

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033817**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.28

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) Номер заявки
201690667

(22) Дата подачи заявки
2014.09.26

(54) **КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИТЕЛО К PDL1**

(31) **61/883,953**

(56) **WO-A1-2013019906**
WO-A1-2013093809
WO-A2-2012003470
WO-A1-2013079174

(32) **2013.09.27**

(33) **US**

(43) **2016.08.31**

(86) **PCT/US2014/057821**

(87) **WO 2015/048520 2015.04.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ян Ин, Алаватгам Сридхара (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении предлагаются стабильные водные фармацевтические композиции, содержащие антитело к PDL1. В изобретении также предлагаются способы получения таких композиций и способы применения таких композиций.

033817

B1

033817
B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Заявка на данный патент испрашивает приоритет на основании предварительной заявки № 61/883953, поданной 27 сентября 2013 г., полностью включенной в настоящее изобретение с помощью ссылки.

Подача списка последовательностей в текстовом файле формата ASCII

Содержание следующей подачи текстового файла ASCII полностью включено в настоящее изобретение с помощью ссылки: машиночитаемая форма (CRF) списка последовательностей (имя файла: 146392022040SEQLIST.TXT, дата записи: 26 сентября 2014 г., размер: 24 Кб).

Область техники

Настоящее изобретение относится к стабильным водным фармацевтическим композициям, содержащим антитело к PDL1.

Уровень техники

Обеспечение двух отдельных сигналов к Т-клеткам представляет собой широко распространенную модель лимфоцитарной активации оставшихся Т-лимфоцитов антиген-презентирующими клетками (APC). Lafferty et al., *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 53: 27-42 (1975). Данная модель дополнительно обеспечивает распознавание своих и чужих и иммунную толерантность. Bretscher et al., *Science* 169: 1042-1049 (1970); Bretscher, P.A., *P.N.A.S. USA* 96: 185-190 (1999); Jenkins et al., *J. Exp. Med.* 165: 302-319 (1987). Первичный сигнал или антиген-специфичный сигнал передается через Т-клеточный рецептор (TCR) после распознавания чужеродного антигенного пептида, презентируемого в контексте главного комплекса гистосовместимости (МНС). Второй или костимулирующий сигнал доставляется Т-клеткам с помощью костимулирующих молекул, экспрессированных на антиген-презентирующих клетках (APC), и индуцирует Т-клетки для стимулирования клональной экспансии, секреции цитокинов и эффекторной функции. Lenschow et al., *Ann. Rev. Immunol.* 14:233 (1996). При отсутствии костимуляции Т-клетки могут стать невосприимчивыми к антигенной стимуляции, они не вызывают эффективный иммунный ответ, и далее это может приводить к истощению или к устойчивости к чужеродным антигенам.

В двухсигнальной модели Т-клетки получают оба сигнала: как положительный, так и отрицательный вторичный костимулирующий сигнал. Регуляция таких положительных и отрицательных сигналов является критической для максимизации защитной иммунной реакции хозяина, с поддержанием при этом иммунной устойчивости и предотвращением аутоиммунитета. Отрицательные вторичные сигналы, по-видимому, необходимы для индукции Т-клеточной устойчивости, в то время как положительные сигналы стимулируют Т-клеточную активацию. В то время как простая двухсигнальная модель все еще обеспечивает достоверное объяснение для наивных лимфоцитов, при этом иммунная реакция представляет собой динамичный процесс, и костимулирующие сигналы к антиген-экспонированным Т-клеткам также могут обеспечиваться. Механизм костимуляции представляет интерес с терапевтической точки зрения, так как было показано, что манипуляции с костимулирующими сигналами обеспечивают средства либо для усиления, либо для терминации иммунного ответа. Недавно было обнаружено, что Т-клеточная дисфункция или анергия появляется одновременно с индуцированной и стойкой экспрессией ингибирующего рецептора, полипептида 1 программируемой клеточной смерти (PD-1). В результате терапевтическая направленность PD-1 и других молекул, которые передают сигнал через взаимодействия с PD-1, таких как лиганд 1 программируемой смерти (PD-L1) и лиганд 2 программируемой смерти (PD-L2), является областью интенсивного интереса.

PD-L1 сверхэкспрессируется при множестве злокачественных новообразований и часто ассоциирован с неблагоприятным прогнозом (Okazaki T et al., *Intern. Immun.* 2007, 19(7):813) (Thompson RH et al., *Cancer Res* 2006, 66(7):3381). Интересно, что большинство опухолевых инфильтрирующихся Т-лимфоцитов с преобладанием экспрессируют PD-1, в отличие от Т-лимфоцитов в нормальных тканях и в Т-лимфоцитах периферической крови, что выявляет положительную регуляцию PD-1 в отношении опухоль-реактивных Т-клеток и может способствовать пониженному иммунному ответу (Blood 2009, 114(8):1537). Это может быть связано с применением сигнального пути PD-L1, опосредованного опухолевыми клетками, экспрессирующими PD-L1 и взаимодействующими с Т-клетками, экспрессирующими PD-1, с итоговым ослаблением Т-клеточной активации и уклонением от иммунного надзора (Sharpe et al., *Nat Rev* 2002) (Keir ME et al., 2008 *Annu. Rev. Immunol.* 26:677). Таким образом, ингибирование взаимодействия PD-L1/PD-1 может усиливать CD8⁺ Т-клеточно-опосредованное уничтожение опухолей.

Терапевтическая направленность PD-1 и других молекул, которые передают сигнал через взаимодействия с PD-1, таких как лиганд 1 программируемой смерти (PD-L1) и лиганд 2 программируемой смерти (PD-L2), является областью интенсивного интереса. Ингибировать сигналы PD-L1 предлагалось в качестве средств для усиления Т-клеточного иммунитета (например, противоопухолевого иммунитета) для лечения злокачественного новообразования и инфекции, включая как острую, так и хроническую (например, стойкую) инфекцию. Однако оптимального терапевтического средства, направленного на мишень по данному пути, еще не коммерциализировали, и в этом заключается значительная нереализованная потребность медицины.

Все ссылки, процитированные в настоящем изобретении, включающие патентные заявки, патентные публикации и регистрационные номера UniProtKB/Swiss-Prot, включены в настоящее изобретение

полностью с помощью ссылки так, как если бы каждый из этих документов был конкретно и индивидуально указан для включения с помощью ссылки.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предлагаются стабильные водные фармацевтические композиции, содержащие антитело. Композиция содержит антитело (например, антитело к PDL1), буфер, сахарозу и поверхностно-активное вещество, где композиция имеет рН примерно от 5 примерно до 7.

В одном аспекте настоящего изобретения предлагается стабильная водная фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело к PDL1 в концентрации примерно от 40 примерно до 125 мг/мл, ацетат гистидина или ацетат натрия в концентрации примерно от 15 примерно до 25 мМ, сахарозу в концентрации примерно от 60 примерно до 240 мМ, полисорбат в концентрации примерно от 0,005 примерно до 0,06% мас./об., и имеющая рН примерно от 5 примерно до 6,3.

В некоторых воплощениях моноклональное антитело в композиции составляет примерно от 40 примерно до 80 мг/мл. В некоторых воплощениях моноклональное антитело в композиции составляет примерно от 54 примерно до 66 мг/мл. В некоторых воплощениях моноклональное антитело в композиции составляет примерно от 60 мг/мл. В некоторых воплощениях моноклональное антитело в композиции составляет примерно от 60 примерно до 125 мг/мл. В некоторых воплощениях моноклональное антитело в композиции составляет примерно от 125 мг/мл.

В некоторых воплощениях указанный ацетат гистидина или ацетат натрия присутствует в композиции в концентрации, составляющей примерно от 17 примерно до 22 мМ. В некоторых воплощениях указанный ацетат гистидина или ацетат натрия присутствует в композиции в концентрации, составляющей примерно 20 мМ.

В некоторых воплощениях указанная сахароза в композиции составляет примерно от 60 примерно до 180 мМ. В некоторых воплощениях указанная сахароза в композиции составляет примерно 120 мМ. В некоторых воплощениях указанная сахароза в композиции составляет примерно 240 мМ.

В некоторых воплощениях композиция имеет рН примерно от 5,5 примерно до 6,1. В некоторых воплощениях композиция имеет рН примерно от 5,5 примерно до 5,8.

В некоторых воплощениях указанный полисорбат в композиции представляет собой полисорбат 20. В некоторых воплощениях указанный полисорбат (например, полисорбат 20) в композиции составляет примерно от 0,02 примерно до 0,04%.

В некоторых воплощениях указанное моноклональное антитело составляет в композиции примерно 60 мг/мл, сахароза составляет примерно 120 мМ, и рН композиции составляет примерно 5,8. В некоторых воплощениях указанное моноклональное антитело составляет в композиции примерно 125 мг/мл, сахароза составляет примерно 240 мМ, и рН композиции составляет примерно 5,5.

В некоторых воплощениях композиция содержит моноклональное антитело (например, антитело к PDL1, описанное в настоящем изобретении) в количестве примерно 60 мг/мл, ацетат гистидина в концентрации примерно 20 мМ, сахарозу в концентрации примерно 120 мМ и полисорбат, который представляет собой полисорбат 20, в концентрации 0,04% мас./об., и имеет рН примерно 5,8.

В некоторых воплощениях композиция содержит моноклональное антитело в количестве примерно 125 мг/мл, ацетат гистидина в концентрации примерно 20 мМ, сахарозу в концентрации примерно 240 мМ и полисорбат, который представляет собой полисорбат 20, в концентрации 0,02% мас./об., и композиция имеет рН примерно 5,5.

В некоторых воплощениях указанное моноклональное антитело в композиции не подвергается предварительной лиофилизации. В некоторых воплощениях указанное моноклональное антитело в композиции представляет собой полноразмерное антитело. В некоторых воплощениях моноклональное антитело в композиции представляет собой антитело IgG1. В некоторых воплощениях указанное моноклональное антитело в композиции представляет собой гуманизованное антитело. В некоторых воплощениях моноклональное антитело в композиции представляет собой фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающий участок. В некоторых воплощениях фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab или F(ab')₂.

В некоторых воплощениях указанное моноклональное антитело в композиции содержит:

(а) переменный участок легкой цепи, содержащий:

- (1) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 1);
- (2) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SASFLYS (SEQ ID NO: 2);
- (3) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 3); и

(б) переменный участок тяжелой цепи, содержащий:

- (1) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 4);
- (2) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 5);
- (3) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 6).

В некоторых воплощениях указанное моноклональное антитело в композиции содержит переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некото-

рых воплощениях указанное моноклональное антитело в композиции содержит переменный участок легкой цепи, имеющий по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с переменным участком легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный участок тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с переменным участком тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых воплощениях указанное моноклональное антитело в композиции содержит переменный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях указанное моноклональное антитело в композиции содержит переменный участок легкой цепи, имеющий по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с переменным участком легкой цепи, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный участок тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с переменным участком тяжелой цепи, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32. В некоторых воплощениях указанное моноклональное антитело в композиции содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых воплощениях указанное моноклональное антитело в композиции содержит легкую цепь, имеющую по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с легкой цепью, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с тяжелой цепью, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В некоторых воплощениях композицию, содержащую антитело, хранят в стеклянном флаконе или в контейнере из металлического сплава. В некоторых воплощениях металлический сплав представляет собой нержавеющую сталь 316L или сплав "Хастеллой". В некоторых воплощениях композиция стабильна при 2-8°C в течение по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяцев. В некоторых воплощениях антитело в композиции сохраняет после хранения по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% от биологической активности до хранения. В некоторых воплощениях биологическую активность измеряют путем связывания антитела с PD-L1.

В некоторых воплощениях композиция, описанная в настоящем изобретении, является стерильной. В некоторых воплощениях композиция, описанная в настоящем изобретении, подходит для введения объекту. В некоторых воплощениях композиция, описанная в настоящем изобретении, предназначена для внутривенного (IV) введения.

В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается готовое изделие или набор, содержащий контейнер, содержащий любую из стабильных водных композиций, описанных выше и в настоящем изобретении. В некоторых воплощениях контейнер представляет собой стеклянный флакон или контейнер из металлического сплава. В некоторых воплощениях металлический сплав представляет собой нержавеющую сталь 316L или сплав "Хастеллой".

В другом аспекте в настоящем изобретении предлагается способ лечения заболевания или расстройства у объекта, включающий введение объекту эффективного количества композиции, описанной в настоящем изобретении, где заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из инфекции, злокачественного новообразования и воспалительного заболевания.

Следует понимать, что одно, некоторые или все свойства различных воплощений, описанных в настоящем изобретении, могут быть объединены с образованием других воплощений настоящего изобретения. Эти и другие аспекты изобретения очевидны специалисту в данной области. Эти и другие воплощения изобретения дополнительно описаны с помощью подробного описания, которое следует далее.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой ряд графиков, демонстрирующих статистический анализ данных стабильности композиций α -PDL1 при 40°C, полученных с помощью ICIEF (капиллярное изоэлектрическое фокусирование под контролем изображения) с использованием программного обеспечения JMP. А) Средняя потеря главного пика на основе дробного факторного дизайна эксперимента (DOE). В) Анализ главного пика на основе дробного факторного DOE. Главный пик содержит заряженные частицы α -PDL1 с таким же pH, как pI (изоэлектрическая точка) молекулы.

Фиг. 2 представляет собой ряд графиков, демонстрирующих статистический анализ данных стабильности композиций α -PDL1 при 25°C, полученных с помощью ICIEF с использованием программного обеспечения JMP. А) Средняя потеря главного пика на основе дробного факторного дизайна эксперимента (DOE). В) Анализ главного пика на основе дробного факторного DOE. Главный пик содержит заряженные частицы α -PDL1 с таким же pH, как pI (изоэлектрическая точка) молекулы.

Фиг. 3 представляет собой ряд графиков, демонстрирующих статистический анализ данных стабильности композиций α -PDL1 при 40°C, полученных с помощью эксклюзионной ВЭЖХ с использова-

нием программного обеспечения JMP. А) Средняя потеря главного пика на основе дробного факторного дизайна эксперимента (DOE). В) Анализ главного пика на основе дробного факторного DOE. Главный пик содержит мономер α -PDL1.

Фиг. 4 представляет собой ряд графиков, демонстрирующих статистический анализ данных стабильности композиций α -PDL1 при 25°C, полученных с помощью эксклюзивной ВЭЖХ с использованием программного обеспечения JMP. А) Средняя потеря главного пика на основе дробного факторного дизайна эксперимента (DOE). В) Анализ главного пика на основе дробного факторного эксперимента DOE. Главный пик содержит мономер α -PDL1.

Фиг. 5 представляет собой график, демонстрирующий отсутствие значительной деградации PS20 различных композиций α -PDL1, которые хранили при различных температурах и времени. График процентного содержания (%) PS20, оставшегося в композиции, которое детектировали с помощью испарительного детектора светорассеяния (ELSD) в композициях F1-F10. На графике а соответствует нулевому моменту времени (Т0); b соответствует 40°C, 1 М; с соответствует 25°C, 2 М; d соответствует 5°C, 2 М; e соответствует 5°C, 6 М; f соответствует 5°C, 6 М, 20-мл стеклянный флакон (GV), высокое заполнение; g соответствует 5°C, 6 М, 20-мл стеклянный флакон (GV), низкое заполнение.

Фиг. 6 представляет собой ряд графиков, демонстрирующих стабильность композиций α -PDL1, которые хранили при -20°C или при 5°C в течение до 6 месяцев в стеклянном флаконе (GV). А) График процентного содержания (%) мономера в композициях после пяти циклов замораживания-оттаивания во время хранения при -20°C в течение указанного времени. В) График процентного содержания (%) мономера в композициях, которые хранили при 5°C в течение указанного времени. С) График процентного содержания (%) главного пика, полученного из композиции после пяти циклов замораживания-оттаивания во время хранения при -20°C в течение указанного времени. D) График процентного содержания (%) главного пика, полученного из композиции, которую хранили при 5°C в течение указанного времени.

Фиг. 7 представляет собой ряд графиков, демонстрирующих стабильность композиции α -PDL1 после трех циклов замораживания-оттаивания и хранения в небольшой банке из нержавеющей стали (SS) или из сплава "хастеллой". А) График процентного содержания (%) мономера в композиции после хранения при указанной температуре в течение 3 месяцев. В) График процентного содержания (%) главного пика в композиции после хранения при указанной температуре в течение 3 месяцев.

Фиг. 8 представляет собой ряд графиков, демонстрирующих стабильность композиции α -PDL1 при хранении в 20-мл флаконе. А) График процентного содержания (%) мономера в композиции после хранения при указанной температуре в течение 3 месяцев. В) График процентного содержания (%) главного пика в композиции после хранения при указанной температуре в течение 3 месяцев.

Фиг. 9 представляет собой ряд графиков, демонстрирующих стабильность композиций α -PDL1, содержащих различные концентрации PS20 при взбалтывании в стеклянных флаконах. А) График процентного содержания (%) мономера в композициях после взбалтывания в течение указанного времени при комнатной температуре. В) График мутности по измерениям с помощью поглощения при 350 нм после взбалтывания в течение указанного времени при комнатной температуре.

