, уротелиальная карцинома верхних мочевыводящих путей или рак мочевого пузыря), рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы, периферическая Т-клеточная лимфома, меланома, назофарингеальный рак, солидные опухоли с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-H) или дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR), рак головного мозга (например, агрессивный рак головного мозга, такой как глиобластома), рак яичника, плоскоклеточная карцинома, базальноклеточная карцинома, аденома, муцинозная или серозная цистаденокарцинома, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, хориоэпителиома, злокачественная хорионаденома, злокачественная опухоль из клеток Сертоли-стромальных клеток, злокачественная гранулоцитомы и дисгерминома.

19. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело в соответствии с любым из пунктов 1-10, фармацевтическая композиция в соответствии с пунктом 11, применение в соответствии с пунктом 12, способ в соответствии с пунктом 13, набор в соответствии с пунктом 14, стандартная лекарственная форма в соответствии с пунктом 15 или способ в соответствии с пунктом 16, где анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело, компонент А и/или химиотерапевтическое средство находится в форме, подходящей для внутривенной инъекции или внутривенной капельной инфузии, предпочтительно в жидкой форме.

20. Способ в соответствии с пунктом 13 или 16, где стадию введения субъекту эффективного количества анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела осуществляют до или после хирургического лечения и/или до или после лучевой терапии.

21. Способ в соответствии с пунктом 13 или 16, где стандартная доза анти-CTLA4 анти-PD-1 биспецифического антитела составляет 0,1-100 мг, предпочтительно 1-10 мг на кг массы тела; альтернативно, стандартная доза анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела составляет 10-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг для каждого субъекта;

стандартная доза компонента А составляет 0,1-100 мг, предпочтительно 1-10 мг на кг массы тела; альтернативно, стандартная доза компонента А составляет 10-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг для каждого субъекта ;

предпочтительно, дозу вводят от двух раз в день до примерно одного раза в два дня или одного раза в 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 10 дней, 1 неделю, 2 недели или 3 недели;

предпочтительно, путь введения представляет собой внутривенную капельную инфузию или внутривенную инъекцию.

В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело, анти-VEGFR2 моноклональное антитело или анти-VEGF моноклональное антитело вводят в дозе 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг, 20 мг/кг, 21 мг/кг, 22 мг/кг, 23 мг/кг, 24 мг/кг или 25 мг/кг массы тела.

В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело, анти-VEGFR2 моноклональное антитело или анти-VEGF моноклональное антитело вводят в одной или нескольких базовых дозах, обеспечивающих возможность эффективного лечения рака. В некоторых конкретных вариантах осуществления базовая доза находится в диапазоне от около 1 мг до около 1000 мг. В некоторых конкретных вариантах осуществления базовую дозу выбирают из около 100 мг, около 150 мг, около 200 мг, около 250 мг, около 300 мг, около 350 мг, около 400 мг, около 450 мг, около 500 мг, около 600 мг, около 700 мг, около 800 мг, около 900 мг или около 1000 мг.

В некоторых вариантах осуществления введение анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела, анти-VEGFR2 моноклонального антитела или анти-VEGF

моноклонального антитела осуществляют циклами по 2 недели (14 дней) или 3 недели (21 день), и предпочтительно анти-PD-1-анти-CTLA4 биспецифическое антитело вводят внутривенно в первый день (D1) каждого цикла. То есть, анти-PD-1-анти-CTLA4 биспецифическое антитело вводят раз в две недели (q2w) или три недели (q3w).

Настоящее изобретение также обеспечивает применение анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела, анти-VEGFR2 моноклонального антитела и анти-VEGF моноклонального антитела для получения изделия для лечения рака, включающего контейнер, содержащий фиксированную дозу анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела или анти-VEGFR2 моноклонального антитела (или анти-VEGF моноклонального антитела). В некоторых конкретных вариантах осуществления контейнер представляет собой ампулу. Фиксированную дозу выбирают из около 10 мг, около 20 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 100 мг, около 150 мг, около 200 мг, около 250 мг, около 300 мг, около 350 мг, около 400 мг, около 500 мг или около 1000 мг. В некоторых конкретных вариантах осуществления изделие дополнительно включает листок-вкладыш или инструкции с указаниями для пользователя по введению фиксированной дозы анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела, анти-VEGFR2 моноклонального антитела или анти-VEGF моноклонального антитела страдающему раком пациенту. В некоторых конкретных вариантах осуществления изделие включает 1 или более ампул, содержащих около 50 мг, 100 мг, 200 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 500 мг или 600 мг анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела, анти-VEGFR2 моноклонального антитела или анти-VEGF моноклонального антитела. В некоторых конкретных вариантах осуществления изделие упаковано в флаконы из расчета 50 мг/5 мл/флакон, 100 мг/10 мл/флакон, 200 мг/10 мл/флакон или 350 мг/35 мл/флакон раствора анти-PD-1-анти-CTLA4 биспецифического антитела, анти-VEGFR2 моноклонального антитела или анти-VEGF моноклонального антитела.

Количество химиотерапевтического средства могут определить специалисты в данной области. Что касается химиотерапевтических средств на основе платины, в случае цисплатина стандартную дозу цисплатина рассчитывают по формуле Кальверта:

Доза цисплатина (мг)=площадь под кривой, а именно AUC (мг/мл/мин) × [скорость клиренса креатинина (мл/мин) + 25], где AUC имеет значение 4-7, предпочтительно 5;

дозу вводят раз в 2-6 недель, предпочтительно раз в 3 недели или раз в 4 недели;

и/или

путь введения представляет собой внутривенную капельную инфузию или внутривенную инъекцию.

В одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения химиотерапевтическое средство или ингибитор роста выбирают из алкилирующего средства, антрациклина, антигормонального средства, ингибитора ароматазы, антиандрогенового средства, ингибитора протеинкиназы, ингибитора липидкиназы, антисмыслового олигонуклеотида, рибозима, антиметаболита, ингибитора топоизомеразы, цитотоксического средства или противоопухолевого антибиотика, ингибитора протеасомы,

средства против микротрубочек, антагониста EGFR, антагониста VEGF, антагониста ангиопоэтина 2, ретиноида, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора гистондеацетилазы и их комбинации.

В одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения средство таргетной терапии выбирают из ингибитора B-raf, ингибитора MEK, ингибитора K-ras, ингибитора c-Met, ингибитора Alk, ингибитора фосфатидилинозитол-3-киназы, ингибитора Akt, ингибитора mTOR, ингибитора VEGF, ингибитора PARP, двойного ингибитора фосфатидилинозитол-3-киназы/mTOR и их комбинации.

В одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство включает лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из: майтансина, монометил ауристатина E, калихемицина, эсперамицина и хелатора радиоизотопов.

В настоящем изобретении некоторые выражения имеют следующие значения:

«Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» лекарственного средства или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при использовании отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством защищает субъекта от возникновения заболевания или способствует регрессии заболевания, о чем свидетельствует снижение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или предотвращение повреждений или инвалидности, вызываемых заболеванием. Способность терапевтического средства промотировать регрессию заболевания может быть оценена с использованием различных методов, известных практикующим специалистам, например, на человеке в клинических испытаниях, в модельной системе на животных, которая прогнозирует эффективность у людей, или путем определения активности лекарственного средства в анализе *in vitro*.

«Профилактически эффективное количество» лекарственного средства относится к любому количеству лекарственного средства, которое ингибирует возникновение или рецидив рака при введении отдельно или в комбинации с противоопухолевым средством субъекту с риском развития рака (например, субъекту, имеющему предраковое состояние) или субъекту с риском рецидива рака. В некоторых вариантах осуществления профилактически эффективное количество полностью предотвращает возникновение или рецидив рака. «Подавление» возникновения или рецидива рака означает уменьшение возможности возникновения или рецидива рака или полное предотвращение возникновения или рецидива рака.

В контексте настоящей заявки термин «фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент» относится к носителю и/или эксципиенту, который фармакологически и/или физиологически совместим с субъектом и активным ингредиентом. Такие носители и/или эксципиенты хорошо известны в данной области техники (см., например, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, edited by Gennaro AR, 19<sup>th</sup> Ed., Pennsylvania, Mack Publishing Company, 1995), включая, но не ограничиваясь этим: регуляторы pH, поверхностно-

активные вещества, адъюванты и усилители ионной силы. Например, регуляторы pH включают, но не ограничиваются этим, фосфатный буфер; поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваются этим, катионные, анионные или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Tween-80; усилители ионной силы включают, но не ограничиваются этим, хлорид натрия.

«Рецидивирующий» рак представляет собой рак, который регенерирует в исходном или отдаленном месте после ответа на предыдущее лечение (например, хирургическое вмешательство). «Локально-рецидивирующий» рак представляет собой рак, который после лечения возникает в том же месте, что и ранее леченный рак.

Под «метастатическим» раком понимают рак, который распространяется из одной части тела (например, легких) в другую.

Вариабельные области легкой цепи и тяжелой цепи определяют связывание антигена: вариабельная область каждой цепи включает три гипервариабельные области, т.е. определяющие комплементарность области (CDR) (CDR тяжелой цепи (H) включают HCDR1, HCDR2, HCDR3, а CDR легкой цепи (L) включают LCDR1, LCDR2, LCDR3, определенные в соответствии с Kabat *et al.*, см. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition (1991), Volumes 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md). Учитывая известные последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей антитела, существует несколько методов определения областей CDR антитела, включая системы нумерации Kabat, IMGT, Chothia и AbM. Однако применение всех определений CDR для антитела или его варианта должно быть в рамках терминов, определенных и используемых в настоящей заявке. Если аминокислотная последовательность вариабельной области антитела известна, специалисты в данной области обычно могут определить конкретную CDR, не полагаясь на какие-либо экспериментальные данные, помимо самой последовательности.

«Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» лекарственного средства или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при использовании отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством защищает субъекта от возникновения заболевания или способствует регрессии заболевания, о чем свидетельствует снижение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или предотвращение повреждений или инвалидности, вызываемых заболеванием. Способность терапевтического средства промотировать регрессию заболевания может быть оценена с использованием различных методов, известных практикующим специалистам, например, на человеке в клинических испытаниях, в модельной системе на животных, которая прогнозирует эффективность у людей, или путем определения активности лекарственного средства в анализе *in vitro*.

«Профилактически эффективное количество» лекарственного средства относится к любому количеству лекарственного средства, которое ингибирует возникновение или рецидив рака при введении отдельно или в комбинации с противоопухолевым средством

субъекту с риском развития рака (например, субъекту, имеющему предраковое состояние) или субъекту с риском рецидива рака. В некоторых вариантах осуществления профилактически эффективное количество полностью предотвращает возникновение или рецидив рака. «Подавление» возникновения или рецидива рака означает уменьшение возможности возникновения или рецидива рака или полное предотвращение возникновения или рецидива рака.

«Рецидивирующий» рак представляет собой рак, который регенерирует в исходном или отдаленном месте после ответа на предыдущее лечение (например, хирургическое вмешательство). «Локально-рецидивирующий» рак представляет собой рак, который после лечения возникает в том же месте, что и ранее леченный рак.

Под «метастатическим» раком понимают рак, который распространяется из одной части тела (например, легких) в другую.

Термин “отдельная дозированная единица” означает фармацевтическую дозированную форму для однократного введения, такую как инъекция, например, помещенную в ампулу, включающую анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело, анти-VEGFR2 антитело или анти-VEGF антитело в соответствии с настоящим изобретением, для введения субъекту в моменты времени в соответствии со схемой введения, предпочтительно в расчете на кг массы тела субъекта. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения схема введения включает, например, введение одной дозированной единицы в соответствии с циклом введения от двух раз в день до примерно одного раза в два дня или одного раза в 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 10 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель или 6 недель.

В настоящем изобретении термины “первый” (например, первая функциональная область белка или первый линкерный фрагмент) и “второй” (например, вторая функциональная область белка или второй линкерный фрагмент) используются для разграничения или ясности в выражении и не имеют обычных значений, указывающих на последовательность, если только не указано иное.

### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1. Результаты анализов на биологическую активность анти-PD-1/CTLA-4 биспецифического антитела Кадонилимаба в комбинации с анти-VEGFR2 антителом HрL3 для промотирования секреции INF- $\gamma$ , определяемой реакцией смешанных лимфоцитов (MLR).

Фиг. 2. Результаты анализов на биологическую активность Кадонилимаба в комбинации с бевацизумабом для промотирования активации РВМС и секреции IL-2, определяемой реакцией смешанных лимфоцитов (MLR).

### **Подробное описание изобретения**

Варианты осуществления настоящего изобретения будут подробно описаны ниже со ссылкой на примеры, но специалисты в данной области техники поймут, что следующие примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения. Экспериментальные

процедуры без указанных в примерах условий осуществляют в соответствии с обычными условиями или условиями, рекомендованными изготовителем. Используемые реагенты или инструменты представляют собой коммерчески доступные обычные продукты, если не указаны их изготовители.

В следующих примерах настоящего изобретения используемые в качестве изотипического контроля антитела, т.е. анти-HEL, представляют собой антитела, направленные против лизоцима куриного яйца человека (HEL), а последовательности вариабельной области этих антител были взяты из исследования, о котором было сообщено Acierno et. al., озаглавленное “Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies” (Acierno *et al.*, *J Mol biol.*, 2007; 374(1): 130-46, где последовательность вариабельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 45, а последовательность вариабельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 47). В фрагменте константной области hIgG1WT (т.е. анти-HEL) константная область тяжелой цепи (SEQ ID NO: 46) представляет собой C-область цепи гамма-1 Ig, ACCESSION: P01857, а константная область легкой цепи (SEQ ID NO: : 48) представляет собой C-область каппа-цепи Ig, ACCESSION: P01834; анти-HEL были получены Akeso Biopharma, Inc.

Бевацизумаб (анти-VEGF моноклональное антитело), используемое в примерах, представляет собой коммерческий препарат от компании Roche.

#### Пример получения 1: Конструирование последовательностей анти-CTLA4 антител

Аминокислотные последовательности и кодирующие нуклеотидные последовательности тяжелой и легкой цепей анти-CTLA4 антитела 4G10 и его гуманизированных антител 4G10H1L1 и 4G10H3L3 идентичны последовательностям 4G10, 4G10H1L1 и 4G10H3L3, описанным в китайской патентной публикации № CN106967172A, соответственно.

(1) Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей 4G10  
нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи: (372 п.н., SEQ ID NO: 1)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (124 аа, SEQ ID NO: 2)

нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи: (378 п.н., SEQ ID NO: 3)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (126 аа, SEQ ID NO: 4)

(2) Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей гуманизированного моноклонального антитела 4G10H1L1

нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (4G10H1V): (345 п.н., SEQ ID NO: 5)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (115 аа, SEQ ID NO: 6)

нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи (4G10L1V): (327 п.н., SEQ ID NO: 7)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (109 аа, SEQ ID NO: 8)

(3) Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей

гуманизированного моноклонального антитела 4G10H3L3

нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (4G10H3V): (345 п.н., SEQ ID NO: 9)

кодируемая ею аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи (4G10H3V): (115 aa, SEQ ID NO: 10)

нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи (4G10L3V): (327 п.н., SEQ ID NO: 11)

кодируемая ею аминокислотная последовательность (4G10L3V): (109 aa, SEQ ID NO: 12)

Пример получения 2: Конструирование последовательностей анти-PD-1 антитела 14C12 и его гуманизированного антитела 14C12H1L1

Аминокислотные последовательности и кодирующие нуклеотидные последовательности тяжелой и легкой цепей анти-PD-1 антитела 14C12 и его гуманизированного антитела 14C12H1L1 идентичны последовательностям 14C12 и 14C12H1L1, описанным в китайской патентной публикации № CN106967172A, соответственно.

(1) Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей 14C12 нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи: (354 п.н., SEQ ID NO: 13)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (118 aa, SEQ ID NO: 14)

нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи: (321 п.н., SEQ ID NO: 15)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (107 aa, SEQ ID NO: 16)

(2) Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей и последовательности тяжелой и легкой цепей гуманизированного моноклонального антитела 14C12H1L1

нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи: (354 п.н., SEQ ID NO: 17)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (118 aa, SEQ ID NO: 18)

нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи: (321 п.н., SEQ ID NO: 19)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (107 aa, SEQ ID NO: 20)

последовательность ДНК тяжелой цепи 14C12H1L1 (14C12H1): (1344 п.н., SEQ ID NO: 21)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (448 aa, SEQ ID NO: 22)

последовательность ДНК легкой цепи 14C12H1L1 (14C12L1): (642 п.н., SEQ ID NO: 23)

кодируемая ею аминокислотная последовательность: (214 aa, SEQ ID NO: 24)

Пример получения 3: Конструирование последовательностей бифункциональных антител CP001(M), CP002(M), CP003(M) и CP004(M)



Структурные паттерны бифункциональных антител CP001(M), CPb002(M), CP003(M) и CP004(M) находятся в формате Моррисона (IgG-scFv), т.е. С-концы двух тяжелых цепей одного IgG антитела отдельно связаны с scFv-фрагментом другого антитела через линкерные фрагменты. Компоненты для конструирования тяжелой и легкой цепей показаны в Таблице А ниже.

Таблица А

Конструирование последовательностей CP001(M), CP002(M), CP003(M) и CP004(M)

Бифункциональное антитело	Иммуноглобулиновый фрагмент		Линкерный фрагмент	scFv-фрагмент
	Тяжелая цепь	Легкая цепь		
CP001(M)	14C12H1	14C12L1	Линкер1	4G10H1V(M)- Линкер2 -4G10L1V(M)
CP002(M)	14C12H1	14C12L1	Линкер2	4G10H1V(M)- Линкер2 -4G10L1V(M)
CP003(M)	14C12H1	14C12L1	Линкер1	4G10H3V(M)- Линкер2 -4G10L3V(M)
CP004(M)	14C12H1	14C12L1	Линкер2	4G10H3V(M)- Линкер2 -4G10L3V(M)

В Таблице А выше:

Аминокислотная последовательность Линкера1 представляет собой (GGGGS)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 25).

Аминокислотная последовательность Линкера2 представляет собой (GGGGS)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 26).

В Таблице А, представленной выше, scFv-фрагменты 4G10H1V(M), 4G10L1V(M), 4G10H3V(M) и 4G10L3V(M) антител CP001(M), CP002(M), CP003(M) и CP004(M) включали мутации в отдельных аминокислотах каркасных областей на основе 4G10H1V, 4G10L1V, 4G10H3V и 4G10L3V, соответственно, которые эффективно оптимизировали структуру антител и повышали их эффективность.