Фиг. 10 представляет собой график, демонстрирующий стабильность композиций α -PDL1, которые хранили в стеклянных флаконах в течение периода времени при указанной температуре и затем подвергали взбалтыванию. Изменение процентного содержания мономера в композициях измеряли с помощью SEC (эксклюзивная хроматография).

Фиг. 11 представляет собой ряд графиков, демонстрирующих сравнимость потерь α -PDL1 в неделю при повышении pH. А) График процентного содержания потерь (%) мономера в неделю в композиции после хранения при 40°C. В) График процентного содержания потерь (%) главного пика в неделю в композиции после хранения при 40°C.

Подробное описание

I. Определения.

Перед тем как изобретение будет подробно описано, следует понимать, что оно не ограничено конкретными композициями или биологическими системами, которые, конечно, могут варьироваться. Также понятно, что используемая в настоящем изобретении терминология предназначена исключительно для целей описания конкретных воплощений и не предназначена для ограничения. В настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число до тех пор, пока из контекста очевидно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на "молекулу" обязательно включает комбинацию двух или более таких молекул и т.п.

Термин "примерно" при использовании в настоящем изобретении относится к обычному интервалу погрешности для соответствующего значения, который хорошо известен специалисту в данной области. Ссылка на "примерное" значение или параметр в настоящем изобретении включает (и описывает) воплощения, которые относятся, по существу, к значению или параметру.

Понятно, что аспекты и воплощения изобретения, описанные в настоящем изобретении, включают "содержащие", "состоящие" и "по существу состоящие из" аспектов и воплощений.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который представлен в такой форме, чтобы позволить биологической активности активного ингредиента быть эффективной, и который не содержит никаких дополнительных компонентов, которые неприемлемо токсичны по отношению к объекту, которому вводят эту композицию. Такие композиции стерильны. "Фармацевтически приемлемые" вспомогательные вещества (носители, добавки) это вещества, которые могут целесообразно вводиться объекту-млекопитающему с обеспечением эффективной дозы применяемого активного ингредиента.

"Стерильная" композиция представляет собой асептическую или свободную или по существу свободную от всех живых микроорганизмов и от их спор.

"Замороженная" композиция представляет собой композицию при температуре ниже 0°C. Как правило, замороженная композиция не является лиофилизованной, не подвергалась лиофилизации ранее, не будет подвергаться впоследствии. В некоторых воплощениях замороженная композиция содержит замороженное лекарственное вещество для хранения (в банке из нержавеющей стали) или замороженный лекарственный продукт (во флаконе конечной конфигурации).

"Стабильная" композиция представляет собой такую композицию, в которой белок, по существу, сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность при хранении. Предпочтительно, композиция по существу сохраняет свою физическую и химическую стабильность, а также свою биологическую активность при хранении. Период хранения, как правило, выбирают на основе предназначенного срока хранения композиции. Различные аналитические методы для измерения стабильности белка доступны в данной области и рассмотрены, например, в Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). Стабильность может измеряться при выбранной температуре для выбранного периода времени. Стабильность может оцениваться качественно и/или количественно множеством различных способов, включающих оценку образования агрегатов (например, с использованием эксклюзионной хроматографии, путем измерения мутности и/или с помощью визуального осмотра); путем оценки гетерогенности заряда с использованием катионообменной хроматографии, капиллярного изоэлектрического фокусирования под контролем изображения (icIEF) или капиллярного зонного электрофореза; анализа N-концевой или C-концевой последовательности; масс-спектрометрического анализа; анализа SDS-PAGE для сравнения уменьшенного и интактного антитела; анализа пептидной карты (например, по трипсину или LYS-C); оценки биологической активности или антигенсвязывающей функции антитела; и т.д. Нестабильность может включать в себя любое одно или несколько из следующих проявлений: агрегацию, дезамидирование (например, дезамидирование Asn), окисление (например, окисление Met), изомеризацию (например, изомеризацию Asp), клиппирование/гидролиз/фрагментацию (например, фрагментацию шарнирного участка), образование сукцинимидов, неспаренного цистеина(ов), N-концевой протяжки, C-концевое процессирование, различия гликозилирования и т.д.

Белок "сохраняет свою физическую стабильность" в фармацевтической композиции, если она демонстрирует отсутствие признаков агрегации или очень слабую агрегацию, осаждение и/или денатурацию при визуальной оценке цвета и/или прозрачности или по измерениям с помощью рассеивания УФ-излучения или с помощью эксклюзионной хроматографии.

Белок "сохраняет свою химическую стабильность" в фармацевтической композиции, если химическая стабильность в данное время является такой, что предполагается, что белок все еще сохраняет свою биологическую активность, как определено ниже. Химическая стабильность может оцениваться путем детектирования и количественной оценки измененных форм белка. Химическое изменение может включать в себя модификацию размера (например, отсечение), которая может оцениваться, например, с использованием эксклюзионной хроматографии, SDS-PAGE и/или времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI/TOF MS). Другие типы химического изменения включают изменение заряда (например, проявление в виде дезамидирования), которое может оцениваться, например, с помощью ионообменной хроматографии или icIEF.

Антитело "сохраняет свою биологическую активность" в фармацевтической композиции, если биологическая активность антитела в данное время составляет по меньшей мере 60% (в пределах погрешности анализа) биологической активности, демонстрируемой во время приготовления фармацевтической композиции, которую определяли с помощью анализа (например, анализа связывания с антигеном). Другие анализы "биологической активности" для антител подробно рассмотрены в настоящем изобретении ниже.

При использовании в настоящем изобретении "биологическая активность" моноклонального антитела включает способность антитела связываться с антигеном и, как результат, измеряемую биологическую реакцию, которая может быть измерена *in vitro* или *in vivo*.

"Дезамидированное" моноклональное антитело в настоящем изобретении представляет собой такое антитело, в котором один или несколько аспарагиновых остатков являются модифицированными, например, до аспарагиновой кислоты или до изоаспарагиновой кислоты.

"Окисленное" моноклональное антитело в настоящем изобретении представляет собой такое антитело, в котором один или несколько остатков триптофана и/или один или несколько остатков метионина

являются окисленными.

"Гликозилированное" моноклональное антитело в настоящем изобретении представляет собой такое антитело, в котором один или несколько остатков лизина являются гликозилированными.

Антитело, которое "чувствительно к дезамидированию", представляет собой антитело, содержащее один или несколько остатков, которые, как было обнаружено, чувствительны к дезамидированию.

Антитело, которое "чувствительно к окислению", представляет собой антитело, содержащее один или более остатков, которые, как было обнаружено, чувствительны к окислению.

Антитело, которое "чувствительно к агрегации", представляет собой антитело, которое, как было обнаружено, агрегирует с другими антителными молекулами, особенно при замораживании и/или взбалтывании.

Антитело, которое "чувствительно к фрагментации", представляет собой антитело, которое, как было обнаружено, расщепляется на два или более фрагментов, например, в его шарнирном участке.

Под "уменьшением дезамидирования, окисления, агрегации или фрагментации" подразумевают предотвращение или снижение количества дезамидирования, окисления, агрегации или фрагментации относительно моноклонального антитела, которое включено в другую композицию.

Антитело, которое включено в композицию, предпочтительно является чистым и желателно по существу гомогенным (например, свободно от контаминирующих белков и т.д.). "По существу чистое" антитело означает композицию, содержащую по меньшей мере примерно 90 мас.% антитела в пересчете на суммарную массу белков в композиции, предпочтительно, по меньшей мере примерно 95 мас.%. "По существу чистое" антитело означает композицию, содержащую по меньшей мере примерно 90 мас.% антитела в пересчете на суммарную массу белков в композиции, предпочтительно, по меньшей мере примерно 95 мас.%.

Под "изотонической композицией" подразумевают, что композиция, представляющая интерес, имеет по существу такое же осмотическое давление, как в человеческой крови. Изотонические композиции, как правило, имеют осмотическое давление примерно от 250 до 350 мОсм. Изотоничность может быть измерена, например, с использованием осмометра с типом измерения по давлению пара или производства льда.

Использованный здесь термин, "буфер" относится к буферному раствору, который препятствует изменениям pH действием его кислотно-основных сопряженных компонентов. Буфер по настоящему изобретению предпочтительно имеет pH в интервале примерно от 4,5 примерно до 7, предпочтительно примерно от 5,6 примерно до 7, например, примерно от 5,6 до 6,9, 5,7-6,8, 5,8-6,7, 5,9-6,6, 5,9-6,5, 6, 6-6,4, или 6,1-6,3. В одном воплощении буфер имеет pH 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 или 7. Например, фосфат натрия является примером буфера, который будет контролировать pH в данном интервале.

При использовании в настоящем изобретении термин "поверхностно-активное вещество" относится к поверхностно-активному агенту, предпочтительно к неионному поверхностно-активному веществу. Примеры поверхностно-активных веществ настоящего изобретения включают полисорбат (например, полисорбат 20 и полисорбат 80); полоксамер (например, полоксамер 188); Тритон; додецилсульфат натрия (SDS); лаурилсульфат натрия; октилгликозид натрия; лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарилсульфобетаин; лаурил-, миристил-, линолеил-или стеарилсаркозин; линолеил-, миристил- или цетилбетаин; лауроамидопропил-, кокамидопропил-, линолеамидопропил-, миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропилбетаин (например, лауроамидопропил); миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропилдиметиламин; натрия метилкокоил-, или динатрия метилолеилтаурат; и серии MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Патерсон, Нью Джерси); полиэтиленгликоль, полипропилгликоль и сополимеры этиленгликоля и пропиленгликоля (например, Pluronic, PF68 и т.д.); и т.д. В одном воплощении поверхностно-активное вещество настоящего изобретения представляет собой полисорбат 20.

С фармацевтической точки зрения в контексте изобретения "терапевтически эффективное количество" антитела относится к количеству, эффективному для предотвращения или лечения расстройства, для лечения которого антитело эффективно. "Расстройство" представляет собой патологическое состояние, улучшению которого способствует лечение с использованием антитела. Это включает хронические или острые расстройства или заболевания, включающие такие патологические состояния, которые провоцируют млекопитающее к рассматриваемому расстройству.

"Консервант" представляет собой соединение, которое необязательно может быть включено в композицию для существенного сокращения там бактерий, таким образом, способствуя, например, получению композиции для универсального использования. Примеры потенциальных консервантов включают хлорид октадецилдиметилбензил аммония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, (смесь хлоридов алкилбензилдиметиламмония, в которых алкильные группы являются соединениями с длинной цепью), и хлорид бензетония. Другие типы консервантов включают ароматические спирты, такие как фенол, бутиловый и бензиловый спирты, алкилпарабены, такие как метилпарабен и пропилпарабен, катехол, резорцинол, циклогексанол, 3-пентанол и m-крезол. В одном воплощении консервант настоящего изобретения представляет собой бензиловый спирт.

При использовании в настоящем изобретении термин "лечение" относится к клиническому вмешательству, разработанному для изменения естественного протекания состояния индивидуума или клеток, подвергнутых лечению во время протекания клинической патологии. Целевые эффекты лечения включают уменьшение степени прогрессии заболевания, ослабление или облегчение болезненного состояния и ремиссию или улучшенный прогноз. Например, индивидуум успешно "подвергается лечению", если один или более симптомов, ассоциированных со злокачественным новообразованием, подавляются или исключаются, включая, в частности, уменьшение пролиферации (или нарушение) злокачественных клеток, уменьшение симптомов, являющихся результатом заболевания, улучшение качества жизни страдающих заболеванием, уменьшение дозы других лекарственных средств, требующихся для лечения заболевания, замедление прогрессии заболевания и/или пролонгацию выживания индивидуумов.

При использовании в настоящем изобретении, термин "задержка прогрессии заболевания" означает отсрочку, торможение, замедление, задержку, стабилизацию и/или отложенное развитие заболевания (такого как злокачественное новообразование). Данная задержка может иметь вариации по продолжительности времени в зависимости от истории развития заболевания и/или от индивидуума, который подвергается лечению. Специалисту в данной области очевидно, что достаточная или значительная задержка может охватывать в сущности предотвращение, при котором у индивидуума не развивается заболевание. Например, может задерживаться поздняя стадия злокачественного новообразования, такая как развитие метастаз.

"Эффективное количество" представляет собой, по меньшей мере, минимальное количество, требуемое для получения эффекта в виде измеряемого улучшения или предотвращения конкретного расстройства. Эффективное количество согласно настоящему изобретению может варьировать в соответствии с такими факторами, как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивидуума, а также способность антитела вызывать целевой ответ у индивидуума. Эффективное количество также представляет собой такое количество, в котором терапевтически полезные эффекты превышают любые токсические или вредные эффекты от лечения. Для профилактического применения полезные или целевые результаты включают такие результаты, как исключение или уменьшение риска, ослабление тяжести или замедление проявления заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, проявляющиеся во время развития заболевания. Для терапевтического применения полезные или целевые результаты включают клинические результаты, такие как уменьшение одного или нескольких симптомов, являющихся следствием заболевания, повышение качества жизни страдающих такими заболеваниями, уменьшение дозы других лекарственных средств, требующихся для лечения заболевания, усиление эффекта другого лекарственного средства, как например через направленное воздействие, замедляющее прогрессию заболевания, и/или пролонгация выживаемости. В случае злокачественного новообразования или опухоли, эффективное количество лекарственного средства может иметь эффект по части уменьшения злокачественных клеток; уменьшения размера опухоли; ингибирования (т.е. замедления до некоторой степени или желательного прекращения) инфильтрации злокачественных клеток в периферические органы; ингибирования (т.е. замедления до некоторой степени или желательного прекращения) метастазирования опухоли; ингибирования до некоторой степени опухолевого роста; и/или облегчения до некоторой степени одного или нескольких симптомов, ассоциированных с расстройством. Эффективное количество может вводиться посредством одного или нескольких введений. Для целей настоящего изобретения, эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для осуществления терапевтического лечения либо прямо, либо косвенно. Как можно понять из клинического контекста, эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может или не может достигаться совместно с другим лекарственным средством, соединением или с фармацевтической композицией. Таким образом, "эффективное количество" может рассматриваться в контексте введения одного или нескольких терапевтических агентов, и единственный агент может рассматриваться, как принимаемый в эффективном количестве совместно с одним или несколькими другими агентами, если может быть достигнут или достигается целевой результат.

При использовании в настоящем изобретении термин "совместно с" относится к введению одного способа лечения дополнительно к другому способу лечения. Как таковой термин "совместно с" относится к введению индивидууму одного способа лечения перед, во время или после введения другого способа лечения.

"Расстройство" представляет собой любое патологическое состояние, которое будет иметь пользу от лечения и которое включает, в частности, хроническое и острое расстройство или заболевание, включающее такие патологические состояния, которые провоцируют млекопитающее к рассматриваемому расстройству.

Термины "клеточно-пролиферативное расстройство" и "пролиферативное расстройство" относятся к расстройствам, которые ассоциированы с некоторой степенью аномальной клеточной пролиферации. В одном воплощении клеточно-пролиферативное расстройство представляет собой злокачественное новообразование. В одном воплощении клеточно-пролиферативное расстройство представляет собой опу-

холь.

Термин "опухоль" при использовании в настоящем изобретении относится к росту всех неопластических клеток и к пролиферации, либо злокачественных, либо доброкачественных и всех предзлокачественных и злокачественных клеток и тканей. Термин "злокачественное новообразование", "злокачественный", "клеточно-пролиферативное расстройство", "пролиферативное расстройство" и "опухоль" не являются взаимоисключающими согласно настоящему изобретению.

Термин "злокачественное новообразование" и "злокачественный" относится к или описывает физиологическое состояние у млекопитающих, которое, как правило, характеризуется нерегулируемым клеточным ростом. Примеры злокачественного новообразования включают, в частности, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Более конкретные примеры таких злокачественных новообразований включают, в частности, плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легкого, включающий мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшной полости, гепатоклеточный рак, кишечный или желудочный рак, включающий желудочно-кишечный рак и желудочно-кишечный стромальный рак, рак поджелудочной железы, глиобластома, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, рак мочеполового тракта, гепатому, рак молочной железы, рак прямой кишки, ректальный рак, колоректальный рак, эндометриальную или маточную карциному, карциному слюнной железы, рак почки или почечный рак, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, анальную карциному, пениальную карциному, меланому, поверхностно распространяющуюся меланому, лентиго-меланому, акральную лентиго-нозную меланому, узловые меланомы, множественные миеломы и В-клеточные лимфомы (в том числе низкодифференцированная/фолликулярная неходжкинская лимфома (НХЛ), небольшая лимфоцитарная (SL) НХЛ; среднедифференцированная/фолликулярная НХЛ; среднедифференцированная диффузная НХЛ; высокодифференцированная иммунобластная НХЛ; высокодифференцированная лимфобластная НХЛ, высокодифференцированная мелкоклеточная с расщепленными ядрами НХЛ, НХЛ с массивным поражением, лимфома из клеток мантийной зоны, связанная со СПИДом лимфома; и Макроглобулинемия Вальденстрема); хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ); острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ); волосатоклеточный лейкоз; хронический миелобластный лейкоз; и посттрансплантационные лимфопролиферативные расстройства (PTLD), а также аномальная пролиферация сосудов, ассоциированная с факотоматозами, отек (как например, связанный с опухолями головного мозга), синдром Мейгса, злокачественное новообразование головного мозга, а также рак головы и шеи, и ассоциированные с ними метастазы. В некоторых воплощениях злокачественные новообразования, которые поддаются лечению с помощью антител по изобретению, включают рак молочной железы, колоректальный рак, ректальный рак, немелкоклеточный рак легкого, глиобластома, неходжкинскую лимфому (NHL), почечноклеточную карциному, рак предстательной железы, рак печени, рак поджелудочной железы, саркому мягких тканей, саркому Капоши, карциноидную саркому, рак головы и шеи, рак яичников, мезотелиому и множественную миелому. В некоторых воплощениях рак выбирают из: мелкоклеточного рака легкого, глиобластомы, нейробластомы, меланомы, рака молочной железы, рака желудка, колоректального рака (CRC) гепатоклеточной карциномы. Еще в некоторых воплощениях, рак выбирают из: немелкоклеточного рака легкого, колоректального рака, глиобластомы и рака молочной железы, включая метастазирующие формы этих типов рака.