(1) 4G10H1V(M): (115 аа, положения мутаций подчеркнуты в аминокислотной последовательности на основе 4G10H1V, SEQ ID NO: 41)

(2) 4G10L1V(M): (110 аа, положения мутаций подчеркнуты в аминокислотной последовательности на основе 4G10L1V, SEQ ID NO: 42)

(3) 4G10H3V(M): (115 аа, положения мутаций подчеркнуты в аминокислотной последовательности на основе 4G10H3V, SEQ ID NO: 43)

(4) 4G10L3V(M): (110 аа, положения мутаций подчеркнуты в аминокислотной последовательности на основе 4G10L3V, SEQ ID NO: 44)

Чтобы можно было в дальнейшем отличить его от мутантных антител, CP004(M) в примерах настоящего изобретения также будет указано как CP004(hG1WT). CP004(M), описанное выше, представляет собой “дикий тип”, включающий С-область гамма-1 цепи Ig (ACCESSION: P01857) в качестве константной области тяжелой цепи и С-область каппа-цепи Ig (ACCESSION: P01834) в качестве константной области легкой цепи.

Пример получения 4: Конструирование мутаций аминокислот, не относящихся к варибельной области, на основе гуманизированного бифункционального антитела CP004

На основе CP004(hG1WT), полученного в Примере получения 3, CP004(hG1TM) было получено путем введения точечной мутации лейцина в аланин в положении 234 (L234A), точечной мутации лейцина в аланин в положении 235 (L235A) и точечной мутации глицина в аланин в положении 237 (G237A) в тяжелой цепи.

Последовательность ДНК тяжелой цепи иммуноглобулинового фрагмента в CP004(hG1TM): (1344 п.н., положения мутаций подчеркнуты, SEQ ID NO: 39)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулинового фрагмента в CP004(hG1TM): (448 aa, положения мутаций подчеркнуты, SEQ ID NO: 40)

CP004(hG1TM) и CP004(hG1WT) имеют одинаковую последовательность ДНК легкой цепи и одинаковую кодируемую аминокислотную последовательность. Конкретная последовательность показана в Примере получения 3.

Пример получения 5: Получение анти-PD-1/CTLA-4 биспецифического антитела Кадонилимаба

Структурный паттерн анти-PD-1/CTLA-4 биспецифического антитела Кадонилимаба (т.е. CP004(hG1TM)) находится в формате Моррисона (IgG-scFv), т.е. С-концы двух тяжелых цепей одного содержащего иммуноглобулиновый фрагмент антитела связаны с VH-концом scFv-фрагмента другого антитела через линкерные фрагменты, где иммуноглобулиновый фрагмент основан на антителе к PD-1, а scFv-фрагмент основан на анти-CTLA-4 антителе, и они связаны между собой линкерным фрагментом.

Последовательность легкой цепи (SEQ ID NO: 72) и последовательность тяжелой цепи (SEQ ID NO:70) анти-PD-1/CTLA-4 биспецифического антитела Кадонилимаба (т.е. CP004(hG1TM)), описанного в этом примере, были получены от WHO Drug Information, Proposed INN: List 124 (WHO Drug Information, 2020; 34(4): 947-949), и способ получения является следующим.

Последовательность ДНК гена, кодирующего тяжелую цепь, включая константную область и варибельную область, и последовательность ДНК гена, кодирующего легкую цепь, включая константную область и варибельную область, моноклональных антител-кандидатов отдельно клонировали в векторы pUC57simple (поставщик GenScript) с получением плазмид pUC57simple-H и pUC57simple-L, соответственно.

Указанные выше плазмиды подвергали ферментативному расщеплению (HindIII&EcoRI) и тяжелые и легкие цепи, выделенные электрофорезом, по отдельности субклонировали в вектор экспрессии pcDNA3.1 (приобретен у Invitrogen). Рекомбинантные плазмиды выделяли и комбинацию pcDNA3.1-H+pcDNA3.1-L котрансфицировали в клетки 293F. После культивирования клеток в течение 7 дней культуру центрифугировали при высокой скорости. Супернатант концентрировали, загружали в колонку HiTrap MabSelect SuRe и очищали с использованием системы жидкостной хроматографии для очистки белков (AKTA Purifier 10, GE).

Очищенный образец, т.е. антитело Кадонилимаб, добавляли как к загрузочному

буферу для электрофореза белков в восстанавливающих условиях, так и к загрузочному буферу для электрофореза белков в невосстанавливающих условиях, а затем кипятили для SDS-PAGE электрофореза. Целевой белок из восстановленного образца белка имел массу 70 кДа и 30 кДа, а целевой белок из невосстановленного образца белка (только одно антитело) имел массу 200 кДа. Белок соответствовал теоретическому размеру, и, таким образом, было получено очищенное антитело.

#### Пример получения 6: Получение анти-VEGFR2 антитела HpL3

Последовательность и способ получения переменной области легкой цепи антитела и переменной области тяжелой цепи анти-VEGFR2 антитела HpL3, описанные в этом примере, цитируются из патентной заявки № CN201610573836.X, "AN ANTI-VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR VEGFR2 MONOCLONAL ANTIBODY AND AN ENCODING GENE AND USE THEREOF".

Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи HpL3 представлена в SEQ ID NO: 50, последовательность ДНК кодирующего ее гена представлена в SEQ ID NO: 49, и последовательности CDR1-3 переменной области тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 53-55, соответственно.

Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи HpL3 представлена в SEQ ID NO: 52, последовательность ДНК кодирующего ее гена представлена в SEQ ID NO: 51, и последовательности CDR1-3 переменной области легкой цепи представлены в SEQ ID NO: 56-58, соответственно.

HpL3 включает С-область гамма-1 цепи Ig (ACCESSION: P01857) в качестве константной области тяжелой цепи и С-область каппа-цепи Ig (ACCESSION: P01834) в качестве константной области легкой цепи.

Последовательность ДНК гена, кодирующего тяжелую цепь, включая константную область и переменную область, и последовательность ДНК гена, кодирующего легкую цепь, включая константную область и переменную область, моноклональных антител-кандидатов отдельно клонировали в векторы pUC57simple (поставщик GenScript) с получением плазмид pUC57simple-PCABH и pUC57simple-L3, соответственно.

Указанные выше плазмиды подвергали ферментативному расщеплению (HindIII&EcoRI), и тяжелые и легкие цепи, выделенные электрофорезом, по отдельности субклонировали в вектор экспрессии pcDNA3.1 (приобретен у Invitrogen). Рекомбинантные плазмиды выделяли и комбинацию pcDNA3.1-PCABH+pcDNA3.1-L3 котрансфицировали в 293F клетки. После культивирования клеток в течение 7 дней культуру центрифугировали при высокой скорости. Супернатант концентрировали, загружали в колонку HiTrap MabSelect SuRe и очищали с использованием системы жидкостной хроматографии для очистки белков (AKTA Purifier 10, GE).

Очищенный образец, т.е. антитело HpL3, добавляли как к загрузочному буферу для электрофореза белков в восстанавливающих условиях, так и к загрузочному буферу для электрофореза белков в невосстанавливающих условиях, а затем кипятили для SDS-PAGE электрофореза. Целевой белок из восстановленного образца белка имел массу 45 кДа и 30

кДа, а целевой белок из невозстановленного образца белка (только одно антитело) имел массу 150 кДа. Белок соответствовал теоретическому размеру, и, таким образом, было получено очищенное моноклональное антитело.

Пример 1: Биологическая активность анти-PD-1/CTLA-4 биспецифического антитела Кадонилимаба в комбинации с анти-VEGFR2 антителом HрL3 для промотирования секреции INF- $\gamma$ , определяемой реакцией смешанных лимфоцитов (MLR)

Получение клеток Raji-PDL1:

Raji клетки были инфицированы лентивирусным вектором plenti6.3/V5-PDL1FL-BSD, сверхэкспрессирующим человеческий PD-L1, после упаковки вируса, и лекарственно-резистентная клеточная линия Raji-PDL1 была получена после скрининга лекарственных средств с использованием BSD (Бластицидин, 10 мкг/мл). Plenti6.3/V5-PDL1FL-BSD получали путем синтеза гена PDL1FL (PDL1, Genebank ID: NP\_054862.1) от поставщика Nanjing Genscript, а затем его лигирования с plenti6.3/V5-BSD (Invitrogen Cat. No: k531520) путем ферментативного расщепления.

За два дня до эксперимента PBMC (выделенные из периферической крови здорового человека) размораживали и культивировали в полной среде при 37°C в инкубаторе с 5% диоксида углерода; через 2 ч, когда состояние PBMC было восстановлено, SEB (при конечной концентрации 0,5 мкг/мл) (Toxin technology, Cat. No: BT202) добавляли для стимуляции в течение двух дней; в день эксперимента Raji-PDL1 клетки собирали, центрифугировали, ресуспендировали (в 1640+10% FBS), подсчитывали и доводили до плотности  $2 \times 10^6$ /мл, добавляли MMC (Митомицин С, при конечной концентрации 2 мкг/мл, изготовитель: Stressmarq, Cat. No: SIH-246) и смесь обрабатывали при 37°C в течение 1 ч в инкубаторе с 5% диоксида углерода; PBMC после двух дней SEB стимуляции и Raji-PDL1 клетки после MMC обработки собирали и промывали два раза базальной средой 1640, клетки ресуспендировали с использованием полной среды и подсчитывали и клетки инокулировали в 96-луночный планшет с U-образным дном (3799) при плотности  $1 \times 10^5$ /луночка PBMC и  $1 \times 10^5$ /луночка Raji-PDL1 (по 50 мкл/луночка каждый); лекарственные средства добавляли в соответствии с планом эксперимента, устанавливали контроль без действующего вещества и отрицательный контроль и клетки культивировали в течение 3 дней (конечный объем системы составил 200 мкл); через 3 дня клетки центрифугировали при  $250 \times g$  в течение 5 мин (центрифуга Beckman), клеточные супернатанты собирали и определяли содержание INF- $\gamma$  с использованием набора Dakewe.

Как показано на Фиг. 1, в смешанной клеточной системе PBMC и Raji-PDL1 Кадонилимаб и HрL3 антитело оба могли существенно снижать секрецию INF- $\gamma$  в PBMC существенным дозозависимым образом. Что касается уровня промотирования секреции INF- $\gamma$ , Кадонилимаб в комбинации с HрL3 имел лучший потенциал промотирования секреции INF- $\gamma$  по сравнению с Кадонилимабом и HрL3 антителом, используемыми отдельно.

Пример 2: Биологическая активность Кадонилимаба в комбинации с Бевацизумабом для промотирования активации PBMC и секреции IL-2, определяемой реакцией смешанных

лимфоцитов (MLR)

За два дня до эксперимента PBMC (выделенные из добровольно пожертвованной периферической крови здоровых волонтеров после получения информированного согласия) размораживали и культивировали в полной среде при 37°C в инкубаторе с 5% диоксида углерода; через 2 ч, когда состояние PBMC было восстановлено, добавляли SEB (при конечной концентрации 0,5 мкг/мл) (Toxin technology, Cat. No: BT202) для стимуляции в течение двух дней; в день эксперимента клетки Raji-PDL1 (сконструированные Akeso Biopharma, Inc.) собирали, центрифугировали, ресуспендировали (в 1640+10% FBS), подсчитывали и доводили до плотности  $2 \times 10^6$ /мл, добавляли MMC (Митомицин С, при конечной концентрации 2 мкг/мл) (митомицин С, изготовитель: Stressmarq, Cat. No: SIH-246) и смесь обрабатывали при 37°C в течение 1 ч в инкубаторе с 5% диоксида углерода; PBMC после двух дней SEB стимуляции и Raji-PDL1 клетки после MMC обработки собирали и промывали два раза базальной средой 1640, клетки ресуспендировали с использованием среды для анализа и подсчитывали и клетки инокулировали в 96-луночный планшет с U-образным дном (3799) при плотности  $1 \times 10^5$ /лунка PBMC и  $1 \times 10^5$ /лунка Raji-PDL1 (по 40 мкл/лунка каждый); клетки Hela (приобретенные у Chinese academy of sciences) расщепляли обычным способом и инокулировали в 96-луночный планшет с U-образным дном (3799) при плотности  $2 \times 10^4$ /лунка (40 мкл/лунка); лекарственные средства добавляли в соответствии с планом эксперимента, устанавливали отрицательный контроль и изотипический контроль и клетки культивировали в течение 3 дней (конечный объем системы составил 200 мкл); через 3 дня клетки центрифугировали при  $250 \times g$  в течение 5 мин (центрифуга Beckman), клеточные супернатанты собирали и определяли содержание IL-2 с использованием набора Dakewe.

Как показано на Фиг. 2, в смешанной системе культивирования, включающей PBMC, Raji-PDL1 и Hela (рак шейки матки) клетки и VEGF (номер партии: 20180126-1, изготовитель Akeso Biopharma, Inc.), Кадонилимаб и бевацизумаб оба могли существенно снижать секрецию IL-2 в PBMC существенным дозозависимым образом. Что касается уровня промотирования секреции IL-2, Кадонилимаб в комбинации с бевацизумабом имел лучший потенциал промотирования секреции IL-2 по сравнению с Кадонилимабом и бевацизумабом, используемыми отдельно.

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи бевацизумаба представлена в SEQ ID NO: 60, последовательность ДНК кодирующего ее гена представлена в SEQ ID NO: 59, и последовательности CDR1-3 варибельной области тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 63-65, соответственно. Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи бевацизумаба представлена в SEQ ID NO: 62, последовательность ДНК кодирующего ее гена представлена в SEQ ID NO: 61, и последовательности CDR1-3 варибельной области легкой цепи представлены в SEQ ID NO: 66-68, соответственно.

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1: нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 4G10

caggctcaagctgcaggagtctggacctgagctggggaagcctggagcttcaatgaagatatcctgcaaggctctggttactcatt  
cactggctacacatgaactgggtgaagcagagccatggaaagaacctgaatggattggacttattaatccttacaataatattactaactac  
aaccagaagttcatgggcaaggccacatttactgtagacaagtcatccagcacagcctacatggaactcctcagactgacatctgaagactc  
tggagtctatttctgtgcaagactcgaactataggtcttattggggccaagggactctggctactgtctctgcagccaaaaacgacacccccatct  
gtct at

SEQ ID NO: 2: аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 4G10

QVKLQESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPY  
NNITNYNQKFMGKATFTVDKSSSTAYMELLRLTSEDSGVYFCARLDYRSYWGQGLTV  
VSAAKTTPPSVY

SEQ ID NO: 3: нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи 4G10

caggctgttgactcaggaatctgcactcaccacatcacctgggaaacagtcacactcactgtcgtcaagtactggggctgt  
tacaactagtaactttccaactgggtccaagaaaaaccagatcatttattcactagtctaataagggtggtagcaacaaccgagctccagggtt  
cctgccagattctcaggctccctgattggagacaaggctgccctcacaggggcacagactgaggatgaggcaatatatttctgtgc  
tctatggtacagcaaccattgggtgttcgggtggaggaaccaaactgactgtcctaggccagcccaagtcttcgccatcagtcacacctgttca  
agggcaattctgc

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

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNFANWVQEKPDHLFTSLIGGTNN  
RAPGVPARFSGSLIGDKAAL TITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKS  
SPSVTLFQGQFC

SEQ ID NO: 5: нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 4G10H1L1

caggctcagctgggtgagctctggggccgagctggggaagcccggcgctccatgaagatctcttgaaggccagcggataca  
gtttcactggctataccatgaactgggtcaaacaggctccaggacagggactggagtggatcgggctgattaatccttacaacaacatcacc  
aactacaaccagaagttcatgggaaaagcaacctttacagtggacaagagcatttcacagcctacatggaactgagccggctgacttcag  
acgatagcggggtctattttgtgcaaggctggattatcgctcttactgggggcagggaaactctggctactgtctccgct

SEQ ID NO: 6: аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 4G10H1L1

QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQGLEWIGLINP  
YNNITNYNQKFMGKATFTVDK S I S T A Y M E L S R L T S D D S G V Y F C A R L D Y R S Y W G Q G T L V  
T V S A

SEQ ID NO: 7: нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи 4G10H1L1

caggctgtcgtcactcaggaaccttactgactgtgagcccaggaggaactgtcacctgacatgcggaagctccaccggagc  
agtgaccacatccaacttcgccaattgggtccaggaaaaagccaggccaggcatttcgatccctgatcggaggcacaacaatcgggctct

tgggtgcccgaagattctcaggaagcctgctgggggaaaagccgctctgaccattagtggcgctcagcctgaggacgaagccgagta  
cttctcgctctgtggtatagcaaccactgggtgtttggcgggggaacaaagctgactgtgctg

SEQ ID NO: 8: аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 4G10H1L1

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFFANWVQEKPQAFRSLIGGTN  
NRASWVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 9: нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 4G10H3L3

caggtgcagctggctcagctctggggccgaagtgaagaaacccggcgcctcagtgaggctcagctgcaaggccagcgggtac  
agtttactggatataccatgaactgggtccgacaggccccctggccaggggctggagtgatcggcctgattaacccttacaacaacatca  
ctaactacgcacagaagttccaggggagagtgacctttacagtgacaccagcatttccacagcctac  
atggaactgtcccggctgagatctgacgatacaggcgtgtacttctgcgctaggctggattaccgcagctattggggacagggcacactgg  
tgactgtcagcgca

SEQ ID NO: 10: аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 4G10H3L3

QVQLVESGAIEVKKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWIGLINP  
YNNITNYAQKFQGRVFTFTVDTSISTAYMELSRRLSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGLV  
TVSA

SEQ ID NO: 11: нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи 4G10H3L3

caggtgtcgtcactcaggaacctcactgaccgtgtctctggcgggactgtcacctgacatcgggcagctccacaggggcc  
gtgaccacaagtaactcccaaattgggtccagcagaagccaggacaggctccccggagtctgatcggaggcaccaacaacaaggcca  
gctggacaccgcacggtcagcggcagcctgctggcggcaaggccgctctgacaattagcggagcccagcctgaggacgaagccg  
agtactattgcgctctgtggtactccaaccactgggtgttcggcggcgccaccaagctgactgtgctg

SEQ ID NO: 12: аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 4G10H3L3

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFFPNWVQQKPGQAPRSLIGGTN  
NKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 13: нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 14C12

gaggtcaaaactggtgagagcggcggcgggctggtgaagcccggcgggtcactgaaactgagctgcgccgttccggcttc  
gccttagctcctacgacatgtcatgggtgaggcagaccctgagaagcgcctggaatgggtcgtactatcagcggaggcggcgatac  
acctactatcctgactctgtcaaggagattcacaattagtcgggataacccagaaataactctgtatctgcagatgtctagctgcggtccg  
aggatacagctctgtactattgtgcaaacgggtacggcgaagcatggtttgcctattggggacagggcacccctggtgacagtctctgcc

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

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGF AFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISGG  
GRYTYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYCANRYGEAWFAYWGQG  
TLVTVSA

SEQ ID NO: 15: нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой

цепи 14C12

gacattaagatgacacagtcacctctcaatgtacgctagcctggcgagcgagtgaccttcacatgcaaaagcatcccaggac  
atcaacacatactgtcttgggttcagcagaagccaggcaaaaagcccaagaccctgatctaccggccaatagactggaggacggggct  
cccagcagattctccggatctggcagtgaggcaggactccctgaccatcagctccctggagatgaagacatgggcatctactattgctg  
cagtatgatgagttccctctgacctttggagcaggcacaaaactggaactgaag