"Химиотерапевтический агент" является химическим соединением, применимым при лечении злокачественных новообразований. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метилмеламины, включающие алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилмеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, MARINOL®); бета-лапачон; лапачол; колхицины; бетулиновая кислота; камптотecin (включающий синтетический аналог топотекан (HUSAMTIN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотecin, скополектин, и 9-аминокамптотecin); бриостатин; каллистантин; CC-1065 (включающий его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновая кислота; тенипозид; криптофицины (конкретно, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластантин; дуокармицин (включая его синтетические аналоги, KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; мустангены, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, мехлоретаминоксид гидрохлорид, мелфалан, новэмбехин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевина, такая как кармустин, хлорзототин, фотемустин, ломусин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как эндеиновые антибиотики (например, калихимидин, особенно калихимидин гамма-II и калихимидин омега-II (см., например, Nicolaou et al., *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); CDP323, пероральный ингибитор интегрин альфа-4; динемидин, включая динемидин А; эсперамидин; а также неокарзиностаин хромофор и родственные хромопротеиновые хромофоры энединовых антибиотиков), аклациномизины, акти-

номицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, каминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, дауноубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая ADRIAMYCIN®, морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин, доксорубицина HCl липосомная инъекция (DOXIL®), липосомный доксорубицин TLC D-99 (MYOCET®), пэгилированный липосомный доксорубицин (CAELYX®), и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марселломицин, митомицины, такие как митомицин C, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин (GEMZAR®), тегафур (UFTORAL®), капецитабин (XELODA®), эпотион, и 5-фторурацил (5-FU); комбретастатин; фолиевая кислота и ее аналоги, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпигиостанол, мепитиостан, тестостерон; антиад-ренергические агенты, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; средство, восполняющее фолиевую кислоту, такое как фролиновая кислота; ацеглатон; алдофосфамид гликозид; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; эллиптиния ацетат; эпотион; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтансиноиды, такие как майтансин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопидан-мол; нитразрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK® полисахаридный комплекс (JHS Natural Products, Юджин, Орегон); разоксан; ризоксин; сизофуран; спирогерманий; теназуоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотехины (особенно T-2 токсин, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); тиотепа; таксоид, например, паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью Джерси), сконструированный с альбумином состав паклитаксела из наночастиц (ABRAXANE™), и доцетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Roger, Антони, Франция); хлоранбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; агенты платины, такие как цисплатин, оксалиплатин (например, ELOXATIN®), и карбоплатин; производные барвинка, которые предотвращают полимеризацию тубулина от образования микротрубочек, включающие винбластин (VELBAN®), винкристин (ONCOVIN®), виндезин (ELDISINE®, FILDESIN®), и винорелбин (NAVELBINE®); этопосид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; леуковорин; новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота, включая бексаротен (TARGRETIN®); бифосфонаты, такие как клодронат (например, BONEFOS® или OSTAC®), этидронат (DIDROCAL®), NE-58095, золедроновая кислота/золедронат (ZOMETA®), алендронат (FOSAMAX®), памидронат (AREDIA®), тилудронат (SKELID®), или ризедронат (ACTONEL®); троксациتابин (аналог цитозина 1,3-диоксолан нуклеозид); антисмысловые олигонуклеотиды, конкретно те, которые ингибируют экспрессию генов в сигнальных путях, вовлеченных в аномальную клеточную пролиферацию, такие как например, PKC-альфа, Raf, H-Ras, и рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R) (например, эрлотиниб (Tarceva™)); и VEGF-A, который снижает клеточную пролиферацию; вакцины, такие как вакцина THERATOPE® и вакцины генной терапии, например, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN®, и вакцина VAXID®; ингибитор топоизомеразы 1 (например, LURTOTECAN®); gmRH (например, ABARELIX®); BAY439006 (сорафениб; Bayer); SU-11248 (сунитиниб, SUTENT®, Pfizer); перифозин, ингибитор COX-2 (например, целекоксиб или эторикоксиб), протеосомный ингибитор (например, PS341); бортезомиб (VELCADE®); CCI-779; типифарниб (R11577); орафениб, ABT510; ингибитор Bcl-2, такой как облимержен натрий (GENASENSE®); пиксантрон; ингибиторы EGFR; тирозинкиназные ингибиторы; серин-треонинкиназные ингибиторы, такие как рапамицин (сиролимус, RAPAMUNE®); фарнезилтрансферазные ингибиторы, такие как лонафарниб (SCH 6636, SARASAR™); и их фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные, а также комбинации двух или более из вышеперечисленных, такие как СНОР, сокращение для комбинированной терапии циклофосфамида, доксорубицина, винкристина и преднизолона; и FOLFOX, сокращение для режима лечения с использованием оксалиплатина (ELOXATIN™) вместе с 5-FU и леуковорином, и их фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные, а также комбинации двух или более из вышеперечисленных.

Химиотерапевтические агенты, как определено в настоящем изобретении, включают "антигормональные агенты" или "эндокринные терапевтические средства", которые действуют путем регуляции, уменьшения, блокирования или ингибирования эффектов гормонов, которые могут стимулировать рост злокачественного новообразования. Они сами могут быть гормонами, включая, в частности, антиэстрогены и селективные модуляторы рецептора эстрогена (SERM), включающие например, тамоксифен (включая NOLVADEX® тамоксифен), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидротамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон, и FARESTON.cndot.торемифен; ингибиторы ароматазы, которые ингиби-

руют фермент ароматазу, которая регулирует продуцирование эстрогенов в надпочечной железе, такие как например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, MEGASE® мегестрол ацетат, AROMASIN® эксеместан, форместан, фазозол, RIVISOR® ворозол, FEMARA® летрозол, и ARIMIDEX® анастрозол; и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид, и гозерелин; а также троксаци-табин (аналог цитозина 1,3-диоксолан нуклеозид); антисмысловые олигонуклеотиды, конкретно те, которые ингибируют экспрессию генов сигнальных путей, вовлеченных в аномальную клеточную пролиферацию, таких как например, PKC-альфа, Raf и H-Ras; рибозимы, такие как ингибитор экспрессии VEGF (например, ANGIOZYME® рибозим) и ингибитор экспрессии HER2; вакцины, такие как вакцины генной терапии, например, вакцина ALLOVECTIN®, вакцина LEUVECTIN®, и вакцина VAXID®; PROLEUKIN® pIL-2; ингибитор топоизомеразы 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® gmRH; Винорелбин и Эсперамицины (см. пат. США № 4675187), и их фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных; а также комбинации двух или более из вышеперечисленных.

При использовании в настоящем изобретении, термин "агент, ингибирующий рост", относится к соединению или к композиции, которая ингибирует рост клетки либо *in vitro*, либо *in vivo*. В одном воплощении агент, ингибирующий рост, представляет собой антитело, ингибирующее рост, которое предотвращает или уменьшает клеточную экспрессию антигена, с которым связывается антитело. В другом воплощении, агент, ингибирующий рост, может представлять собой такой агент, который значительно уменьшает процентное содержание клеток в S-фазе. Примеры агентов, ингибирующих рост, включают агенты, которые блокируют прогрессию клеточного цикла (в точке, отличной от S-фазы), как например агенты, которые индуцируют G1 арест и арест M-фазы. Классические M-фазные блокаторы включают алкалоиды барвинка (винкристин и винбластин), таксаны и ингибиторы топоизомеразы II, такие как доксорубин, эпирубицин, даунорубин, этопосид и блеомицин. Такие агенты, которые блокируют G1, также перетекают в арест S-фазы, например, ДНК-алкилирующие агенты, такие как томоксифен, преднизон, дакарбазин, мехлорэтамин, цисплатин, метотрексат, 5-фторурацил и цитарабин. Дополнительную информацию можно найти в Mendelsohn and Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), например, стр. 13. Таксаны (паклитаксел и доцетаксел) представляют собой противораковые лекарственные средства, которые оба выделены из тисового дерева. Доцетаксел (ТАКСОТЕП®, Rhone-Poulenc Rorer), выделенный из тиса европейского, представляет собой полусинтетический аналог паклитаксела (ТАКСОЛ®, Bristol-Myers Squibb). Паклитаксел и доцетаксел стимулируют сборку микротрубочек из димеров тубулина и стабилизируют микротрубочки путем предотвращения деполимеризации, что приводит к ингибированию митоза в клетках.

Под "радиационной терапией" понимают применение направленного гамма-излучения для индукции достаточного повреждения клетки так, чтобы ограничить ее способность нормально функционировать и для полного разрушения клетки. Понятно, что существует много способов, известных в данной области, для определения дозировки и продолжительности терапии. Типичные терапии представлены в виде однократного введения, и типичный интервал дозировки составляет от 10 до 200 единиц (Грэй) в день.

"Объект" или "индивидуум" для целей лечения относится к любому животному, классифицированному как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, и животных зоопарков, спортивных животных или домашних питомцев, таких как собаки, кошки, коровы и т.д. Предпочтительно, млекопитающее представляет собой человека.

В настоящему изобретению, термин "антитело" используется в широком смысле и специфически охватывает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела), и фрагменты антител при условии, что они демонстрируют целевую биологическую активность.

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено из компонента его естественной среды. Загрязняющие компоненты его естественной среды представляют собой вещества, которые будут препятствовать исследователю, диагностическому или терапевтическому применению антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворы. В некоторых воплощениях антитело очищено до степени (1) более чем 95 % по массе антитела, как определено, например, с помощью метода Лоури, и в некоторых воплощениях до степени более чем 99% по массе; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности путем использования, например, секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до степени гомогенности с помощью SDS-PAGE при восстанавливающих и невосстанавливающих условиях с использованием, например, окрашивания Ку-масси синим или серебром. Выделенное антитело включает антитело *in situ* внутри рекомбинантных клеток, так как будет отсутствовать по меньшей мере один компонент естественной среды антитела. Однако обычно выделенное антитело получают с помощью по меньшей мере одной стадии очистки.

"Нативные антитела" обычно представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины примерно 150000 дальтон, состоящие из двух идентичных легких цепей (L) и двух идентичных тяжелых цепей (H).

Каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как количество дисульфидных связей варьируется среди тяжелых цепей иммуноглобулинов различных изо-типов. Каждая тяжелая и легкая цепь также содержит периодически разделенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь содержит на одном конце переменный домен (V_H), за которым следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь содержит на одном конце переменный домен (V_L) и на другом конце константный домен; константный домен легкой цепи соединен с первым константным доменом тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи соединен с переменным доменом тяжелой цепи. Считается, что конкретные аминокислотные остатки образуют промежуточное пространство между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи.

Термин "константный домен" относится к области молекулы иммуноглобулина, содержащей более консервативную аминокислотную последовательность относительно другой области иммуноглобулина, переменного домена, который содержит антигенсвязывающий сайт. Константный домен содержит домены C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} (вместе, CH) тяжелой цепи и CHL (или CL) домен легкой цепи.

"Переменный участок" или "переменный домен" антитела относится к N-концевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Переменный домен тяжелой цепи может обозначаться как " V_H ". Переменный домен легкой цепи может обозначаться как " V_L ". Эти домены, как правило, представляют собой наиболее переменные части антитела и содержат антигенсвязывающие сайты.

Термин "переменный" относится к тому факту, что некоторые области переменных доменов существенно отличаются по последовательности среди антител и используются для связывания и специфичности каждого конкретного антитела с его конкретным антигеном. Однако переменность не распределена равномерно по переменным доменам антител. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых гиперпеременными участками (HVR) в переменных доменах как легкой цепи, так и тяжелой. Более высоко консервативные области переменных доменов называют каркасными участками (FR). Каждый из переменных доменов нативных тяжелой и легкой цепей включает четыре участка FR, в основном принимающие конфигурацию бета-листа, связанных с помощью трех HVR, которые образуют петли связывания, и, в некоторых случаях, с образованием части бета-складчатой структуры. HVR в каждой цепи держатся вместе в близком расположении с помощью участков FR, и использование HVR из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антитела (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)*). Константные домены не вовлечены непосредственно в связывание антитела с антигеном, но демонстрируют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой цитотоксичности клетки.

"Легкие цепи" антител (иммуноглобулинов) из любого вида млекопитающего могут быть отнесены к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа (" κ ") и лямбда (" λ "), на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов.

При использовании в настоящем изобретении, термин "изотип" или "подкласс" IgG означает любой из подклассов иммуноглобулинов, определяемых химическими или антигенными характеристиками их константных участков.

В зависимости от аминокислотных последовательностей константных доменов их тяжелых цепей, антитела (иммуноглобулины) могут быть отнесены к различным классам. Существует пять главных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и несколько из них могут дополнительно подразделяться на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α , β , ϵ , γ и μ соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны и, в общем, описаны, например, у Abbas et al., *Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000)*. Антитело может быть частью более крупной сшитой молекулы, образованной с помощью ковалентной или нековалентной ассоциации антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами.

Термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" и "цельное антитело" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо для обозначения антитела в его по существу интактной форме, а не в форме фрагментов антитела, определенных ниже. Термины конкретно относятся к антителу с тяжелыми цепями, которые содержат Fc-участок.

"Голое антитело" для целей настоящего изобретения представляет собой антитело, которое не конъюгировано с цитотоксическим компонентом или с радиоактивной меткой.

"Фрагменты антитела" содержат область интактного антитела, предпочтительно содержащую его антигенсвязывающий участок. В некоторых воплощениях фрагмент антитела, описанный в настоящем изобретении, представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. Примеры фрагментов антитела включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела; одноцепочечные антительные молекулы; и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антитела.

В результате гидролиза антител папаином получается два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых фрагментами "Fab", каждый из которых содержит единственный антигенсвязываю-

щий сайт, и оставшийся фрагмент "Fc", чье название отражает его способность легко кристаллизоваться. В результате обработки пепсином получается фрагмент $F(ab')_2$, который содержит два антигенсвязывающих сайта и сохраняет способность перекрестного связывания с антигеном.

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный антигенсвязывающий сайт. В одном воплощении двухцепочечный тип Fv состоит из димера одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи в нековалентной ассоциации. В одноцепочечном типе Fv (scFv) один переменный домен тяжелой цепи и один переменный домен легкой цепи может быть ковалентно связан с гибким пептидным линкером, так что легкая и тяжелая цепи могут ассоциировать в "димерную" структуру, аналогичную структуре двухцепочечного типа Fv. В данной конфигурации три HVR каждого переменного домена взаимодействуют для определения антигенсвязывающего сайта на поверхности димера VH-VL. Вместе, шесть HVR придают антителу антигенсвязывающую специфичность. Однако, даже единственный переменный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфичных к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем полный связывающий сайт.

Фрагмент Fab содержит переменные домены тяжелой и легкой цепи, а также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab вставкой нескольких остатков в С-конец домена CH1 тяжелой цепи, включая один или несколько цистеинов из шарнирного участка антитела. Fab'-SH в настоящем изобретении представляет собой обозначение для Fab', в котором остатки цистеина константных доменов несут свободную тиольную группу. Фрагменты антитела $F(ab')_2$ исходно были получены в виде пар фрагментов Fab', которые содержат шарнирные цистеины между ними. Также известно о других химических связях фрагментов антитела.

Фрагменты антитела "одноцепочечный Fv" или "scFv" содержат домены антитела VH и VL, где эти домены присутствуют в одиночной полипептидной цепи. Как правило, полипептид scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv образовывать требуемую структуру для связывания антигена. Для обзора scFv, см., например, Pluckthun, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), p. 269-315.