SEQ ID NO: 16: аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи 14C12

DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQKPGKSPKTLIYRANRLV  
DGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 17: нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи 14C12H1L1

gaagtgcagctggctgagctctgggggagggctggcagccccggcggtcactgcgactgagctgagcagctccggattcg  
cctttagctctacgacatgtctgggtgcgacagccaccagaaagggactggattgggtcgctactatctcaggaggcgggagataca  
cctactatctgacagcgtcaagggccgggtcacaatctctagagataacagtaagaacaatctgtatctgcagatgaacagcctgagggt  
gaggacaccgactgactattgtccaaccgctacggggaagcatggtttgcctattgggggaggggaaccctggtagactctctagt

SEQ ID NO: 18: аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи 14C12H1L1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG  
GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ  
GTLVTVSS

SEQ ID NO: 19: нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи 14C12H1L1

gacattcagatgactcagagccccctctccatgtccgcctctgtggcgacagggtcaccttcacatgccgcgctagtcaggata  
tcaacacctactgagctggtttcagcagaagccagggaaaagcccaagacactgatctaccgggctaatagactgggtgtctggagtccc  
aagtcgggtcagtgctcagggagcggacagactacactctgaccatcagctccctgcagcctgaggacatggcaacctactattgctg  
cagtatgatgagttccactgacctttggcgccgggacaaaactggagctgaag

SEQ ID NO: 20: аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи 14C12H1L1

DIQMTQSPSSMSASVGDRTFTCRASQDINTYLSWFQKPGKSPKTLIYRANRLV  
SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 21: последовательность ДНК тяжелой цепи 14C12H1L1 (14C12H1)(1344 п.н.)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCA  
CTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGG  
GTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGGCGG  
GAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATA  
ACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCA  
CTGTA CTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGA  
ACCCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGACCTAGCGTGTTCCTCTCGCC  
CCCTCCTCCAAAAGCACCGAGGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGA



CTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGT  
 CCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGT  
 CACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACA  
 AGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACA  
 CACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAACTCCTCGGAGGCCCTAGCGTCTTCCTCT  
 TTCCTCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCTGAAGTCACCTGTG  
 TCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATG  
 GCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACC  
 TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGA  
 GTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCATTGAGAAGACCATCA  
 GCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACTGCCTCCCTCCAGG  
 GACGAACTCACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC  
 AGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTACAAGAC  
 CACCCCTCCTGTCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG  
 GACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGC  
 CCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA

SEQ ID NO: 22: кодируемая аминокислотная последовательность тяжелой цепи  
 14C12H1L1 (14C12H1) (448 aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG  
 GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ  
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF  
 PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP  
 APELLGGPSVFLFPPKPKDATLMISRTP E VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
 QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL  
 YSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 23: последовательность ДНК легкой цепи 14C12H1L1 (14C12L1) (642  
 п.н.)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACA  
 GGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTC  
 AGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTG  
 TCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGAC  
 CATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGA  
 GTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAACCTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCG  
 CTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCA  
 GCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGGAAAG  
 GTCGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTC  
 AAAAGATAGCACCTATTCCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGA  
 GAAGCACAAAGTGTATGCATGCGAAGTGACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGTGA  
 CTAAGTCTTTTAACCGGGGCGAATGT

SEQ ID NO: 24: кодируемая аминокислотная последовательность легкой цепи 14C12H1L1 (14C12L1) (214 aa)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV  
SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDASTY  
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 25: аминокислотная последовательность Линкера1  
GGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 26: аминокислотная последовательность Линкера2  
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 27: HCDR1 14C12: GFAFSSYD

SEQ ID NO: 28: HCDR2 14C12: ISGGGRYT

SEQ ID NO: 29: HCDR3 14C12: ANRYGEAWFAY

SEQ ID NO: 30: LCDR1 14C12: QDINTY

SEQ ID NO: 31: LCDR2 14C12: RAN

SEQ ID NO: 32: LCDR3 14C12: LQYDEFPLT

SEQ ID NO: 33: HCDR1 4G10: GYSFTGYT

SEQ ID NO: 34: HCDR2 4G10: INPYNNIT

SEQ ID NO: 35: HCDR3 4G10: ARLDYRSY

SEQ ID NO: 36: LCDR1 4G10: TGAVTTSNF

SEQ ID NO: 37: LCDR2 4G10: GTN

SEQ ID NO: 38: LCDR3 4G10: ALWYSNHWV

SEQ ID NO: 39: последовательность ДНК тяжелой цепи иммуноглобулинового фрагмента CP004(hG1TM), положения мутаций подчеркнуты

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCA  
CTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGG  
GTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGGCGG  
GAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATA  
ACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCA  
CTGTA CTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGA  
ACCCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGGCCCAGCGTGTTTCTCTCGCC  
CCCTCCTCCAAAAGCACCGAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGA  
CTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGT  
CCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGT  
CACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACA  
AGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACA  
CACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAAGCTGCTGGAGCCCTAGCGTCTTCTCT  
TTCCTCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTG  
TCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATG  
GCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACC

TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGA  
 GTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCA  
 GCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACTGCCTCCCTCCAGG  
 GACGAACTCACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC  
 AGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTACAAGAC  
 CACCCCTCCTGTCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG  
 GACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGC  
 CCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA

SEQ ID NO: 40: аминокислотная последовательность тяжелой цепи  
 иммуноглобулинового фрагмента в CP004(hG1TM), положения мутаций подчеркнуты

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG  
 GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ  
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDAYFPEPVTVSWNSGALTSKV  
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP  
 PCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDATLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP  
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG  
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 41: аминокислотная последовательность 4G10H1V(M), положения  
 мутаций подчеркнуты

QVQLVESGAELVKPGASKISCKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQCLEWIGLINP  
 YNNITNYNQKFMGKATFTVDKSISTAYMELSRLLTSDDSGVYFCARLDYRSYWGQGTLV  
 TVSA

SEQ ID NO: 42: аминокислотная последовательность 4G10L1V(M), положения  
 мутаций подчеркнуты

QAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFANWVQEKPGQAFRSLIGGTN  
 NRASWVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGCGTKLTVLR

SEQ ID NO: 43: аминокислотная последовательность 4G10H3V(M), положения  
 мутаций подчеркнуты

QVQLVESGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQCLEWIGLINP  
 YNNITNYAQKFQGRVTFVDTISISTAYMELSRLLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGTLV  
 TVSA

SEQ ID NO: 44: аминокислотная последовательность 4G10L3V(M), положения  
 мутаций подчеркнуты

QAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIGGTN  
 NKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGCGTKLTVLR

SEQ ID NO: 45: последовательность вариабельной области тяжелой цепи hIgG

EVQLEQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFTTYWIEWIKQRP GHSLEWIGEILPGS  
 DSTYYNEKVKGKVTFTADASSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGFYVYWGQGTLL  
 TVSS

SEQ ID NO: 46 последовательность константной области тяжелой цепи hIgG

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDAYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVKDKRVESKYGPPCPPCPAPEF  
LGGPSVFLFPPKPKDATLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTT  
LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL  
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 47 последовательность переменной области легкой цепи hIgG

DIELTQSPATLSVTPGDSVLSLSCRASQSSISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYTSQSMS  
GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGVYFCQQSGSWPRTFGGGKLDIK

SEQ ID NO: 48 последовательность константной области легкой цепи hIgG

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQEQ  
SVTEQDSKDASTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 49 нуклеотидная последовательность переменной области тяжелой цепи HpL3 (VEGFR2)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGGGGACTGGTGAAGCCCGGCGGGTCC  
CTGCGACTGTCTTGCGCCGCTAGTGGCTTCACCTTCAGCTCCTACTCTATGAACTGGG  
TGAGACAGGCCCTGGAAAAGGCCTGGAGTGGGTCTCTAGTATCTCAAGCTCCTCTA  
GTTACATCTACTATGCCGACAGCGTGAAGGGGCGGTTACCATCTCAAGAGATAAC  
GCTAAAAATAGTCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCAGAAGACACTGCCGT  
GACTATTGTGCTCGCGTCACCGACGCATTTGATATTTGGGGGCAGGGAACCATGGT  
GACAGTCTCAAGC (Примечание: подчеркнутые части представляют собой последовательности CDR)

SEQ ID NO: 50 аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи HpL3

EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIY  
YADSVKGRFTISRDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDAFDIWGQGTMTVSS  
(Примечание: подчеркнутые части представляют собой последовательности CDR)

SEQ ID NO: 51 нуклеотидная последовательность переменной области легкой цепи HpL3

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTTCTTCAGTGTCCGCCTCTATCGGCGACCG  
GGTCACCATACATGCAGAGCTTCCCAGGGCCTCGATAACTGGCTGGGGTGGTACCA  
GCAGAAGCCTGGGAAAGCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCTTCCAATCTGGATA  
CCGGAGTGCCATCTCGATTCAGTGGCTCAGGGAGCGGAACATACTTTACTCTGACCA  
TCAGTCCCTGCAGGCTGAGGACTTCGCAGTGTATTTTTGCCAGCAGGCAAAGGCCT  
TCCCTCCACCTTTGGCGGGGGAACAAAAGTGGACATCAAG (Примечание:  
подчеркнутые части представляют собой последовательности CDR)

SEQ ID NO: 52 аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи HpL3

DIQMTQSPSSVSASIGDRVTITCRASQGLDNWLGWYQQKPGKAPKLLIYDASNL

DTGVPSRFSGSGSGTYFTLTISSLQAEDFAVYFCQQAKAFPPTFGGGTKVDIK

(Примечание: подчеркнутые части представляют собой последовательности CDR)

HCDR1-HCDR3 варибельной области тяжелой цепи H<sub>ρ</sub>L3

HCDR1: GFTFSSYS (SEQ ID NO: 53)

HCDR2: ISSSSSYI (SEQ ID NO: 54)

HCDR3: ARVTDAFDI (SEQ ID NO: 55)

LCDR1-LCDR3 варибельной области легкой цепи H<sub>ρ</sub>L3

LCDR1: QGLDNW (SEQ ID NO: 56)

LCDR2: DAS (SEQ ID NO: 57)

LCDR3: QQAKAFPPT (SEQ ID NO: 58)

SEQ ID NO: 59 нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи бевацизумаба (VEGF)

GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGTCT  
CTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAACTATGGAATGAATTGG  
GTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTTCGGCTGGATCAACACTTACAC  
CGGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTACCTTCAGCCTGGATAC  
AAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAG  
TCTACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTTTGACGT  
GTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGC

SEQ ID NO: 60 аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи бевацизумаба

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGVIN  
TYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWYF  
DVWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 61 нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи бевацизумаба

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGACAG  
GGTCACCATCACATGCAGTGCTTACAGGATATTTCCAACCTGAATTGGTATCA  
GCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGCTCCCTGCACT  
CAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACTCTGACC  
ATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCG  
TGCCATGGACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAG

SEQ ID NO: 62 аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи бевацизумаба

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPKGAPKVLIIYFTSSLHS  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGKVEIK

Аминокислотные последовательности трех CDR варибельной области тяжелой цепи бевацизумаба являются следующими:

HCDR1: GYTFTNYG (SEQ ID NO: 63)

HCDR2: INTYTGER (SEQ ID NO: 64)

HCDR3: AKYPHYYGSSHWYFDV (SEQ ID NO: 65)

Аминокислотные последовательности трех CDR варибельной области легкой цепи бевацизумаба являются следующими:

LCDR1: QDISNY (SEQ ID NO: 66)

LCDR2: FTS (SEQ ID NO: 67)

LCDR3: QQYSTVPWT (SEQ ID NO: 68)

SEQ ID NO: 69 нуклеотидная последовательность тяжелой цепи CP004(hG1TM)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCCGGCGGGTCA  
 CTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGG  
 GTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGGCGG  
 GAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATA  
 ACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCA  
 CTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGA  
 ACCCTGGTGACAGTCTCTAGTgccagcaccaaaggccagcgtgttctctcgccccctctccaaaagcaccagc  
 ggaggaaccgctgctctcggtgctgtggtgaaggactacttcctgaaccctgaccgtgagctggaatagcggcgctctgacaagcggg  
 gtccatacttccctgctgtgctgcaaaagcagcggactctattccctgtccagcgtctcacagtgccagcagcagcctgggcaccaga  
 cctacatctgtaacgtcaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaaagtggagcccaaatctcgacaagacacacacctgtc  
 cccccgtctgtctcccgaagCTGCTggagCccttagcgttctctcttctcccaaacccaaggacaccctcatgatcagcagaac  
 cctgaagtcacctgtctgctgctggtgctcagccatgaggacccccgaggtgaaattcaactggtatgctgatggcgtcaggtgcaaac  
 gccaaaaccaagcccagggaggaacagtacaactccactacaggggtggtgtccgtgctgacagtctccaccaggactggctgaacgg  
 caaggagtacaagtgaaggtgtccaacaaggtctcctccccattgagaagaccatcagcaaggccaaaggccaaccaggagg  
 ccccaggtctatactgctcctccaggacgaactaccaagaaccaggtgtcctgacctgctggtcaagggtttatcccagega  
 catcgccgtcagtgagggtccaacggacagcccgagaataactacaagaccacctctgtctcactccagcggctccttctctgt  
 acagcAAACTGACCGTGGATAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCATGTTC  
 CGTGATGCACGAGGCACTGCACAACCACTATAACCAGAAGTCTCTGAGTCTGTCACC  
 AGGAAAAGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGCGGAAGTGGAGGCGGAGGATCAGG  
 AGGGGGAGGATCTCAGGTGCAGCTGGTCGAATCCGGAGCCGAGGTGAAGAAACCC  
 GGCGCTTCCGTGAAGGTCTCTTGCAAAGCATCAGGCTACAGCTTCACAGGGTATACT  
 ATGAACTGGGTGCGGCAGGCACCTGGACAGTGTCTGGAATGGATCGGCCTGATTAA  
 CCCATAACAACATCACTAACTACGCCAGAAGTTCCAGGGCCGGGTGACTTTTAC  
 CGTGACACTAGCATTTCCACCGCTTACATGGAGCTGAGTCGGCTGAGATCAGACG  
 ATACCGGCGTGTATTTTTGCGCAAGGCTGGATTACAGAAGTTATTGGGGACAGGGA  
 ACACTTGTACAGTCTCTGCTGGAGGAGGCGGATCTGGAGGAGGAGGATCTGGCGG  
 AGGAGGCAGTGGAGGAGGAGGATCACAGGCTGTGGTTACTCAGGAACCAAGCCTG  
 ACCGTGAGCCCCGGAGGCACAGTCACTCTGACCTGTGGGAGCTCCACAGGAGCTGT  
 GACCACATCTAACTTCCCTAATTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTCGAT  
 CCCTGATCGGGGGAACCAACAACAAGGCCAGCTGGACACCCGCCAGATTTTCTGGC  
 AGTCTGCTGGGCGGGAAAGCCGCTCTGACCATTAGCGGCGCTCAGCCTGAGGACGA  
 AGCAGAGTACTATTGCGCCCTGTGGTATAGTAATCATTGGGTGTTCCGGGTGTGGGAC  
 AAAACTGACCGTGCTGAGA

SEQ ID NO: 70 аминокислотная последовательность тяжелой цепи CP004(hG1TM)  
(полноразмерная)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG  
GGRYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ  
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDAYFPEPVTVSWNSGALTSGV  
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP  
PCPAPEAAAGAPSVFLFPPKPKDATLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP  
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGG  
GSGGGGSQVQLVESGAEVKKGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQCLEWIGL  
INPYNNITNYAQKFQGRVTFTVDTSISTAYMELSRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGT  
LVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTS  
NFPNWVQQKPGQAPRSLIGGTNNKASWTPARFSGSLLGKAALTISGAQPEDEAEYYC  
ALWYSNHWFVFCGGTKLTVLR (Примечание: подчеркнутые части представляют собой  
последовательности CDR)

SEQ ID NO: 71 нуклеотидная последовательность легкой цепи CP004(hG1TM)  
GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGGTC  
ACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTCAGCAG  
AAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTGTCTGG  
AGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGACCATCA  
GCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCC  
CACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAAGTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCGCTCCC  
TCCGTCTTCATTTTTCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCAGCGTG  
GTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAAGTGCAGTGGAAAGGTCGA  
TAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAG  
ATAGCACCTATTCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGAGAAGC  
ACAAAGTGTATGCATGCGAAGTGACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGTGACTAAG  
TCTTTTAACCGGGGCGAATGT

SEQ ID NO: 72 аминокислотная последовательность легкой цепи CP004(hG1TM)  
(полноразмерная)

DIQMTQSPSSMSASVGDRTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV  
SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDASTY  
SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело, где анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело предпочтительно используют для лечения опухоли; предпочтительно анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело вводят в комбинации с компонентом А, где компонент А выбран из анти-VEGFR2 моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, анти-VEGF моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или их комбинации,

где

(1) анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело включает:

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

вторую функциональную область белка, нацеленную на CTLA4,

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

где

иммуноглобулин включает HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 27-29, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 14, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 30-32, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 16; одноцепочечное антитело включает HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 33-35, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 36-38, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 4;

или

иммуноглобулин включает HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 33-35, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 36-38, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 4; одноцепочечное антитело включает HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 27-29, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 14, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 30-32, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 16;

(2) анти-VEGFR2 моноклональное антитело включает HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 53-55, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 50, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 56-58, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 52; или



(3) анти-VEGF моноклональное антитело включает HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 63-65, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 60, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 66-68, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 62.

2. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело по п. 1, где

(1) аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина выбрана из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 18, или ее варианта; аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи иммуноглобулина выбрана из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 20, или ее варианта; аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела выбрана из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 43, или ее варианта; аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи одноцепочечного антитела выбрана из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 44, или ее варианта;

или

аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи иммуноглобулина выбрана из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 43, или ее варианта; аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи иммуноглобулина выбрана из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 42, или SEQ ID NO: 44, или ее варианта; аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела выбрана из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 18, или ее варианта; аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи одноцепочечного антитела выбрана из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 20, или ее варианта;

(2) аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи анти-VEGFR2 моноклонального антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50, или ее вариант; аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи анти-VEGFR2 моноклонального антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52, или ее вариант; или

(3) аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи анти-VEGF моноклонального антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60, или ее вариант; аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи анти-VEGF моноклонального антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62, или ее вариант,

где последовательность варианта имеет гомологию с соответствующей









цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, или ее вариант; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, или ее вариант, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или ее вариант;

(19) аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, или ее вариант, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, или ее вариант; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, или ее вариант, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, или ее вариант;

и

(20) аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, или ее вариант, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, или ее вариант; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, или ее вариант, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, или ее вариант,

где последовательность варианта имеет гомологию с соответствующей последовательностью по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере 99%.

4. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело по любому из пп. 1-3, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40, или ее вариант, и аминокислотная последовательность легкой цепи иммуноглобулина представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, или ее вариант, где последовательность варианта имеет гомологию с соответствующей последовательностью по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере 99%.

5. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело по любому из пп. 1-4, где первая функциональная область белка связана с второй функциональной областью белка либо непосредственно, либо через линкерный фрагмент; и/или вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с вариабельной областью легкой цепи

одноцепочечного антитела либо непосредственно, либо через линкерный фрагмент.

6. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело по п. 5, где линкерный фрагмент представляет собой (GGGGS) $n$ , где  $n$  представляет собой положительное целое число; предпочтительно  $n$  имеет значение 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

7. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело по любому из пп. 1-6, где количество первой и второй функциональных областей белка, каждой независимо, составляет 1, 2 или более.

8. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело по любому из пп. 1-7, где одноцепочечное антитело (предпочтительно вариабельная область тяжелой цепи) связано с тяжелой цепью иммуноглобулина, предпочтительно связано с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина.

9. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело по любому из пп. 1-8, где иммуноглобулин относится к подтипу IgG1 человека;

где, в соответствии с системой нумерации EU, иммуноглобулин включает константную область тяжелой цепи, имеющую А мутацию, выбранную из следующих мутаций:

L234A и L235A; или

L234A и G237A; или

L235A и G237A; или

L234A, L235A и G237A; и

в соответствии с системой нумерации EU, иммуноглобулин включает константную область тяжелой цепи, имеющую В мутацию, выбранную из одной или нескольких из следующих мутаций:

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

или, в соответствии с системой нумерации EU, иммуноглобулин включает константную область тяжелой цепи, имеющую комбинацию А мутации и В мутации;

константная область тяжелой цепи анти-VEGFR2 моноклонального антитела или анти-VEGF моноклонального антитела представляет собой С-область гамма-1 цепи Ig, ACCESSION P01857; константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, ACCESSION P01834.

10. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело по любому из пп. 1-9, где биспецифическое антитело включает:

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

вторую функциональную область белка, нацеленную на CTLA4,

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

где первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а

вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело;

тяжелая цепь иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40, или последовательность, имеющую гомологию с указанной последовательностью по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, и легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, или последовательность, имеющую гомологию с указанной последовательностью по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%;

вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, или последовательность, имеющую гомологию с указанной последовательностью по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, и вариабельная область легкой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, или последовательность, имеющую гомологию с указанной последовательностью по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%;

одноцепочечное антитело связано с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина;

первая функциональная область белка связана с второй функциональной областью белка через первый линкерный фрагмент; вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела через второй линкерный фрагмент; первый линкерный фрагмент и второй линкерный фрагмент являются одинаковыми или отличными друг от друга;

предпочтительно первый линкерный фрагмент и второй линкерный фрагмент каждый имеет аминокислотную последовательность, независимо выбранную из SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26;

предпочтительно, аминокислотные последовательности первого линкерного фрагмента и второго линкерного фрагмента представлены в SEQ ID NO: 26,

предпочтительно легкая цепь анти-PD-1/CTLA-4 биспецифического антитела имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72, и тяжелая цепь анти-PD-1/CTLA-4 биспецифического антитела имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70;

предпочтительно, антигенсвязывающий фрагмент выбран из Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, dAb, Fab/c, фрагмента определяющей комплементарность области (CDR), одноцепочечного антитела (например, scFv), бивалентного антитела или доменного антитела.

11. Фармацевтическая композиция для лечения опухоли (в частности, злокачественной опухоли), включающая эффективное количество анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела по любому из пп. 1-10 и компонента А по любому из пп. 1-10, где массовое соотношение анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела и компонента А предпочтительно выбрано из (1:5)-(5:1), такого как 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1,



3:1, 4:1 или 5:1; предпочтительно фармацевтическая композиция находится в форме твердого вещества или жидкости; необязательно, фармацевтическая композиция дополнительно включает одно или несколько химиотерапевтических средств (предпочтительно химиотерапевтическое средство представляет собой алкилирующее средство, антиметаболит, антибиотик, лекарственное средство растительного происхождения и/или гормональное лекарственное средство, лекарственное средство на основе платины (например, цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин), адриамицин, циклофосфамид, паклитаксел (например, альбумин-связанный паклитаксел, липосомальный паклитаксел и доцетаксел), этопозид, гемцитабин, пеметрексед, капецитабин, олапариб, рукапариб, нирапариб, талазопариб, флузопариб, алкалоид барвинка, тамоксифен, мегестрол, госерелин, аспарагиназу и/или противоопухолевое средство фторурацил).

12. Применение анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела по любому из пп. 1-10 для получения лекарственного средства или набора для профилактики и/или лечения опухоли (в частности, злокачественной опухоли), где лекарственное средство или набор предпочтительно дополнительно включает компонент А по любому из пп. 1-10; необязательно, лекарственное средство или набор дополнительно включает одно или несколько лекарственных средств для лечения опухоли (предпочтительно, лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое средство или ингибитор роста (например, алкилирующее средство, антрациклин, антигормональное средство, ингибитор ароматазы, антиандрогеновое средство, ингибитор протеинкиназы, ингибитор липидкиназы, антисмысловый олигонуклеотид, рибозим, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы, цитотоксин или противоопухолевый антибиотик, ингибитор протеасомы, средство против микротрубочек, антагонист EGFR, антагонист VEGF, антагонист ангиопоэтина 2, ретиноид, ингибитор тирозинкиназы, ингибитор гистондеацетилазы и их комбинацию), средство таргетной терапии (например, ингибитор B-raf, ингибитор MEK, ингибитор K-ras, ингибитор c-Met, ингибитор Alk, ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы, ингибитор Akt, ингибитор mTOR, ингибитор VEGF, ингибитор PARP, двойной ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы/mTOR и их комбинацию), конъюгат антитело-лекарственное средство (такой как майтансин, монометил ауристатин Е, калихемицин, эсперамицин и хелатор радиоизотопов), Т-клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ингибитор ангиогенеза, противоопухолевое средство, вакцину против рака, адъювант и их комбинацию, алкилирующее средство, антиметаболит, антибиотик, лекарственное средство растительного происхождения и/или гормональное лекарственное средство, лекарственное средство на основе платины (например, цисплатин, карбоплатин, и оксалиплатин), адриамицин, циклофосфамид, паклитаксел, альбумин-связанный паклитаксел, липосомальный паклитаксел, доцетаксел, этопозид, гемцитабин, пеметрексед, капецитабин, олапариб, рукапариб, нирапариб, талазопариб, флузопариб, алкалоид барвинка, тамоксифен, мегестрол, госерелин, аспарагиназу и/или противоопухолевое

средство фторурацил).

13. Способ для профилактики и/или лечения опухоли (в частности, злокачественной опухоли), включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела по любому из пп. 1-10 в комбинации с компонентом А по любому из пп. 1-10, и более предпочтительно также в комбинации с одним или несколькими лекарственными средствами для лечения опухоли (предпочтительно, лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое средство или ингибитор роста (например, алкилирующее средство, антрациклин, антигормональное средство, ингибитор ароматазы, антиандрогеновое средство, ингибитор протеинкиназы, ингибитор липидкиназы, антисмысловый олигонуклеотид, рибозим, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы, цитотоксин или противоопухолевый антибиотик, ингибитор протеасомы, средство против микротрубочек, антагонист EGFR, антагонист VEGF, антагонист ангиопоэтина 2, ретиноид, ингибитор тирозинкиназы, ингибитор гистондеацетилазы и их комбинацию), средство таргетной терапии (например, ингибитор B-raf, ингибитор MEK, ингибитор K-ras, ингибитор c-Met, ингибитор Alk, ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы, ингибитор Akt, ингибитор mTOR, ингибитор VEGF, ингибитор PARP, двойной ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы/mTOR и их комбинацию), конъюгат антитело-лекарственное средство (такой как майтансин, монометил ауристатин Е, калихемицин, эсперамицин и хелатор радиоизотопов), Т-клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ингибитор ангиогенеза, противоопухолевое средство, вакцину против рака, адьювант и их комбинацию, алкилирующее средство, антиметаболит, антибиотик, лекарственное средство растительного происхождения и/или гормональное лекарственное средство, лекарственное средство на основе платины (например, цисплатин, карбоплатин, и оксалиплатин), адриамицин, циклофосфамид, паклитаксел (например, альбумин-связанный паклитаксел, липосомальный паклитаксел и доцетаксел), этопозид, гемцитабин, пеметрексед, капецитабин, олапариб, рукапариб, нирапариб, талазопариб, флузопариб, алкалоид барвинка, тамоксифен, мегестрол, госерелин, аспарагиназу и/или противоопухолевое средство фторурацил), где анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело, компонент А и противоопухолевое химиотерапевтическое средство предпочтительно вводят одновременно или последовательно.