Термин "диатела" относится к фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, где фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с переменным доменом легкой цепи (VL) в одной и той же полипептидной цепи (VH-VL). При использовании линкера, который является слишком коротким, чтобы позволить спаривание между двумя доменами на одной и той же цепи, домены вынуждены связываться с комплементарными доменами другой цепи, и образуют при этом два антигенсвязывающих сайта. Диатела могут быть бивалентными или биспецифичными. Более полно диатела описаны, например, в EP 404097; WO 1993/01161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); и Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993). Тритела и тетратела также описаны в Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

При использовании в настоящем изобретении термин "моноклональное антитело" относится к антителу полученному из популяции по существу гомогенных антител, например, индивидуальных антител составляющих популяцию, которые являются идентичными за исключением возможных мутаций, например, естественных мутаций, которые могут присутствовать в минорных количествах. Таким образом, обозначение "моноклональное" указывает на характер антитела в том смысле, что оно не является смесью дискретных антител. В некоторых воплощениях такое моноклональное антитело, как правило, включает антитело, содержащее полипептидную последовательность, которая связывается с мишенью, где полипептидную последовательность, связывающую мишень, получали способом, который включает селекцию полипептидных последовательностей, связывающих единственную мишень, из множества полипептидных последовательностей. Например, процесс селекции может представлять собой селекцию уникального клона из множества клонов, как например, из пула гибридных клонов, фаговых клонов или клонов рекомбинантной ДНК. Следует понимать, что селектированная последовательность, связывающая мишень, может быть дополнительно изменена, например, для улучшения аффинности к мишени, для гуманизации последовательности, связывающей мишень, для улучшения продуцирования в клеточной культуре, для уменьшения ее иммуногенности *in vivo*, для создания мультиспецифичного антитела и т.д., и что антитело, содержащее измененную последовательность, связывающую мишень, также представляет собой моноклональное антитело по настоящему изобретению. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело препарата моноклонального антитела направлено против одиночной детерминанты на антигене. Дополнительно к их специфичности препараты моноклональных антител предпочтительно представляют собой такие, в которых они, как правило, не загрязнены другими иммуноглобулинами.

Обозначение "моноклональное" указывает на характер антитела, полученного по существу из гомогенной популяции антител, и не должен толковаться как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые согласно изобретению, мо-

гут быть получены с помощью множества методов, включающих, например, гибридный метод (например, Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), методы рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567), технологии фагового дисплея (см., например, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); и Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), и технологии получения у животных человеческих антител и антител, подобных человеческим, которые содержат части или полные локусы человеческих иммуноглобулинов или генов, кодирующих последовательности человеческих иммуноглобулинов (см., например, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); пат. США № 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; и 5661016; Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); и Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Моноклональные антитела в настоящем изобретении специфически включают "химерные" антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остаток цепи(ей) идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям в антителах, полученных из других видов или принадлежащих другим классам или подклассам антител, а также фрагментам таких антител, при условии, что они демонстрируют целевую биологическую активность (см., например, патент США № 4816567; и Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Химерные антитела включают антитела PRIMATTZED®, где антигенсвязывающий участок антитела выделен из антитела, полученного, например, с помощью иммунизации макака с использованием антигена, представляющего интерес.

"Гуманизированные" формы антител животного происхождения (например, мышьиные) представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, выделенную из иммуноглобулина животного происхождения. В одном воплощении гуманизированное антитело представляет собой человеческий иммуноглобулин (реципиентное антитело), в котором остатки из HVR реципиента заменены на остатки из HVR животного происхождения (донорное антитело), такого как мышь, крыса, кролик или примат, отличный от человека, обладающее целевой специфичностью, аффинностью и/или способностью. В некоторых случаях, остатки FR из человеческого иммуноглобулина заменяют соответствующими остатками животного происхождения. Более того, гуманизированное антитело может содержать остатки, которые не обнаружены в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации могут быть сделаны для дальнейшего совершенствования эффективности антитела. В общем, гуманизированное антитело будет содержать по существу все по меньшей мере из одного, а, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют областям иммуноглобулина животного происхождения, а все или по существу все FR являются областями последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, из человеческого иммуноглобулина. Для дополнительных подробностей см. например, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). См. также, например, Vaswani and Hamilton, *Алл. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); и пат. США № 6982321 и 7087409.

"Человеческое антитело" представляет собой такое антитело, которое имеет аминокислотную последовательность, которая соответствует последовательности антитела, продуцированного человеком и/или которое было получено с использованием любого из методов получения человеческих антител, раскрытых в настоящем изобретении. Данное определение человеческого антитела специфически исключает гуманизированное антитело, содержащее антигенсвязывающие остатки животного происхождения. Человеческие антитела могут быть получены с использованием множества методов, известных в данной области, включая метод библиотек фагового дисплея. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Также доступными для получения человеческих моноклональных антител методами являются методы, описанные в Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). См. также van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Человеческие антитела могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое может быть модифицировано для продуцирования таких антител в ответ на антигенное стимулирование, но чей эндогенный локус поврежден, как например, у иммунизированных ксеномышей (см., например, патент США № 6075181 и 6150584,

касающиеся технологии XENOMOUSE™). См. также, например, Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006), касательно человеческих антител, генерированных посредством технологии В-клеточной гибридомы.

"Видоспецифичное антитело" представляет собой антитело, которое имеет более сильную аффинность связывания с антигеном из первого вида млекопитающего, чем для гомологичного антигена из второго вида млекопитающего. Обычно, видоспецифичное антитело "специфично связывается" с человеческим антигеном (например, имеет значение аффинности связывания (Kd) не более чем примерно 1×10^{-7} М, предпочтительно, не более чем примерно 1×10^{-8} М и, предпочтительно, не более чем примерно 1×10^{-9} М), но при этом имеет аффинность связывания с гомологичным антигеном из второго вида млекопитающего - не человека, которая составляет по меньшей мере примерно в 50 раз слабее или по меньшей мере примерно в 500 раз слабее или по меньшей мере примерно в 1000 раз слабее, чем аффинность связывания с человеческим антигеном. Видоспецифичное антитело может относиться к любому из различных типов антител, определенных выше, но предпочтительно, оно является гуманизированным или человеческим антителом.

При использовании в настоящем изобретении термин "гипервариабельный участок", "HVR" или "HV" относится к участкам вариабельного домена антитела, которые гипервариабельны по последовательности и/или образуют структурно определенные петли.

Как правило, антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3), и три в VL (L1, L2, L3). В нативных антителах, H3 и L3 демонстрируют наибольшее разнообразие из шести HVR, и считается, что в особенности H3 играет уникальную роль в придании антителам специфичности. См., например, Xu et al., Immunity 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003). Фактически, природные верблюжьи антитела, состоящие только из тяжелой цепи, являются функциональными и стабильными при отсутствии легкой цепи. См., например, Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993); Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996).

Применяется ряд трансдифференцировок HVR, которые охвачены настоящим изобретением. Участки, определяющие комплементарность по Kabat (CDR), основываются на вариабельности последовательности и наиболее часто используются (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Напротив, Chothia ссылается на локализацию структурных петель (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). AbM HVR представляют собой компромисс между Kabat HVR и структурными петлями Chothia и используются Оксфордской программой молекулярного моделирования антител "Oxford Molecular's AbM". "Контактные" HVR основаны на анализе доступных комплексных кристаллических структур. Остатки из каждого из этих HVR отмечены ниже.

Петля	Kabat	AbM	Chothia	Контакт	
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36	
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55	
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96	
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B	(Нумерация по Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35	(Нумерация по Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58	
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101	

HVR могут содержать "протяженные HVR", как указанные далее: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 или 89-96 (L3) в VL и 26-35 (H1), 50-65 или 49-65 (H2) и 93-102, 94-102, или 95-102 (H3) в VH. Остатки вариабельного домена пронумерованы согласно Kabat et al., выше, для каждого из этих определений.

Остатки "каркасного участка" или "FR" представляют собой остатки вариабельного домена, отличные от остатков HVR, определенных в настоящем изобретении.

Термин "нумерация остатков вариабельного домена как у Kabat" или "нумерация аминокислотного положения как у Kabat", и его вариации относятся к системе нумерации, используемой для вариабельных доменов тяжелой цепи или для вариабельных доменов легкой цепи сборки антител как у Kabat et al., выше. С использованием данной системы нумерации, фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорачиванию или вставке в FR или HVR вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать единичную аминокислотную вставку (остаток 52a согласно Kabat) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b, и 82c, и т.д. согласно Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Kabat может определяться для данного антитела с помощью сравнения областей гомологии последовательности антитела с последовательностью со "стандарт-

ной" нумерацией по Kabat.

Система нумерации Kabat, как правило, используется при ссылке на остатки в варибельном домене (приблизительно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "Система нумерации EU" или "индекс EU", как правило, используется при ссылке на остаток в константном участке тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU, как опубликовано у Kabat et al., выше). "Индекс EU как у Kabat" относится к нумерации остатков человеческого антитела IgG1 EU.

Экспрессия "линейных антител" относится к антителам, описанным у Zapata et al. (1995 Protein Eng, 8 (10):1057-1062). Вкратце, эти антитела содержат пару tandemных сегментов Fd (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих участков. Линейные антитела могут быть биспецифичными или моноспецифичными.

При использовании в настоящем изобретении, термин "специфично связывается с" или "специфичный к" относится к измеряемым и воспроизводимым взаимодействиям, таким как связывание между мишенью и антителом, которое является определяющим присутствия мишени в присутствии гетерологичной популяции молекул, включающих биологические молекулы. Например, антитело, которое специфично связывается с мишенью (которая может быть эпитопом) представляет собой антитело, которое связывается с этой мишенью с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими мишенями. В одном воплощении степень связывания антитела с чужой мишенью составляет менее чем примерно 10% от связывания антитела с мишенью, что измерено, например, с помощью радиоиммуноанализа (RIA). В некоторых воплощениях антитело, которое специфично связывается с мишенью, имеет константу диссоциации (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, или $\leq 0,1$ нМ. В некоторых воплощениях антитело специфично связывается с эпитопом на белке, который консервативен среди белков различных видов. В другом воплощении, специфичное связывание может включать, но необязательно, исключительное связывание.

II. Композиции антител и их получение.

Изобретение дополнительно относится к стабильным водным композициям, содержащим антитело, такое как антитело к PDL1. В некоторых воплощениях композиция содержит антитело (например, моноклональное антитело), сахарозу, буфер и поверхностно-активное вещество, где композиция имеет pH, составляющее примерно от 5 примерно до 7. В некоторых воплощениях антитело (например, антитело к PDL1, описанное в настоящем изобретении) в композиции составляет примерно от 40 примерно до 125 мг/мл. В некоторых воплощениях буфер представляет собой гистидин (например, ацетат гистидина) или ацетат натрия. В некоторых воплощениях буфер в композиции присутствует в концентрации примерно от 15 примерно до 25 мМ. В некоторых воплощениях сахароза присутствует в композиции примерно от 60 примерно до 180 мМ. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество в композиции представляет собой полисорбат (например, полисорбат 20). В некоторых воплощениях полисорбат присутствует в композиции в концентрации примерно от 0,005% мас./об. примерно до 0,06% мас./об. В некоторых воплощениях композиция имеет pH примерно от 5 примерно до 6,3. В некоторых воплощениях в настоящем изобретении предлагается стабильная водная фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело к PDL1 в концентрации примерно от 40 примерно до 125 мг/мл, ацетат гистидина или ацетат натрия в концентрации примерно от 15 примерно до 25 мМ, сахарозу в концентрации примерно от 60 примерно до 240 мМ, полисорбат в концентрации примерно от 0,005% мас./об. примерно до 0,06% мас./об., и с pH примерно от 5 примерно до 6,3. В некоторых воплощениях композиция содержит моноклональное антитело к PDL1 в количестве примерно 125 мг/мл, сахарозу в концентрации примерно 240 мМ, и pH композиции составляет примерно 5,5. В некоторых воплощениях композиция содержит моноклональное антитело к PDL1 в количестве примерно 60 мг/мл, сахарозу в концентрации примерно 120 мМ, и pH композиции составляет примерно 5,8.

В некоторых воплощениях антитело в композиции стабильно при -20°C в течение по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере двух лет, по меньшей мере трех лет или по меньшей мере четырех лет. В некоторых воплощениях антитело в композиции стабильно при $2-8^{\circ}\text{C}$ в течение по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере двух лет или по меньшей мере трех лет. В некоторых воплощениях после хранения антитело сохраняет по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95% его биологической активности (например, связывание с мишенью или терапевтическая эффективность), проявляемой до хранения, т.е. в момент приготовления фармацевтической композиции.

В некоторых воплощениях композиция стабильна примерно при 40°C в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 или более дней. В некоторых воплощениях композиция стабильна примерно при 40°C в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более недель. В некоторых воплощениях состав стабилен примерно при 25°C в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более месяцев. В некоторых воплощениях состав стабилен примерно при

5°C в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более месяцев. В некоторых воплощениях состав стабилен примерно при -20°C в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 или более месяцев. В некоторых воплощениях состав стабилен примерно при 5°C или при -20°C в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 или более месяцев. Кроме того, композиция предпочтительно стабильна после заморозки (например, при -20°C, -40°C или -70°C) или размораживания композиции, например после 1, 2, 3, 4 или 5 циклов замораживания и оттаивания.

А. Антитела (такие как антитела к PDL1)

В некоторых воплощениях антитело композиции содержит по меньшей мере один триптофан (например, по меньшей мере два, по меньшей мере три, или по меньшей мере четыре) в последовательности тяжелой или легкой цепи. В некоторых воплощениях аминокислота триптофан находится в CDR-участках, в каркасных участках и/или в константных участках антитела. В некоторых воплощениях антитело содержит два или три остатка триптофана в CDR-участках. В некоторых воплощениях антитело в составе представляет собой антитело к PDL1. PD-L1 (лиганд 1 белка 1 программируемой клеточной смерти), также известный как PDL1, B7-H1, B7-4, CD274, и B7-H, представляет собой трансмембранный белок, и его взаимодействие с PD-1 ингибирует Т-клеточную активацию и продуцирование цитокинов. В некоторых воплощениях антитело к PDL1, описанное в настоящем изобретении, связывается с человеческим PD-L1. Примеры антител к PDL1, которые могут быть включены в композиции, описанные в настоящем изобретении, описаны в патентной заявке WO 2010/077634 A1 и в US 8217149, которые включены в настоящее изобретение ссылкой.

В некоторых воплощениях антитело к PDL1 способно ингибировать связывание между PD-L1 и PD-1 и/или между PD-L1 и B7-1. В некоторых воплощениях антитело к PDL1 представляет собой моноклональное антитело. В некоторых воплощениях антитело к PDL1 представляет собой фрагмент антитела, выделенный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂. В некоторых воплощениях антитело к PDL1 представляет собой гуманизованное антитело. В некоторых воплощениях антитело к PDL1 представляет собой человеческое антитело.

Антитела к PDL1, описанные в WO 2010/077634 A1 и в US 8217149, могут быть включены в состав композиций, описанных в настоящем изобретении. В некоторых воплощениях антитело к PDL1 содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

В одном воплощении антитело к PDL1 содержит полипептид вариабельного участка тяжелой цепи, содержащий последовательность HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, где:

- (a) последовательность HVR-H1 представляет собой GFTFSX₁SWIH, (SEQ ID NO:11);
- (b) последовательность HVR-H2 представляет собой AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG, (SEQ ID NO:12);
- (c) последовательность HVR-H3 представляет собой (SEQ ID NO: 13);

где дополнительно:

- X₁ представляет собой D или G;
- X₂ представляет собой S или L;
- X₃ представляет собой T или S.

В одном аспекте X₁ представляет собой D; X₂ представляет собой S и X₃ представляет собой T. В другом аспекте, полипептид дополнительно содержит каркасные последовательности вариабельного участка тяжелой цепи, соединенные между HVR согласно формуле: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4). Еще в одном аспекте каркасные последовательности выделены из человеческих консенсусных каркасных последовательностей. В следующем аспекте каркасные последовательности представляют собой консенсусную каркасную последовательность VH подгруппы III. Еще в одном аспекте по меньшей мере одна из каркасных последовательностей представляет собой следующую:

HC-FR1 представляет собой RHWPGGFDY, EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS, (SEQ ID NO: 14)

HC-FR2 представляет собой WVRQAPGKGLEWV, (SEQ ID NO: 15)

HC-FR3 представляет собой RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR, (SEQ ID NO: 16)

HC-FR4 представляет собой WGQGTLVTVSA, (SEQ ID NO: 17).

Еще в одном аспекте полипептид тяжелой цепи дополнительно объединяется с вариабельным участком легкой цепи, содержащим HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, где:

(a) последовательность HVR-L1 представляет собой RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A, (SEQ ID NO: 18);

(b) последовательность HVR-L2 представляет собой SASX₉LX₁₀S, (SEQ ID NO: 19);

(c) последовательность HVR-L3 представляет собой QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T, (SEQ ID NO: 20);

где дополнительно

X₄ представляет собой D или V;

X_5 представляет собой V или I;
 X_6 представляет собой S или N;
 X_7 представляет собой A или F;
 X_8 представляет собой V или L;
 X_9 представляет собой F или T;
 X_{10} представляет собой Y или A;
 X_{11} представляет собой Y, G, F, или S;
 X_{12} представляет собой L, Y, F или W;
 X_{13} представляет собой Y, N, A, T, G, F или I;
 X_{14} представляет собой H, V, P, T или I;
 X_{15} представляет собой A, W, R, P или T.

Еще в одном аспекте X_4 представляет собой D; X_5 представляет собой V; X_6 представляет собой S; X_7 представляет собой A; X_8 представляет собой V; X_9 представляет собой F; X_{10} представляет собой Y; X_{11} представляет собой Y; X_{12} представляет собой L; X_{13} представляет собой Y; X_{14} представляет собой H; X_{15} представляет собой A. Еще в одном аспекте легкая цепь дополнительно содержит каркасные последовательности переменного участка легкой цепи, соединенные между HVR согласно формуле: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Еще в одном аспекте каркасные последовательности выделены из человеческих консенсусных каркасных последовательностей. Еще в одном аспекте каркасные последовательности представляет собой консенсусную каркасную последовательность VL каппа I. Еще в одном аспекте по меньшей мере одна из каркасных последовательностей представляет собой следующую:

LC-FR1 представляет собой DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC, (SEQ ID NO: 21)

LC-FR2 представляет собой WYQQKPGKAPKLLIY, (SEQ ID NO: 22)

LC-FR3 представляет собой GVPSRFSGSGGTDFLTITISLQPEDFATYYC, (SEQ ID NO: 23)

LC-FR4 представляет собой FGQGTKVEIKR, (SEQ ID NO: 24).

В другом воплощении предлагается выделенное антитело к PDL1 или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий последовательность переменного участка тяжелой цепи и легкой цепи:

(a) тяжелая цепь содержит HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, где дополнительно:

(i) последовательность HVR-H1 представляет собой GF₁TF₂SX₃SWI₄H; (SEQ ID NO: 11)

(ii) последовательность HVR-H2 представляет собой AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKGC; (SEQ ID NO: 12)

(iii) последовательность HVR-H3 представляет собой RHWPGGFDY и (SEQ ID NO: 13)

(b) легкая цепь содержит HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, где дополнительно:

(i) последовательность HVR-L1 представляет собой RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A; (SEQ ID NO: 18)

(ii) последовательность HVR-L2 представляет собой SASX₉LX₁₀S и (SEQ ID NO: 19)

(iii) последовательность HVR-L3 представляет собой QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T; (SEQ ID NO: 20)

Где дополнительно:

X_1 представляет собой D или G;

X_2 представляет собой S или L;

X_3 представляет собой T или S;

X_4 представляет собой D или V;

X_5 представляет собой V или I;

X_6 представляет собой S или N;

X_7 представляет собой A или F;

X_8 представляет собой V или L;

X_9 представляет собой F или T;

X_{10} представляет собой Y или A;

X_{11} представляет собой Y, G, F, или S;

X_{12} представляет собой L, Y, F или W;

X_{13} представляет собой Y, N, A, T, G, F или I;

X_{14} представляет собой H, V, P, T или I;

X_{15} представляет собой A, W, R, P или T.

В конкретном аспекте, X_1 представляет собой D; X_2 представляет собой S и X_3 представляет собой T. В другом аспекте, X_4 представляет собой D; X_5 представляет собой V; X_6 представляет собой S; X_7 представляет собой A; X_8 представляет собой V; X_9 представляет собой F; X_{10} представляет собой Y; X_{11} представляет собой Y; X_{12} представляет собой L; X_{13} представляет собой Y; X_{14} представляет собой H; X_{15} представляет собой A. Еще в одном аспекте X_1 представляет собой D; X_2 представляет собой S и X_3 представляет собой T, X_4 представляет собой D; X_5 представляет собой V; X_6 представляет собой S; X_7 представляет собой A; X_8 представляет собой V; X_9 представляет собой F; X_{10} представляет собой Y; X_{11} представляет собой Y; X_{12} представляет собой L; X_{13} представляет собой Y; X_{14} представляет собой H и X_{15} представляет собой A.

Еще в одном аспекте переменный участок тяжелой цепи содержит одну или несколько каркасных

последовательностей, соединенный между HVR типа: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), и варибельные участки легкой цепи содержат одну или несколько каркасных последовательностей, соединенных между HVR типа: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Еще в одном аспекте каркасные последовательности выделены из человеческих консенсусных каркасных последовательностей. Еще в одном аспекте каркасные последовательности тяжелой цепи выделены из последовательности Kabat подгруппы I, II или III. Еще в одном аспекте каркасная последовательность тяжелой цепи представляет собой каркасную последовательность VH подгруппы III. Еще в одном аспекте одна или несколько каркасных последовательностей тяжелой цепи представляют собой следующие:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:14)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO:15)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:16)
HC-FR4	WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO:17) .

Еще в одном аспекте каркасные последовательности легкой цепи выделены из последовательности Kabat каппа подгруппы I, II, II или IV. Еще в одном аспекте каркасная последовательность легкой цепи представляет собой консенсусную каркасную последовательность VL каппа I. Еще в одном аспекте одна или несколько каркасных последовательностей легкой цепи представляют собой следующие:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	(SEQ ID NO:21)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:22)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:23)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:24) .

Еще в одном аспекте антитело дополнительно содержит человеческий или мышинный константный участок. Еще в одном аспекте человеческий константный участок выбирают из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Еще в одном частном аспекте человеческий константный участок представляет собой IgG1. Еще в одном аспекте мышинный константный участок выбирают из группы, состоящей из IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Еще в одном аспекте мышинный константный участок представляет собой IgG2A. Еще в одном конкретном аспекте антитело обладает ослабленной или минимальной эффекторной функцией. Еще в одном конкретном аспекте минимальная эффекторная функция является результатом "безэфекторной Fc-мутации" или агликозилирования. Еще в одном воплощении безэфекторная Fc-мутация представляет собой замену N297A или D265A/N297A в константном участке.

Еще в одном воплощении предлагается антитело к PDL1, содержащее последовательность варибельного участка тяжелой цепи и последовательность варибельного участка легкой цепи, где:

(a) тяжелая цепь дополнительно содержит последовательность HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности с GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:25), AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:26) и с RHWPGGFDY (SEQ ID NO:13), соответственно, или

(b) легкая цепь дополнительно содержит последовательность HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности с RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:27), SASFLYS (SEQ ID NO:28) и с QQYLYHPAT (SEQ ID NO:29), соответственно.

В конкретном аспекте идентичность последовательности составляет 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В другом аспекте, варибельный участок тяжелой цепи содержит одну или несколько каркасных последовательностей, соединенный между HVR типа: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), и варибельные участки легкой цепи содержат одну или несколько каркасных последовательностей, соединенных между HVR типа: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Еще в одном аспекте каркасные последовательности выделены из человеческих консенсусных каркасных последовательностей. Еще в одном аспекте каркасные последовательности тяжелой цепи выделены из последовательности Kabat подгруппы I, II или III. Еще в одном аспекте каркасная последовательность тяжелой цепи представляет собой каркасную последовательность VH подгруппы III. Еще в одном аспекте одна или несколько каркасных последовательностей тяжелой цепи представляют собой следующие:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:14)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO:15)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:16)
HC-FR4	WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO:17) .

Еще в одном аспекте каркасные последовательности легкой цепи выделены из последовательности Kabat каппа подгруппы I, II, II или IV. Еще в одном аспекте каркасная последовательность легкой цепи представляет собой консенсусную каркасную последовательность VL каппа I. Еще в одном аспекте одна или несколько каркасных последовательностей легкой цепи представляют собой следующие:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	(SEQ ID NO:21)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:22)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYC	(SEQ ID NO:23)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:24)

Еще в одном аспекте антитело дополнительно содержит человеческий или мышинный константный участок. Еще в одном аспекте человеческий константный участок выбирают из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Еще в одном частном аспекте человеческий константный участок представляет собой IgG1. Еще в одном аспекте мышинный константный участок выбирают из группы, состоящей из IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Еще в одном аспекте мышинный константный участок представляет собой IgG2A. Еще в одном конкретном аспекте антитело обладает ослабленной или минимальной эффекторной функцией. Еще в одном конкретном аспекте минимальная эффекторная функция является результатом "безэффекторной Fc-мутации" или агликозилирования. Еще в одном воплощении безэффекторная Fc-мутация представляет собой замену N297A или D265A/N297A в константном участке.

Еще в одном воплощении предлагается выделенное антитело к PDL1, содержащее последовательность переменного участка тяжелой цепи и последовательность переменного участка легкой цепи, где:

(a) последовательность тяжелой цепи имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с последовательностью тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTIVTSA

(SEQ ID NO: 30), или

(b) последовательности легкой цепи имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности с последовательностью легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS

RFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:31).

В конкретном аспекте идентичность последовательности составляет 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%. В другом аспекте, переменный участок тяжелой цепи содержит одну или несколько каркасных последовательностей, соединенный между HVR типа: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), и переменные участки легкой цепи содержат одну или несколько каркасных последовательностей, соединенных между HVR типа: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Еще в одном аспекте каркасные последовательности выделены из человеческих консенсусных каркасных последовательностей. Еще в одном аспекте каркасные последовательности тяжелой цепи выделены из последовательности Kabat подгруппы I, II или III. Еще в одном аспекте каркасная последовательность тяжелой цепи представляет собой каркасную последовательность VH подгруппы III. Еще в одном аспекте одна или несколько каркасных последовательностей тяжелой цепи представляют собой следующие:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:14)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO:15)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:16)
HC-FR4	WGQGLTIVTSA	(SEQ ID NO:17)

Еще в одном аспекте каркасные последовательности легкой цепи выделены из последовательности Kabat каппа подгруппы I, II, III или IV. Еще в одном аспекте каркасная последовательность легкой цепи представляет собой консенсусную каркасную последовательность VL каппа I. Еще в одном аспекте одна или несколько каркасных последовательностей легкой цепи представляют собой следующие:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	(SEQ ID NO:21)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:22)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYC	(SEQ ID NO:23)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:24)

Еще в одном аспекте антитело дополнительно содержит человеческий или мышинный константный участок. Еще в одном аспекте человеческий константный участок выбирают из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Еще в одном частном аспекте человеческий константный участок представляет собой IgG1. Еще в одном аспекте мышинный константный участок выбирают из группы, состоящей из IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Еще в одном аспекте мышинный константный участок представляет собой IgG2A. Еще в одном конкретном аспекте антитело обладает ослабленной или минимальной эффекторной функцией. Еще в одном аспекте минимальная эффекторная функция является результатом продуцирования в прокариотических клетках. Еще в одном конкретном аспекте минимальная эффекторная функция является результатом "безэффекторной Fc-мутации" или агликозилирования. Еще в одном воплощении безэффекторная Fc-мутация представляет собой замену N297A или D265A/N297A в константном участке.

Еще в одном воплощении предлагается выделенное антитело к PDL1, содержащее последователь-

ность варибельного участка тяжелой цепи и последовательность варибельного участка легкой цепи, где:

(а) последовательность тяжелой цепи имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с последовательностью тяжелой цепи:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAVISPYGGSTYY

ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO: 32), или

(b) последовательности легкой цепи имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности с последовательностью легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSG

SGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYLYNHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 31) .

В конкретном аспекте идентичность последовательности составляет 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%. В другом аспекте, варибельный участок тяжелой цепи содержит одну или несколько каркасных последовательностей, соединенный между HVR типа: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), и варибельные участки легкой цепи содержат одну или несколько каркасных последовательностей, соединенных между HVR типа: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Еще в одном аспекте каркасные последовательности выделены из человеческих консенсусных каркасных последовательностей. Еще в одном аспекте каркасные последовательности тяжелой цепи выделены из последовательности Kabat подгруппы I, II или III. Еще в одном аспекте каркасная последовательность тяжелой цепи представляет собой каркасную последовательность VH подгруппы III. Еще в одном аспекте одна или несколько каркасных последовательностей тяжелой цепи представляют собой следующие:

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAAS (SEQ ID NO: 14)

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 15)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 16)

HC-FR4 WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 33) .

Еще в одном аспекте каркасные последовательности легкой цепи выделены из последовательности Kabat каппа подгруппы I, II, III или IV. Еще в одном аспекте каркасная последовательность легкой цепи представляет собой консенсусную каркасную последовательность VL каппа I. Еще в одном аспекте одна или несколько каркасных последовательностей легкой цепи представляют собой следующие:

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGRVITITC (SEQ ID NO: 21)

LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 22)

LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYC (SEQ ID NO: 23)

LC-FR4 FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 24) .

Еще в одном аспекте антитело дополнительно содержит человеческий или мышинный константный участок. Еще в одном аспекте человеческий константный участок выбирают из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Еще в одном частном аспекте человеческий константный участок представляет собой IgG1. Еще в одном аспекте мышинный константный участок выбирают из группы, состоящей из IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Еще в одном аспекте мышинный константный участок представляет собой IgG2A. Еще в одном конкретном аспекте антитело обладает ослабленной или минимальной эффекторной функцией. Еще в одном аспекте минимальная эффекторная функция является результатом продуцирования в прокариотических клетках. Еще в одном конкретном аспекте минимальная эффекторная функция является результатом "безэффекторной Fc-мутации" или агликозилирования. Еще в одном воплощении безэффекторная Fc-мутация представляет собой замену N297A или D265A/N297A в константном участке.

Еще в одном аспекте варибельный участок тяжелой цепи содержит одну или несколько каркасных последовательностей, соединенный между HVR типа: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), и варибельные участки легкой цепи содержат одну или несколько каркасных последовательностей, соединенных между HVR типа: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Еще в одном аспекте каркасные последовательности выделены из человеческих консенсусных каркасных последовательностей. Еще в одном аспекте каркасные последовательности тяжелой цепи выделены из последовательности Kabat подгруппы I, II или III. Еще в одном аспекте каркасная последовательность тяжелой цепи представляет собой каркасную последовательность VH подгруппы III. Еще в одном аспекте одна или несколько каркасных последовательностей тяжелой цепи представляют собой следующие:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	(SEQ ID NO:34)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWVA	(SEQ ID NO:35)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:16)
HC-FR4	WGQGTLVTVSS	(SEQ ID NO:33)

Еще в одном аспекте каркасные последовательности легкой цепи выделены из последовательности Kabat каппа подгруппы I, II, III или IV. Еще в одном аспекте каркасная последовательность легкой цепи представляет собой консенсусную каркасную последовательность VL каппа I. Еще в одном аспекте одна или несколько каркасных последовательностей легкой цепи представляют собой следующие:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	(SEQ ID NO:21)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:22)
LC-FR3	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:23)
LC-FR4	FGQGTKVEIK	(SEQ ID NO:36)

Еще в одном аспекте антитело дополнительно содержит человеческий или мышинный константный участок. Еще в одном аспекте человеческий константный участок выбирают из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Еще в одном частном аспекте человеческий константный участок представляет собой IgG1. Еще в одном аспекте мышинный константный участок выбирают из группы, состоящей из IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Еще в одном аспекте мышинный константный участок представляет собой IgG2A. Еще в одном конкретном аспекте антитело обладает ослабленной или минимальной эффекторной функцией. Еще в одном конкретном аспекте минимальная эффекторная функция является результатом "безэфекторной Fc-мутации" или агликозилирования. Еще в одном воплощении безэфекторная Fc-мутация представляет собой замену N297A или D265A/N297A в константном участке.

Еще в одном воплощении предлагается антитело к PDL1, содержащее последовательность вариабельного участка тяжелой цепи и последовательность вариабельного участка легкой цепи, где:

(с) тяжелая цепь дополнительно содержит последовательность HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности с GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:4), AWISPYGGSTYYADSVKVG (SEQ ID NO:5) и с RHWPGGFDY (SEQ ID NO:6),

соответственно, или

(d) легкая цепь дополнительно содержит последовательность HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности с RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:1), SASFLYS (SEQ ID NO:2) и QQYLYHPAT (SEQ ID NO:3), соответственно.

В конкретном аспекте идентичность последовательности составляет 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%. В другом аспекте, вариабельный участок тяжелой цепи содержит одну или несколько каркасных последовательностей, соединенный между HVR типа: (HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4), и вариабельные участки легкой цепи содержат одну или несколько каркасных последовательностей, соединенных между HVR типа: (LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4). Еще в одном аспекте каркасные последовательности выделены из человеческих консенсусных каркасных последовательностей. Еще в одном аспекте каркасные последовательности тяжелой цепи выделены из последовательности Kabat подгруппы I, II или III. Еще в одном аспекте каркасная последовательность тяжелой цепи представляет собой каркасную последовательность VH подгруппы III. Еще в одном аспекте одна или несколько каркасных последовательностей тяжелой цепи представляют собой следующие:

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:34)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO:35)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:16)
HC-FR4	WGQGTLVTVSSASTK	(SEQ ID NO:33)

Еще в одном аспекте каркасные последовательности легкой цепи выделены из последовательности Kabat каппа подгруппы I, II, III или IV. Еще в одном аспекте каркасная последовательность легкой цепи представляет собой консенсусную каркасную последовательность VL каппа I. Еще в одном аспекте одна или несколько каркасных последовательностей легкой цепи представляют собой следующие:

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	(SEQ ID NO:21)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:22)
LC-FR3	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:23)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:24)

Еще в одном аспекте антитело дополнительно содержит человеческий или мышинный константный участок. Еще в одном аспекте человеческий константный участок выбирают из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG2, IgG3, IgG4. Еще в одном частном аспекте человеческий константный участок представляет собой IgG1. Еще в одном аспекте мышинный константный участок выбирают из группы, состоящей из IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3. Еще в одном аспекте мышинный константный участок представляет

собой IgG2A. Еще в одном конкретном аспекте антитело обладает ослабленной или минимальной эффекторной функцией. Еще в одном конкретном аспекте минимальная эффекторная функция является результатом "безэффекторной Fc-мутации" или агликозилирования. Еще в одном воплощении безэффекторная Fc-мутация представляет собой замену N297A или D265A/N297A в константном участке.