14. Набор для профилактики и/или лечения опухоли (в частности, злокачественной опухоли), включающий (а) первую фармацевтическую композицию, включающую анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело по любому из пп. 1-10 в качестве активного ингредиента; (б) вторую фармацевтическую композицию, включающую компонент А по любому из пп. 1-10 в качестве активного ингредиента; и необязательно (с) одно или несколько лекарственных средств для лечения опухоли (предпочтительно, лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое средство или ингибитор роста (например, алкилирующее средство, антрациклин, антигормональное средство, ингибитор ароматазы, антиандрогеновое средство, ингибитор протеинкиназы, ингибитор

липидкиназы, антисмысловой олигонуклеотид, рибозим, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы, цитотоксин или противоопухолевый антибиотик, ингибитор протеасомы, средство против микротрубочек, антагонист EGFR, антагонист VEGF, антагонист ангиопоэтина 2, ретиноид, ингибитор тирозинкиназы, ингибитор гистондеацетилазы и их комбинацию), средство таргетной терапии (например, ингибитор B-raf, ингибитор MEK, ингибитор K-ras, ингибитор c-Met, ингибитор Alk, ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы, ингибитор Akt, ингибитор mTOR, ингибитор VEGF, ингибитор PARP, двойной ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы/mTOR и их комбинацию), конъюгат антитело-лекарственное средство (такой как майтансин, монометил ауристатин Е, калихемицин, эсперамицин и хелатор радиоизотопов), Т-клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ингибитор ангиогенеза, противоопухолевое средство, вакцину против рака, адьювант и их комбинацию, алкилирующее средство, антиметаболит, антибиотик, лекарственное средство растительного происхождения и/или гормональное лекарственное средство, лекарственное средство на основе платины (например, цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин), адриамицин, циклофосфамид, паклитаксел (например, альбумин-связанный паклитаксел, липосомальный паклитаксел и доцетаксел), этопозид, гемцитабин, пеметрексед, капецитабин, олапариб, рукапариб, нирапариб, талазопариб, флузопариб, алкалоид барвинка, тамоксифен, мегестрол, госерелин, аспарагиназу и/или противоопухолевое средство фторурацил).

15. Стандартная лекарственная форма, предпочтительно используемая для лечения опухоли (в частности, злокачественной опухоли), где стандартная лекарственная форма включает 1-10000 мг (предпочтительно 10-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг или 200 мг) анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела по любому из пп. 1-10, 1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг) компонента А по любому из пп. 1-10 и, необязательно, одно или несколько лекарственных средств для лечения опухоли (предпочтительно, лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое средство или ингибитор роста (например, алкилирующее средство, антрациклин, антигормональное средство, ингибитор ароматазы, антиандрогеновое средство, ингибитор протеинкиназы, ингибитор липидкиназы, антисмысловой олигонуклеотид, рибозим, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы, цитотоксин или противоопухолевый антибиотик, ингибитор протеасомы, средство против микротрубочек, антагонист EGFR, антагонист VEGF, антагонист ангиопоэтина 2, ретиноид, ингибитор тирозинкиназы, ингибитор гистондеацетилазы и их комбинацию), средство таргетной терапии (например, ингибитор B-raf, ингибитор MEK, ингибитор K-ras, ингибитор c-Met, ингибитор Alk, ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы, ингибитор Akt, ингибитор mTOR, ингибитор VEGF, ингибитор PARP, двойной ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы/mTOR и их комбинацию), конъюгат антитело-лекарственное средство (такой как майтансин, монометил ауристатин Е, калихемицин, эсперамицин и хелатор радиоизотопов), Т-клетку,

экспрессирующую химерный антигенный рецептор, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ингибитор ангиогенеза, противоопухолевое средство, вакцину против рака, адъювант и их комбинацию, антиметаболит, антибиотик, лекарственное средство растительного происхождения и/или гормональное лекарственное средство, лекарственное средство на основе платины (например, цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин), адриамицин, циклофосфамид, паклитаксел (например, альбумин-связанный паклитаксел, липосомальный паклитаксел и доцетаксел), этопозид, гемцитабин, пеметрексед, капецитабин, олапариб, рукапариб, нирапариб, талазопариб, флузопариб, алкалоид барвинка, тамоксифен, мегестрол, госерелин, аспарагиназу и/или противоопухолевое средство фторурацил); где анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело, компонент А и химиотерапевтическое средство упакованы отдельно.

16. Способ для профилактики или лечения рака или опухоли, где способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, одной или нескольких стандартных лекарственных форм по п. 15; предпочтительно анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело, компонент А и химиотерапевтическое средство в стандартной лекарственной форме каждое вводят отдельно.

17. Отдельная дозированная единица, предпочтительно используемая для лечения опухоли (в частности, злокачественной опухоли) и включающая 0,1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг) анти-CTLA4 анти-PD-1 биспецифического антитела по любому из пп. 1-10 и 0,1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг) компонента А по любому из пп. 1-10.

18. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело по любому из пп. 1-10, фармацевтическая композиция по п. 11, применение по п. 12, способ по п. 13, набор по п. 14, стандартная лекарственная форма по п. 15 или способ по п. 16, где

опухоль выбрана из одной или нескольких из следующих:

рак шейки матки (например, метастатический рак шейки матки), рак легкого, такой как немелкоклеточный рак легкого (например, например, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого или неплюскоклеточный немелкоклеточный рак легкого), рак пищевода, плоскоклеточный рак пищевода, илеоцекальная аденокарцинома, пузырьчатая аденокарцинома, мелкоклеточный рак легкого, рак желудка (например, прогрессирующий рак желудка, аденокарцинома желудка или аденокарцинома пищеводно-желудочного перехода), рак почки, рак эндометрия, адренкортикальная карцинома, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, перитонеальный рак, аденокарцинома, рак поджелудочной железы, глиома, рак головы и шеи, рак кости, тестикулярный рак, лейкоз, миелома, лимфома, саркома, мезотелиома, гепатоцеллюлярная карцинома, рак толстой кишки, рак желчных протоков, холангиокарцинома, рак прямой кишки, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак яичника (например, прогрессирующий рак яичника) или рак фаллопиевых труб, крупноклеточный нейроэндокринный рак, уротелиальная карцинома (например, уротелиальная карцинома верхних мочевыводящих путей или рак мочевого

пузыря), рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы, периферическая Т-клеточная лимфома, меланома, назофарингеальный рак, солидные опухоли с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-H) или дефицитом репарации неспаренных оснований (dMMR), рак головного мозга (например, агрессивный рак головного мозга, такой как глиобластома), рак яичника, плоскоклеточная карцинома, базальноклеточная карцинома, аденома, муцинозная или серозная цистаденокарцинома, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, хориоэпителиома, злокачественная хорионаденома, злокачественная опухоль из клеток Сертоли-стромальных клеток, злокачественная гранулоцитомы и дисгерминома.

19. Анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело по любому из пп. 1-10, фармацевтическая композиция по п. 11, применение по п. 12, способ по п. 13, набор по п. 14, стандартная лекарственная форма по п. 15 или способ по п. 16, где анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифическое антитело, компонент А и/или химиотерапевтическое средство находится в форме, подходящей для внутривенной инъекции или внутривенной капельной инфузии, предпочтительно в жидкой форме.

20. Способ по п. 13 или 16, где стадию введения субъекту эффективного количества анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела осуществляют до или после хирургического лечения и/или до или после лучевой терапии.

21. Способ по п. 13 или 16, где стандартная доза анти-CTLA4 анти-PD-1 биспецифического антитела составляет 0,1-100 мг, предпочтительно 1-10 мг на кг массы тела; альтернативно, стандартная доза анти-CTLA4-анти-PD-1 биспецифического антитела составляет 10-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг или 200 мг для каждого субъекта;

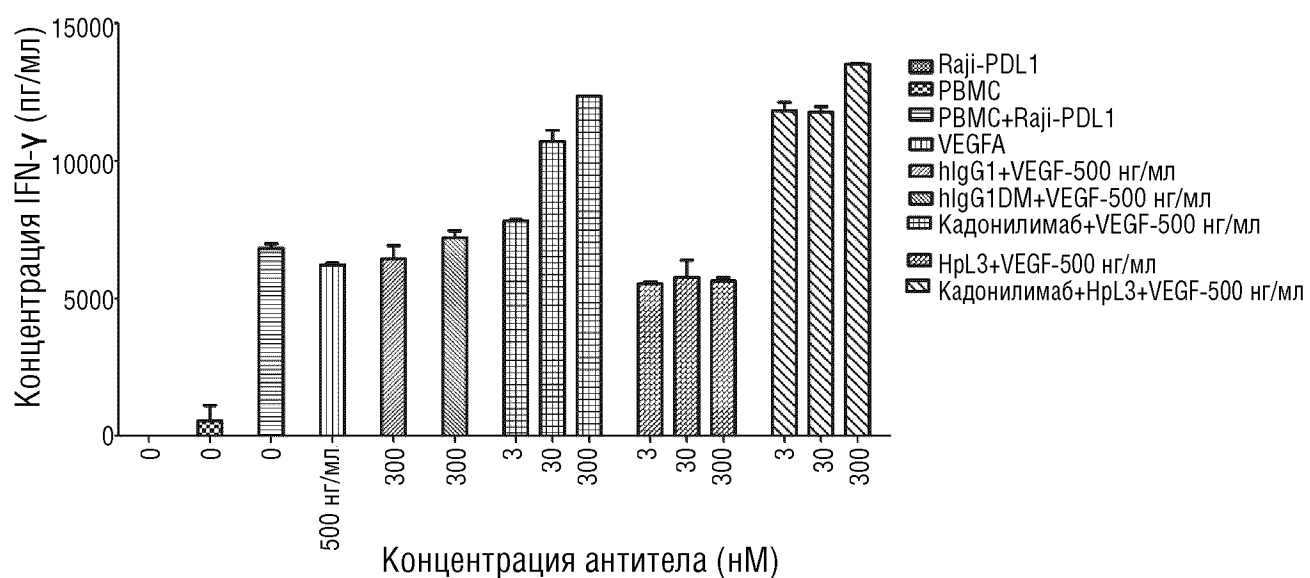
стандартная доза компонента А составляет 0,1-100 мг, предпочтительно 1-10 мг на кг массы тела; альтернативно, стандартная доза компонента А составляет 10-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг для каждого субъекта;

предпочтительно дозу вводят от двух раз в день до примерно одного раза в два дня или одного раза в 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 10 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель или 6 недель;

предпочтительно путь введения представляет собой внутривенную капельную инфузию или внутривенную инъекцию.

По доверенности

ФИГ.1



ФИГ.2