Еще в одном воплощении предлагается выделенное антитело к PDL1, содержащее последовательность переменного участка тяжелой цепи и последовательность переменного участка легкой цепи, где:

(a) последовательность тяжелой цепи имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с последовательностью тяжелой цепи:

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTK
```

(SEQ ID NO:8),

(b) последовательности легкой цепи имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности с последовательностью легкой цепи:

```
DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:7).
```

В некоторых воплощениях предлагается выделенное антитело к PDL1, содержащее последовательность переменного участка тяжелой цепи и последовательность переменного участка легкой цепи, где последовательность переменного участка легкой цепи имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7. В некоторых воплощениях предлагается выделенное антитело к PDL1, содержащее последовательность переменного участка тяжелой цепи и последовательность переменного участка легкой цепи, где последовательность переменного участка тяжелой цепи имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8. В некоторых воплощениях предлагается выделенное антитело к PDL1, содержащее последовательность переменного участка тяжелой цепи и последовательность переменного участка легкой цепи, где последовательность переменного участка легкой цепи имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и последовательность переменного участка тяжелой цепи имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8.

Еще в одном воплощении предлагается выделенное антитело к PDL1, содержащее последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи, где:

(a) последовательность тяжелой цепи имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с последовательностью тяжелой цепи:

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDNLN
GKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVMEALHNHYTQKLSLSL
SPG (SEQ ID NO:10),
```

или

(b) последовательность легкой цепи имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности с последовательностью легкой цепи:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
 RFGSGSGSTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:9).

В некоторых воплощениях предлагается выделенное антитело к PDL1, содержащее последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи, где последовательность легкой цепи имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9. В некоторых воплощениях предлагается выделенное антитело к PDL1, содержащее последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи, где последовательность тяжелой цепи имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10. В некоторых воплощениях предлагается выделенное антитело к PDL1, содержащее последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи, где последовательность легкой цепи имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9, и последовательность тяжелой цепи имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10.

В некоторых воплощениях выделенное антитело к PDL1 представляет собой окисленное моноклональное антитело. В некоторых воплощениях окисленное моноклональное антитело в композиции содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых воплощениях окисленное моноклональное антитело в композиции содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, где один или несколько из остатков W33, W50, или W101 является окисленным. В некоторых воплощениях окисленное моноклональное антитело в композиции содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, где один или несколько из остатков M253 и M429 является окисленным. В некоторых воплощениях окисленное моноклональное антитело сохраняет по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90% или по меньшей мере примерно 95% его биологической активности (например, связывание с мишенью или терапевтическая эффективность), проявляемой до хранения, т.е. в момент приготовления фармацевтической композиции.

В некоторых воплощениях выделенное антитело к PDL1 представляет собой гликозилированное моноклональное антитело. В некоторых воплощениях гликозилированное моноклональное антитело в композиции содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В некоторых воплощениях гликозилированное моноклональное антитело в композиции содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, где один или несколько из остатков лизина являются гликозилированными. В некоторых воплощениях гликозилированное моноклональное антитело в композиции содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, где K65 является гликозилированным.

В некоторых воплощениях выделенное антитело к PDL1 является агликозилированным.

В любом из воплощений настоящего изобретения выделенное антитело к PDL1 может связываться с человеческим PD-L1, например, с человеческим PD-L1, представленным в UniProtKB/Swiss-Prot регистр. NO.Q9NZQ7.1, или с его вариантом.

Еще в одном воплощении предлагается выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любое из антител, описанных в настоящем изобретении. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота дополнительно содержит вектор, подходящий для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей любое из ранее описанных антител к PDL1. Еще в одном дополнительном аспекте, вектор присутствует в клетке хозяине, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты. Еще в одном дополнительном конкретном аспекте клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку или прокариотическую клетку. Еще в одном

дополнительном конкретном аспекте эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего, такую как клетка яичников китайского хомяка (СНО).

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть получено методами, известными в данной области, например, методом, включающим культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую любое из ранее описанных антител к PDL1 или его антигенсвязывающий фрагмент, в форме, подходящей для экспрессии при условиях, подходящих для продуцирования такого антитела или его фрагмента и для извлечения антитела или его фрагмента.

В. Получение антитела.

Антитело в композиции получают с использованием методов, доступных в данной области для генерации антител, некоторые из таких примерных методов описаны в следующих разделах.

Антитело направлено против антигена, представляющего интерес (т.е. PD-L1, такого как человеческий PD-L1). Предпочтительно, антиген представляет собой биологически важный полипептид, и введение антитела млекопитающему, страдающему расстройством, может в результате приводить к терапевтической пользе для млекопитающего.

(i) Получение антигена.

Растворимые антигены или их фрагменты, необязательно конъюгированные с другими молекулами, могут использоваться в качестве иммуногенов для генерации антител. Для трансмембранных молекул, таких как рецепторы, эти фрагменты (например, внеклеточный домен рецептора) могут использоваться в качестве иммуногена. Альтернативно, клетки, экспрессирующие трансмембранную молекулу, могут использоваться в качестве иммуногена. Такие клетки могут быть выделены из натурального источника (например, опухолевых клеточных линий) или могут представлять собой клетки, которые трансформированы с помощью рекомбинантных методов для экспрессии трансмембранной молекулы. Другие антигены и их формы, применяемые для получения антител, будут очевидны для специалистов в данной области.

(ii) Некоторые методы на основе антител.

Поликлональные антитела предпочтительно нарабатывают у животных с помощью множества подкожных (sc) или внутрибрюшинных (ip) инъекций соответствующего антигена и адьюванта. Это может быть полезно для конъюгации соответствующего антигена с белком, который является иммуногенным в виде животного, которое иммунизируют, например, гемоцианин лимфы улитки, сывороточный альбумин, бычий тироглобулин или соевый ингибитор трипсина с использованием бифункционального или модифицированного агента, например, малеимидобензоил сульфосукцинимидного эфира (конъюгация через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимид (через остатки лизина), глутаральдегида, янтарного ангидрида, SOCl_2 , или $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, где R и R^1 представляют собой различные алкильные группы.

Животных иммунизируют против антигена, иммуногенных конъюгатов или их производных путем объединения, например, 100 мкг или 5 мкг белка или конъюгата (для кроликов или мышей соответственно) с использованием 3 объемов полного адьюванта Фрейнда и путем внутрикожной инъекции раствора во множество сайтов. Через один месяц животных повторно иммунизируют с использованием 1/5-1/10 от исходного количества пептида или конъюгата в полном адьюванте Фрейнда с помощью подкожной инъекции во множество сайтов. Через 7-14 дней у животных проводят забор крови и анализируют сыворотку на предмет антительного титра. Животных иммунизируют до тех пор, пока значение титра не выйдет на плато. Предпочтительно, животное иммунизируют с использованием конъюгата того же антигена, но конъюгированного с другим белком и/или посредством перекрестно-связывающего реагента. Конъюгаты также могут быть получены в рекомбинантной клеточной культуре в виде белковых химер. Кроме того, агрегирующие агенты, такие как алюмин, подходят для использования для усиления иммунного ответа.

Моноклональные антитела по изобретению могут быть получены с использованием гибридомного метода, впервые описанного Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), и дополнительно описанные, например, в Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), и в Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) касательно гибридом человек-человек. Дополнительные методы включают описанные, например, в пат. США № 7189826, касающегося получения моноклональных человеческих натуральных антител IgM из гибридных клеточных линий. Технология человеческой гибридомы (технология Триомы) описана у Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) и Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Для других различных гибридомных методов см., например, US 2006/258841; US 2006/183887 (полностью человеческие антитела), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; и пат. США № 7078492 и 7153507. Приведенный в качестве примера протокол получения моноклональных антител с использованием гибридомного метода подробно описан ниже. В одном воплощении мышь или другое подходящее животное-хозяин, такое как хомяк, иммунизируют, чтобы извлечь лимфоциты, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфично связываться с белком, используемым для иммунизации. Антитела вырабатываются у животных с помощью множества подкожных (sc) или внутрибрюшинных (ip) инъекций полипептида по изобретению или его фрагмента, и адьюванта, такого как монофосфорил липид А (MPL)/трегалоза дикриномиклат (TDM) (Ribi Immuno-

chem. Research, Inc., Гамильтон, Монтана.). Полипептид по изобретению (например, антиген) или его фрагмент может быть получен с использованием методов, хорошо известных в данной области, таких как рекомбинантные методы, некоторые из которых дополнительно описаны в настоящем изобретении. Сыворотку из иммунизированных животных анализируют на предмет антител к антигену и необязательно проводят бустерные иммунизации. Выделяют лимфоциты из животных, продуцирующих антитела к антигену. Альтернативно, лимфоциты могут иммунизировать *in vitro*.

Лимфоциты затем сливают с миеломными клетками с использованием подходящего агента слияния, такого как полиэтиленгликоль, с образованием гибридной клетки. См., например, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, p. 59-103 (Academic Press, 1986). Могут использоваться миеломные клетки, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильный высокий уровень продуцирования антитела выбранными антитело-продуцирующими клетками, и которые являются чувствительными к среде, такой как среда НАТ. Типичные миеломные клетки включают, в частности, такие, как те, что выделены из мышинных опухолей МОРС-21 и МРС-11, доступных из центра распределения клеток Института Солка, Сан Диего, Калифорния, США, и клетки SP-2 или X63-Ag8-653, доступные из Американской Типированной Коллекции Клеточных Культур, Роквилл, Мэриленд, США. Человеческие миеломные и гетеромиеломные клеточные линии человек-мышь также описаны для продуцирования человеческих моноклональных антител (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Полученные таким образом гибридные клетки высевают и растят в подходящей культуральной среде, например, которая содержит одно или несколько веществ, которые ингибируют рост или выживаемость не слитых, родительских миеломных клеток. Например, если родительские миеломные клетки лишены фермента гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (HGPRT или HPRT), то культуральная среда для гибридом, как правило, будет включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин ("НАТ-среда"), вещества, которые предотвращают рост дефицитных по HGPRT клеток. Предпочтительно, бессывороточные культуральные методы получения гибридом используются для уменьшения применения выделенной из животных сыворотки, такой как фетальная бычья сыворотка, как описано, например, в Even et al., *Trends in Biotechnology*, 24 (3), 105-108 (2006).

Олигопептиды в виде средства для улучшения продуктивности гибридных клеточных культур описаны, например в Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005). Конкретно, стандартная культуральная среда обогащается конкретными аминокислотами (аланин, серин, аспарагин, пролин), или фракциями белковых гидролизатов, и где апоптоз может значительно подавляться синтетическими олигопептидами, состоящими из аминокислотных остатков в количестве от трех до шести. Пептиды присутствуют в миллимолярных или в более высоких концентрациях.

Культуральная среда, в которой растут гибридные клетки, может быть проанализирована на предмет продуцирования моноклональных антител, которые связываются с антигеном по изобретению. Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридными клетками, может быть определена иммунопреципитацией, или с помощью *in vitro* анализа связывания, такого как радиоиммунный анализ (РИА) или иммуноферментный анализ (ИФА). Аффинность связывания моноклонального антитела может быть определена, например, с помощью анализа Скэтчарда. См., например, Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

После идентификации гибридных клеток, которые продуцируют антитела с целевой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны могут быть субклонированы процедурой лимитирующих разведений и выращены стандартными способами. См., например, Goding, выше. Подходящие культуральные среды для этих целей включают, например, среду D-MEM или RPMI-1640. Кроме того, гибридные клетки могут быть выращены *in vivo* в виде асцитных опухолей в животных. Моноклональные антитела, секретированные субклонами, отделяют подходящим способом от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки обычными способами очистки иммуноглобулинов, такими как, например, на сефарозе с Протеином А, гидроксилпатитная хроматография, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. Одна из процедур выделения белков из гибридных клеток, описана в US 2005/176122 и в пат. США № 6919436. Метод включает использование минимальных солей, таких как лиотропные соли, в процессе связывания, а также предпочтительно использование небольших количеств органических растворителей в процессе элюирования.

(iii) Некоторые методы скрининга библиотек.

Антитела по изобретению могут быть получены с использованием комбинаторных библиотек для скрининга на предмет поиска антител с целевой активностью или активностями. Например, в данной области известно множество методов генерации библиотек фагового дисплея и скрининга таких библиотек на предмет поиска антител, обладающих целевыми характеристиками связывания. Такие методы описаны в общем в Hoogenboom et al., в *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J., 2001). Например, один из методов генерации антител, представляющих интерес, осуществляют путем применения фаговой библиотеки антител, как описано в Lee et al., *J. Mol. Biol.* (2004), 340 (5):1073-93.

В общем, клоны синтетических антител селекционируют путем скрининга фаговых библиотек, содер-

жащих фаг, который экспонирует различные фрагменты вариабельного участка антитела (Fv), сшитые с оболочечным белком фага. Такие фаговые библиотеки готовят с помощью аффинной хроматографии против целевого антигена. Клоны, экспрессирующие фрагменты Fv, способные связываться с целевым антигеном, адсорбируются на антиген и, таким образом, отделяются от несвязавшихся клонов библиотеки. Связавшиеся клоны затем элюируют с антигена и могут дополнительно обогащать с помощью дополнительных циклов адсорбция антигена/элюирование. Любое из антител по изобретению может быть получено путем дизайна подходящей процедуры антигенного скрининга для селекции фагового клона, представляющего интерес, с последующим конструированием клона полноразмерного антитела с использованием последовательностей Fv из фагового клона, представляющего интерес, и подходящих последовательностей константного участка (Fc), описанных у Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3.

В некоторых воплощениях антигенсвязывающий домен антитела образуется из двух вариабельных участков (V) примерно по 110 аминокислот, один из которых из легкой цепи (VL), а другой из тяжелой цепи (VH), которые оба представляют три гипервариабельные петли (HVR) или участки, определяющие комплементарность (CDR). Вариабельные домены могут функционально экспонироваться на фаге либо в виде одноцепочечных фрагментов Fv (scFv), в которых VH и VL ковалентно связаны посредством короткого, гибкого пептида, либо в виде фрагментов Fab, где каждый из них сшит с константным доменом и взаимодействует нековалентно, как описано в Winter et al., *Алл. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). При использовании в настоящем изобретении, фаговые клоны, кодирующие scFv, и фаговые клоны, кодирующие Fab, вместе относятся к "Fv фаговым клоном" или "Fv-клоном".

Репертуары генов VH и VL могут по отдельности клонироваться с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и подвергаться случайной рекомбинации в фаговых библиотеках, которые затем могут использоваться для поиска антигенсвязывающих клонов, как описано в et al., *Алл. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Библиотеки из иммунизированных источников обеспечивают высоко-аффинные антитела по отношению к иммуногену без необходимости конструирования гибридом. Альтернативно, наивный репертуар может клонироваться с получением единственного источника человеческих антител с широким спектром чужих, а также собственных антигенов без какой-либо иммунизации, как описано в Griffiths et al., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993). Наконец, наивные библиотеки также могут быть получены синтетически путем клонирования не перетасованных сегментов V-гена из стволовых клеток и путем использования ПЦР-праймеров, содержащих случайные последовательности, для кодирования высоковариабельных участков CDR3 и для достижения перестройки *in vitro*, как описано в Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

В некоторых воплощениях нитевидный фаг используется для экспонирования фрагментов антител путем сшивки с минорным оболочечным белком рIII. Фрагменты антител могут экспонироваться в виде одноцепочечных фрагментов Fv, в которых домены VH и VL соединены на одной полипептидной цепи с помощью гибкого полипептидного спейсера, например, как описано в Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), или фрагментов Fab, в которых одна цепь сшита с рIII, а другая секретируется в периплазматическое пространство бактериальной клетки-хозяина, где происходит сборка структуры Fab-оболочечного белка, которая начинает экспонироваться на фаговой поверхности путем замещения какого-то из оболочечных белков дикого типа, например, как описано в Hoogenboom et al., *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

В общем, нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты генов антител, получают из иммунных клеток людей или животных. Если целесообразно получить библиотеку с клонами антител к определенным антигенам, то объекты иммунизируют с помощью антигена для генерации антительного ответа и извлекают клетки селезенки и/или циркулирующие В-клетки или другие лимфоциты периферической крови (PBL) для конструирования библиотеки. В одном воплощении получали библиотеку фрагментов генов антител с клонами антител к антигенам путем генерации антительного ответа на антиген в трансгенных мышах, несущих набор функциональных генов иммуноглобулинов человека (и лишенных системы продуцирования функциональных эндогенных антител), так что иммунизация антигеном порождала В-клетки, продуцирующие человеческие антитела против антигена. Генерация трансгенных мышей, продуцирующих человеческие антитела, описана ниже.

Можно получить дополнительное обогащение клеточной популяции, реактивной против антигена, путем использования подходящей процедуры скрининга для выделения В-клеток, экспрессирующих антиген-специфичное мембранно-связанное антитело, например, с помощью разделения клеток с помощью антигенной аффинной хроматографии или адсорбции клеток на меченный флуорохромом антиген с последующей проточной цитометрией (FACS).

Альтернативно, использование клеток селезенки и/или В-клеток или других PBL из не иммунизированного донора обеспечивает лучшую репрезентативность возможного антительного репертуара, а также дает возможность конструирования библиотеки антител с использованием любого вида животных (человека или другого животного), в котором антиген не является антигенным. Для библиотек, включающих *in vitro* конструирование генов антител, у объекта проводят забор стволовых клеток для получения нуклеиновых кислот, кодирующих сегменты не перетасованных генов антител. Иммунные клетки, пред-

ставляющие интерес, могут быть получены из множества видов животных, таких как человек, мышь, крыса, заяц, волк, собака, кошка, свинья, крупный рогатый скот, лошадиные и виды птиц и т.д.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую сегменты вариабельных генов антитела (включая сегменты VH и VL), извлекают из клеток, представляющих интерес, и амплифицируют. В случае библиотек перетасованных генов VH и VL, целевая ДНК может быть получена путем выделения ДНК или РНК из лимфоцитов с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с праймерами на 5'- и 3'-концы перетасованных генов VH и VL, как описано у Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), получая таким образом различные репертуары генов V для экспрессии. Гены V могут амплифицироваться с кДНК или с геномной ДНК с обратными праймерами на 5'-конец экзона, кодирующего зрелый V-домен и прямыми праймерами на внутреннюю область J-сегмента, как описано у Orlandi et al. (1989) and in Ward et al., Nature, 341: 544-546 (1989). Однако для амплификации с кДНК обратные праймеры также могут быть сделаны на основе лидерного экзона, как описано у Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991), а прямые праймеры находятся внутри константного участка, как описано у Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Для максимума участочности, вырожденность может быть включена в праймеры, как описано у Orlandi et al. (1989) or Sastry et al. (1989). В некоторых воплощениях разнообразия библиотеки максимизируется путем использования ПЦР-праймеров для каждого семейства V-генов с целью амплификации всех доступных конфигураций VH и VL, присутствующих в образце нуклеиновой кислоты иммунной клетки, например, как описано в методе Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), или как описано в методе Orum et al., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Для клонирования амплифицированной ДНК в экспрессирующем векторе, редкие рестрикционные сайты могут быть введены внутрь ПЦР-праймеров в виде метки на одном конце, как описано у Orlandi et al. (1989), или путем дополнительной ПЦР-амплификации с меченым праймером, как описано у Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991).

Репертуары синтетически перетасованных V-генов могут быть выделены *in vitro* сегментов V-генов. Большинство сегментов человеческих VH-генов проклонированы и отсекарованы (опубликовано в Tomlinson et al., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)), а также прокартированы (reported in Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)); эти клонированные сегменты (включающие все главные конформации H1 и H2 петли) могут использоваться для генерации разнообразных репертуаров VH-генов с использованием ПЦР-праймеров, кодирующих H3-петли множества последовательностей и множества размеров, как описано у Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). VH-репертуары также могут быть получены с использованием всего разнообразия последовательностей, сфокусированного в длинной H3-петле единственного размера, как описано у Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Человеческие сегменты V_κ и V_λ были проклонированы и отсекарованы (опубликовано в Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)), и могут использоваться для получения синтетических репертуаров легкой цепи. Синтетические репертуары V-генов на основе диапазона сборок VH и VL, а также размеров L3 и H3 будут кодировать антитела предполагаемого структурного разнообразия. После амплификации ДНК, кодирующей V-гены, сегменты зародышевых V-генов могут быть перетасованы *in vitro* согласно методам Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Репертуары фрагментов антител могут быть сконструированы путем объединения вместе репертуаров генов VH и VL несколькими способами. Каждый репертуар может быть создан в различных векторах, и векторы рекомбинируют *in vitro*, например, как описано у Hogrefe et al., Gene, 128: 119-126 (1993), или *in vivo* с помощью комбинаторной инфекции, например, с помощью loxP-системы, описанной у Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). Способ *in vivo* рекомбинации использует двухцепочечные натуральные фрагменты Fab для преодоления предела размера библиотеки, который налагается эффективностью трансформации *E. coli*. Наивные репертуары VH и VL клонируют по отдельности, один в фагидный, а другой в фаговый вектор. Затем две библиотеки объединяют с помощью фаговой инфекции фагида-содержащих бактерий так, чтобы каждая клетка содержала отличную комбинацию, и тогда размер библиотеки ограничивается только количеством присутствующих клеток (примерно 10¹² клонов). Оба вектора содержат *in vivo* сигналы рекомбинации так, чтобы гены VH и VL рекомбинировали на единственном репликоне и вместе упаковывались в фаговые вирионы. Эти огромные библиотеки обеспечивают большое количество различных антител хорошей аффинности (K_d⁻¹ примерно 10⁸ M).

Альтернативно, репертуары могут клонироваться последовательно в тот же вектор, как описано у Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), или могут собираться вместе с помощью ПЦР и затем клонироваться, например, как описано у Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). ПЦР-сборка также может использоваться для соединения ДНК VH и VL вместе с ДНК, кодирующей гибкий пептидный спейсер с образованием одноцепочечных репертуаров Fv (scFv). Еще в одном методе, "ПЦР-сборка в клетке" используют для объединения генов VH и VL внутри лимфоцитов с помощью ПЦР, и затем клонируют репертуары связанных генов, как описано у Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

Антитела, произведенные наивными библиотеками (либо натуральные, либо синтетические) могут быть умеренной аффинности (K_d⁻¹ примерно 10⁶-10⁷ M⁻¹), но созревание аффинности также может имитироваться *in vitro* путем конструирования библиотеки или повторной селекции из вторичных библиотек,

как описано у Winter et al. (1994), выше. Например, может вводиться случайная мутация *in vitro* путем применения полимеразы пониженной точности (опубликовано у Leung et al., *Technique 1*: 11-15 (1989)) в методе Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) или в методе Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89: 3576-3580 (1992). Кроме того, созревание аффинности может осуществляться с помощью введения случайной мутации одного или нескольких CDR, например, с использованием ПЦР с праймерами, несущими случайную последовательность, охватывающую CDR, представляющий интерес, в выбранные индивидуальные клоны Fv, и путем скрининга на предмет поиска клонов с более высокой аффинностью. WO 9607754 (опубликовано 14 марта 1996 г.) описывает способ индукции мутагенеза в участке, определяющем комплементарность, легкой цепи иммуноглобулина с созданием библиотеки генов легкой цепи. Другой эффективный способ представляет собой рекомбинацию доменов VH или VL, выбранных с помощью фагового дисплея, вместе с репертуарами природных вариантов домена V, полученных из иммунизированных доноров, и скрининг на предмет поиска более высокой аффинности с использованием нескольких раундов перетасовки цепи, как описано у Marks et al., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Данный метод дает возможность продуцирования антител и фрагментов антител с аффинностями, составляющими примерно 10^9 М или менее.

Скрининг библиотек может осуществляться с помощью множества методов, известных в данной области. Например, антиген может использоваться для покрытия лунок адсорбирующих планшетов, может экспрессироваться на клетках-хозяевах, прикрепленных на адсорбирующих планшетах, или может использоваться в клеточном сортинге, или может конъюгироваться с биотином для захвата с использованием стрептавидин-покрытых гранул, или может использоваться в любом другом методе для приготовления библиотек фагового дисплея.

Образцы фаговой библиотеки контактируют с иммобилизованным антигеном при условиях, подходящих для связывания по меньшей мере части фаговых частиц с адсорбентом. Обычно условия, включающие pH, ионную силу, температуру и т.п., выбирают для имитации физиологических условий. Фаги, связанные с твердой подложкой, промывают и затем элюируют с использованием кислоты, как например, описано у Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), или с использованием щелочи, как например, описано у Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), или с помощью антигенной конкуренции, как например, в процедуре, аналогичной методу антигенной конкуренции Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991). Фаги могут быть обогащены в 20-1000 раз за один раунд селекции. Кроме того, обогащенные фаги могут расти в бактериальной культуре и могут подвергаться дополнительным раундам селекции.

Эффективность селекции зависит от многих факторов, включающих кинетику диссоциации во время промывки, а также ответ на вопрос, может ли множество фрагментов антител на единственном фаге одновременно контактировать с антигеном. Антитела с быстрой кинетикой диссоциации (и со слабой аффинностью связывания) могут удерживаться путем применения коротких промывок, поливалентного фагового дисплея и высокой плотности покрытия антигена на твердой подложке. Высокая плотность не только стабилизирует фаг посредством поливалентного взаимодействия, но и благоприятствует повторному связыванию фага, который диссоциировал. Селекция антител с медленной кинетикой диссоциации (и хорошей аффинностью связывания) может стимулироваться путем использования длительных промывок и моновалентного фагового дисплея, как описано у Bass et al., *Proteins*, 8: 309-314 (1990) и в WO 92/09690, и с использованием низкой плотности покрытия антигена, как описано у Marks et al., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

Возможен выбор между фаговыми антителами к антигену с различной аффинностями, даже с аффинностями, которые отличаются незначительно. Однако случайная мутация выбранного антитела (например, как в некоторых методах с созреванием аффинности) вероятно породит множество мутаций, большинство со связыванием с антигеном и немногие с более высокой аффинностью. При ограничении антигеном редкий фаг с высокой аффинностью может быть конкурентным. Для сохранения мутантов с более высокой аффинностью фаги могут инкубироваться с избытком биотинилированного антигена при концентрации, которая ниже, чем целевая молярная константа для антигенной аффинности. Фаги с высокой аффинностью связывания могут затем захватываться с помощью парамагнитных гранул, покрытых стрептавидином. Такой "равновесный захват" дает возможность антителам селективироваться согласно их аффинностям связывания с чувствительностью, которая позволяет выделить мутантных клонов с настолько маленькой аффинностью, как например, с двукратным превышением аффинности из высокого избытка фагов с более низкой аффинностью. Условия, используемые для промывки фагов, связанных с твердой подложкой, также могут регулироваться на основе кинетики диссоциации.

Клоны антител к антигенам могут быть селективированы на основе их активности. В некоторых воплощениях в изобретении предлагаются антитела к антигенам, которые связываются с живыми клетками, которые в естественных условиях экспрессируют антиген, или связываются со свободно плавающим антигеном или с антигеном, прикрепленным к другим клеточным структурам. Клоны Fv, соответствующие таким антителам к антигенам, могут быть выбраны с помощью (1) выделения клонов антител к антигенам из фаговой библиотеки, как описано выше и, необязательно, амплификации выделенной популяции фаговых клонов путем выращивания популяции в подходящем бактериальном хозяине; (2) выбора

антигена и второго белка, против которого целесообразна блокирующая и неблокирующая активность, соответственно; (3) адсорбции фаговых клонов антител к антигену на иммобилизованный антиген; (4) использования избытка второго белка для элюирования любых нежелательных клонов, которые распознают антигенсвязывающие детерминанты, которые перекрывают или совместно используются связывающими детерминантами второго белка; и (5) элюирования клонов, которые остались адсорбированными после стадии (4). Необязательно, клоны с целевыми свойствами блокирования/разблокирования могут быть дополнительно обогащены путем одного или нескольких повторений процедур селекции, описанных в настоящем изобретении.

ДНК, кодирующие моноклональные антитела, выделенные из гибридом, или Fv-клоны фагового дисплея по изобретению легко выделяются с использованием стандартных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных праймеров, разработанных для специфичной амплификации кодирующих участков тяжелой и легкой цепи, представляющих интерес, из гибридом или ДНК-матриц фага). После выделения ДНК может помещаться в экспрессирующие векторы, которые затем трансформируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичников китайского хомяка (CHO) или клетки миеломы, которые без этого не производят белок иммуноглобулина, для получения синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи по рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующей антитело, включают Skerra et al., *Curr. Opin. in Immunol.*, 5: 256 (1993) и Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151 (1992).

ДНК, кодирующие Fv-клоны по изобретению, могут объединяться с известными ДНК-последовательностями, кодирующими константные участки тяжелой и/или легкой цепи (например, соответствующие ДНК-последовательности могут быть получены из Kabat et al., выше) с образованием клонов, кодирующих полноразмерную или неполную тяжелую и/или легкую цепь. Понятно, что константные участки любого изотипа могут использоваться для данной цели, включая константные участки IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные участки могут быть получены из человека или из любого вида животного. Fv-клон, выделенный из ДНК переменного домена одного вида животного (такого как человек), и затем сшитый с ДНК константного участка другого вида животного с образованием кодирующей последовательности "гибрида", полноразмерная тяжелая цепь и/или легкая цепь включена в определение "химерное" и "гибридное" антитело, согласно настоящему изобретению. В некоторых воплощениях Fv-клон, выделенный из человеческой переменной ДНК, сшивается с ДНК человеческого константного участка с образованием кодирующей последовательности для полноразмерной или неполной человеческой тяжелой и/или легкой цепи.

ДНК, кодирующая антитело к антигену, выделенное из гибридомы по изобретению, также может быть модифицировано, например, путем замены кодирующей последовательности константных доменов человеческой тяжелой и легкой цепи вместо гомологичных мышиных последовательностей, выделенных из гибридомного клона (например, как в методе Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). ДНК, кодирующая антитело или его фрагмент, выделенное из гибридомы или из Fv-клона, может дополнительно модифицироваться путем ковалентной связи с кодирующей последовательностью иммуноглобулинов с полной или с неполной кодирующей последовательностью полипептида - не иммуноглобулина. Таким способом получают "химерные" или "гибридные" антитела, которые обладают высокой специфичностью связывания антител по изобретению, выделенных из Fv-клона или из гибридомного клона.

(iv) Гуманизированные и человеческие антитела.

Различные методы гуманизации антител животного происхождения хорошо известны в данной области. Например, гуманизированное антитело имеет один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который не является человеком. Аминокислотные остатки из источника, который не является человеком, часто называются импортированными остатками, которые, как правило, берутся из "импортирующего" переменного домена. Гуманизация может быть по существу проведена согласно методу Winter и соавторов (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), путем замены последовательностей CDR или последовательности CDR грызунов на соответствующие последовательности человеческого антитела. Соответственно, такие "гуманизированные" антитела являются химерными антителами (пат. США № 4816567), где по существу заменили меньше чем интактный переменный домен соответствующей последовательностью из вида, отличного от человека. На практике, гуманизированные антитела как правило являются человеческими антителами, в которых некоторые остатки в CDR и возможно некоторые остатки FR заменены на аналогичные участки в антителах грызунов.

Выбор человеческих переменных доменов, как легкой, так и тяжелой цепи, используемых в получении гуманизированных антител, очень важен для уменьшения антигенности. Согласно так называемому методу "наилучшего соответствия" последовательность переменного домена антитела грызуна скринируется против всей библиотеки последовательностей переменных доменов человека. Затем человеческую последовательность, которая наиболее близка к последовательности грызуна, принимают в качестве человеческой каркасной последовательности (FR) для гуманизированного антитела (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). В другом методе используется

конкретный каркас, выделенный из консенсусной последовательности для всех человеческих антител конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Тот же каркас может использоваться для некоторых других гуманизованных антител (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Дополнительно важно, чтобы антитела были гуманизованными с сохранением аффинности к антигену и с сохранением других предпочтительных биологических свойств. Для достижения данной цели согласно одному из воплощений способа, гуманизованные антитела получают способом анализа родительских последовательностей и различных концептуальных производных гуманизованных антител с помощью трехмерных моделей родительской и гуманизованной последовательностей. Трехмерные иммуноглобулиновые модели широко доступны и хорошо знакомы специалистам в данной области. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных кандидатных иммуноглобулиновых последовательностей. Просмотр этих выведенных данных позволяет анализировать вероятную роль некоторых остатков в функционировании кандидатной иммуноглобулиновой последовательности, т.е. проводить анализ остатков, которые влияют на способность кандидатного иммуноглобулина связываться с антигеном. Таким образом, FR-остатки могут быть выбраны и объединены из реципиента и импортируемых последовательностей так, чтобы достигалась целевая характеристика антитела, такая как повышенная аффинность к целевому антигену. В общем, остатки гипервариабельных участков непосредственно и наиболее существенно вовлечены во влияние на связывание с антигеном.

Человеческие антитела по изобретению могут быть сконструированы путем объединения последовательностей вариабельных доменов Fv-клонов, выбранных из человеческих библиотек фагового дисплея, вместе с известными последовательностями человеческих константных доменов, как описано выше. Альтернативно, человеческие моноклональные антитела по изобретению могут быть получены с помощью гибридного метода. Также описаны человеческие миеломные и гетеромиеломные клеточные линии человек-мышь для продуцирования человеческих моноклональных антител, как например, в Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); и Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991).

Возможно получение трансгенных животных (например, мышей), которые способны при иммунизации продуцировать полный репертуар человеческих антител при отсутствии продуцирования эндогенная делеция гена участка, соединяющего тяжелую цепь антигенных иммуноглобулинов. Например, было описано, что гомозила (J_H) в химерных и в мутантных мышах зародышевой линии, приводит в результате к полному ингибированию продуцирования эндогенных антител. Перенос зародышевого порядка расположения человеческих иммуноглобулиновых генов таким мутантным мышам зародышевой линии приведет в результате к продуцированию человеческих антител при антигенном стимулировании. См., например, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993); и Duchosal et al. Nature 355:258 (1992).

Перетасовка генов также может использоваться для выделения человеческих антител из антител животного происхождения, например, из антител грызунов, где человеческое антитело обладает сходными аффинностями и специфичностями, как у исходного антитела животного происхождения. Согласно данному методу, который также называется "эпитопный импринтинг", либо вариабельный участок тяжелой цепи, либо легкой цепи фрагмента антитела животного происхождения, полученный с помощью методов фагового дисплея, как описано в настоящем изобретении, заменяется репертуаром человеческих генов V-домена с созданием популяции химер цепь животного происхождения/человеческая цепь scFv или Fab. Селекция с использованием антигена приводит в результате к выделению химерных scFv или Fab в виде цепь животного происхождения/человеческая цепь, где человеческая цепь восстанавливает антигенсвязывающий сайт, нарушенный при удалении соответствующей цепи в первичном клоне фагового дисплея, т.е. эпитоп управляет (отпечатывает) выбором партнера в виде человеческой цепи. При повторении процесса с целью замены оставшейся цепи животного происхождения, то получают человеческое антитело (см. PCT WO 93/06213, опубликованный 1 апреля, 1993). В отличие от традиционной гуманизации антител животного происхождения путем CDR-пересадки, данный метод обеспечивает получение полностью человеческих антител, которые не имеют остатков FR или CDR животного происхождения.

(v) Фрагменты антител.

Фрагменты антител могут быть генерированы с помощью традиционных способов, таких как ферментативный гидролиз или с помощью рекомбинантных методов. В некоторых обстоятельствах, существуют преимущества использования фрагментов антител, а не цельных антител. Меньший размер фрагментов дает возможность более быстрого выведения и может приводить к образованию твердых опухолей. Для обзора некоторых фрагментов антител, см. Hudson et al. (2003), Nat. Med. 9:129-134.

Для получения фрагментов антител были разработаны различные методы. Традиционно, эти фрагменты получали посредством протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); и Brennan et al., Science,

229:81 (1985)). Однако эти фрагменты могут быть получены напрямую рекомбинатными клетками-хозяевами. Фрагменты антитела Fab, Fv и ScFv все могут экспрессироваться в *E. coli* и секретироваться из них, облегчая, таким образом, получение больших количеств этих фрагментов. Фрагменты антитела могут быть выделены из антительных фаговых библиотек, которые обсуждались выше. В ином случае, фрагменты Fab'-SH могут быть непосредственно извлечены из *E. coli* и химически связаны с образованием фрагментов F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом, F(ab')₂ фрагменты могут быть выделены напрямую из рекомбинантной клеточной культуры клеток-хозяев. Фрагменты Fab и F(ab')₂ с увеличенным *in vivo* периодом полужизни, содержащие остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации, описаны в пат. США № 5869046. Другие способы получения фрагментов антител будут очевидны для квалифицированного практика. В некоторых воплощениях антитело представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv). См. WO 93/16185; патент США № 5571894; и 5587458. Fv и scFv представляют собой уникальные типы с интактными объединенными сайтами, которые лишены константных участков; таким образом, они могут подходить для уменьшения неспецифического связывания во время *in vivo* использования. Сшитые белки scFv могут быть сконструированы с получением сшивки эффекторного белка либо на N-конце, либо на C-конце scFv. См. *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, выше. Фрагмент антитела также может представлять собой "линейное антитело", например, как описано в патенте США № 5641870. Такие линейные антитела могут быть моноспецифичными или биспецифичными.

(vi) Полиспецифичные антитела.

Полиспецифичные антитела обладают специфичностью связывания по меньшей мере для двух различных эпитопов, где эпитопы обычно из различных антигенов. В то время как такие молекулы обычно не будут связываться с двумя различными эпитопами (т.е. биспецифичные антитела, BsAb), антитела с дополнительными специфичностями, такие как триспецифичные антитела, охвачены данным выражением при его использовании в настоящем изобретении. Биспецифичные антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, F(ab')₂ биспецифичные антитела).

Способы получения биспецифичных антител хорошо известны в данной области. Традиционно, получение полноразмерных биспецифичных антител основано на коэкспрессии двух пар иммуноглобулиновых тяжелых/легких цепей, где две цепи обладают различными специфичностями (Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Из-за случайной перетасовки тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов, эти гибридомы (квадромы) продуцируют эффективную смесь из десяти различных молекул антител, из которых только одно обладает корректной биспецифичной структурой. Очистка корректной молекулы, которую обычно проводят с помощью стадий аффинной хроматографии, является довольно трудоемкой с низким выходом продукта. Подобные процедуры раскрыты в WO 93/08829 и в Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Согласно другому способу, переменные домены антитела с целевыми специфичностями связывания (антитело-рецептор антитела) сшиты с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. Сшивка предпочтительно осуществляется с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащей по меньшей мере часть шарнира, C_H2- и C_H3-участки. Это обычно происходит, если первый константный участок тяжелой цепи (C_H1), содержащий сайт, необходимый для связывания с легкой цепью, присутствует по меньшей мере в одной из химер. ДНК, кодирующую химеры тяжелых цепей иммуноглобулинов, и, при необходимости, легкую цепь иммуноглобулина, вставляют в отдельные экспрессирующие векторы, и совместно трансформируют в подходящий организм-хозяин. Это обеспечивает существенную гибкость в регуляции взаимных пропорций трех полипептидных фрагментов в тех воплощениях, когда используемые при конструировании неравные соотношения трех полипептидных цепей обеспечивают оптимальный выход. Однако можно вставить кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один вектор, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к получению высокого выхода или когда соотношения не имеют конкретного значения.

В одном воплощении данного способа, биспецифичные антитела состоят из гибридной тяжелой цепи иммуноглобулина с первой специфичностью связывания на одном фрагменте, и гибридную пару тяжелой цепи-легкой цепи иммуноглобулина (обеспечивая вторую специфичность связывания) на другом фрагменте. Было обнаружено, что данная асимметричная структура облегчает разделение целевого биспецифичного соединения от нежелательных комбинаций цепей иммуноглобулинов, поскольку присутствие легкой цепи иммуноглобулина только в одной половине биспецифичной молекулы обеспечивает легкий способ разделения. Данный способ раскрыт в WO 94/04690. Для дополнительных подробностей генерации биспецифичных антител см., например, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Согласно другому способу, описанному в WO 96/27011, область контакта между парой антительных молекул может быть сконструирована для максимизации процентного содержания гетеродимеров, которые извлекают из рекомбинантной клеточной культуры. Одна область контакта содержит по меньшей мере часть домена C_H3 константного домена антитела. В данном методе одну или несколько небольших аминокислотных боковых цепей из области контакта первой антительной молекулы заменяют на более крупные боковые цепи (например тирозина или триптофана). Компенсаторные "полости" иден-

тичного или похожего размера с крупной боковой цепью создают в области контакта второй антительной молекулы путем замены аминокислотных боковых цепей на боковые цепи меньшего размера (например, аланин или треонин). Это обеспечивает механизм повышения выхода гетеродимера по отношению к другим нежелательным конечным продуктам, таким как гомодимеры.

Биспецифичные антитела включают перекрестно-сшитые или "гетероконъюгаты" антител. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, а другое с биотином. Такие антитела были предложены, например, для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки (пат. США № 4676980) и для лечения HIV-инфекции (WO 91/00360, WO 92/200373 и EP 03089). Гетероконъюгаты антител могут быть получены с использованием стандартных методов поперечной сшивки. Подходящие агенты поперечной сшивки хорошо известны в данной области и описаны в пат. США № 4676980, наряду с другими методами поперечной сшивки.

Методы образования биспецифичных антител из фрагментов антител описаны в литературе. Например, биспецифичные антитела могут быть получены с использованием химических связей. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) описывают процедуру, где интактные антитела протеолитически расщепляются с образованием фрагментов F(ab')₂. Эти фрагменты восстанавливаются в присутствии дитиольного комплексобразующего агента арсенита натрия и предотвращают образование межмолекулярных дисульфидных связей. Образованные фрагменты Fab' затем превращаются в производные тионитробензоата (TNB). Одно из Fab'-TNB производных затем превращают обратно в Fab'-тиол путем восстановления меркаптоэтиламина и смешивают с эквимолярным количеством другого производного Fab'-TNB с образованием биспецифичного антитела. Биспецифичные антитела могут использоваться в качестве агентов для селективной иммобилизации ферментов.

Недавний прогресс облегчил прямое извлечение фрагментов Fab'-SH из *E. coli*, которые могут быть подвергнуты химической конденсации с образованием биспецифичных антител. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) описывают получение полностью гуманизированной биспецифичной антительной молекулы F(ab')₂. Каждый фрагмент Fab' отдельно секретировался из *E. coli* и подвергался направленной химической конденсации *in vitro* с образованием биспецифичного антитела.

Также описаны различные методы получения и выделения фрагментов биспецифичных антител непосредственно из рекомбинантной клеточной культуры. Например, биспецифичные антитела получали с использованием метода лейциновой застежки. Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148 (5):1547-1553 (1992). Пептиды с доменом лейциновой застежки из белков Fos и Jun соединяли с частями Fab' двух различных антител с помощью генной сшивки. Гомодимеры антител восстанавливали в шарнирной участке с образованием мономеров и затем повторно окисляли с образованием гетеродимеров антител. Данный метод также применяется для получения гомодимеров антител. Технология "диатела", описанная Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993), обеспечила альтернативный механизм получения фрагментов биспецифичных антител. Фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H), связанный с переменным доменом легкой цепи (V_L) с помощью линкера, который слишком короткий для возможности спаривания между двумя доменами на одной цепи. Соответственно, домены V_H и V_L одного фрагмента вынуждены спариваться с комплементарными доменами V_L и V_H другого фрагмента, образуя таким образом два антигенсвязывающих сайта. Также была опубликована другая стратегия получения фрагментов биспецифичных антител путем использования димеров одноцепочечных Fv (sFv). См. Gruber et al, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Антитела с более чем двумя валентностями также рассматриваются. Например, могут быть получены триспецифичные антитела. Tuft et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

(vii) Однодоменные антитела.

В некоторых воплощениях антитело по изобретению является однодоменным антителом. Однодоменное антитело представляет собой единственную полипептидную цепь, содержащую весь или часть переменного домена тяжелой цепи или весь или часть переменного домена легкой цепи антитела. В некоторых воплощениях однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; см., например, патент США № 6248516 B1). В одном воплощении однодоменное антитело содержит весь или часть переменного домена тяжелой цепи антитела.

(viii) Варианты антител.

В некоторых воплощениях рассматривается модификация(и) аминокислотной последовательности антител, описанных в настоящем изобретении. Например, может быть целесообразно улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела могут быть получены путем введения соответствующих замен в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или посредством пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков внутри аминокислотных последовательностей антител. Любая комбинация делеции, вставки и замены может быть осуществлена для достижения конечного конструкта при условии, что конечный конструкт будет обладать целевыми характеристиками. Аминокислотные изменения могут вводиться в аминокислотную последовательность антитела объекта в момент получения последовательности.

(ix) Производные антител.

Антитела по изобретению могут быть дополнительно модифицированы для того, чтобы они содержали дополнительные небелковые компоненты, которые известны в данной области и легкодоступны. В некоторых воплощениях компоненты, подходящие для модификации антитела, представляют собой водорастворимые полимеры. Частные примеры водорастворимых полимеров включают, в частности, полиэтиленгликоль (PEG), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо случайные сополимеры), декстран или поли(п-винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимеры полипропиленоксида/этиленоксида, полиоксипропилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Полиэтиленгликоль-пропиональдегид может иметь преимущества в получении благодаря его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, прикрепленных к антителу, может варьироваться, и если прикреплен более чем один полимер, то они могут представлять собой одинаковые или различные молекулы. В общем, количество и/или тип полимеров, используемых для модификации, может определяться на основе факторов, включающих, в частности, конкретные свойства или функции улучшаемого антитела, будет ли производное антитела использоваться в терапии при определенных условиях и т.д.

(x) Векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные методы.

Антитела также могут быть получены с использованием рекомбинантных методов. Для рекомбинантного продуцирования антитела к антигену, выделяют нуклеиновую последовательность, кодирующую антитело, и вставляют в реплицирующийся вектор для дальнейшего клонирования (амплификация ДНК) или для экспрессии. ДНК, кодирующая антитело, легко может быть выделена с использованием стандартных процедур (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, которые способны к специфичному связыванию с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепь антитела). Доступно множество векторов. Компоненты вектора, как правило, включают, в частности, один или несколько из следующих: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или несколько генов-маркеров, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

(a) Компонент сигнальной последовательности.

Антитело по изобретению может быть получено рекомбинантно не только напрямую, но также в виде химерного полипептида с гетерологичным полипептидом, который предпочтительно представляет собой сигнальную последовательность, или другой полипептид, содержащий специфичный сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность предпочтительно представляет собой такую, которая распознается и процессируется (например, расщепляется с помощью сигнальной пептидазы) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют нативную сигнальную последовательность антитела, сигнальную последовательность заменяют на прокариотическую сигнальную последовательность, выбранную, например, из группы, состоящей из щелочной фосфатазы, пенициллиназы, Ipp или лидеров термостабильного энтеротоксина II. Для секреции в дрожжах нативная сигнальная последовательность может быть заменена, например, на лидер дрожжевой инвертазы, лидер факторов (включая лидеры α -фактора *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*), или лидер кислой фосфатазы, лидер глюкоамилазы *S. albicans* или сигнал, описанный в WO 90/13646. При экспрессии в клетках млекопитающих доступны для использования сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидеры, например, сигнал простого вируса герпеса gD.

(b) Последовательность начала репликации.

Как экспрессирующие, так и клонирующие векторы содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая дает вектору возможность реплицироваться в одном типе или в нескольких типах выбранных клеток-хозяев. Как правило, в клонирующих векторах данная последовательность представляет собой последовательность, которая дает возможность вектору реплицироваться независимо от хромосомной ДНК хозяина и включает последовательность начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для множества бактерий, дрожжей и вирусов. Последовательность начала репликации из плазмиды pBR322 подходит для большинства грам-отрицательных бактерий, 2 μ , плазмидная последовательность начала репликации подходит для дрожжей, а также различные вирусные последовательности начала репликации (SV40, полиомы, аденовируса, VSV или BPV) применяются для клонирующих векторов в клетках млекопитающих. Как правило, последовательность начала репликации не является необходимой для экспрессирующих векторов млекопитающих (как правило, последовательность начала репликации SV40 может использоваться только потому, что она содержит ранний промотор).

(c) Компонент генной селекции.

Экспрессирующие и клонирующие векторы могут содержать ген селекции, также называемый маркером селекции. Типичные гены селекции кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, к ампициллину, неомицину, метотрексату или к тетрацикли-

ну, (b) комплементируют ауксотрофный дефицит, или (c) поддерживают критические питательные элементы, недоступные из комплексной среды, например, ген, кодирующий рацемазу D-аланина для *Bacilli*.

Один из примеров схемы селекции применяет лекарственное средство для ареста роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформированы гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственному средству и, таким образом, выживают при режиме селекции. Примеры такой доминантной селекции включают неомицин, микофеноловую кислоту и гигромицин.

Другой пример подходящих маркеров селекции для клеток млекопитающих представляют собой такие маркеры, которые дают возможность идентификации клеток, компетентных для поглощения нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, такие маркеры как DHFR, глутамин синтетаза (GS), тимидин киназа, металлотионеин-I и -II, предпочтительно гены металлотионеина приматов, аденозин дезаминаза, орнитин декарбоксилаза, и т.д.

Например, клетки, трансформированные геном DHFR, идентифицируют путем культивирования трансформантов в культуральной среде, содержащей метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. При этих условиях ген DHFR амплифицируется наряду с любой другой ко-трансформированной нуклеиновой кислотой. Может использоваться клеточная линия яичников китайского хомяка (CHO), дефицитная по эндогенной активности DHFR (например, ATCC CRL-9096).

Альтернативно, клетки, трансформированные геном GS, идентифицируются путем культивирования трансформантов в культуральной среде, содержащей L-метионин сульфоксимин (Mtx), ингибитор GS. При этих условиях ген GS амплифицируется наряду с любой другой ко-трансформированной нуклеиновой кислотой. Система GS-селекции/амплификации может использоваться в комбинации с системой DHFR-селекции/амплификации, описанной выше.

Альтернативно, клетки-хозяева (конкретно, клетки-хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или ко-трансформированные последовательностями ДНК, кодирующими антитело, представляющее интерес, геном DHFR дикого типа и другим маркером селекции, таким как аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), может селективироваться с роста клетки в среде, содержащей агент селекции для маркера селекции, такой как аминокликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См. пат. США № 4965199.

Подходящий ген селекции для применения в дрожжах представляет собой ген *trp1*, присутствующий в дрожжевой плазмиде YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979)). Ген *trp1* обеспечивает маркер селекции для мутантного штамма дрожжей, лишенных способности расти в присутствии триптофана, например, ATCC № 44076 или PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). Присутствие повреждения *trp1* в геноме дрожжевой клетки-хозяина обеспечивает эффективные условия для детектирования трансформации путем роста при отсутствии триптофана. Аналогично, Leu2-дефицитные дрожжевые штаммы (ATCC 20622 или 38626) комплементируются известными плазмидами, несущими ген *Leu2*.

Кроме того, векторы, выделенные из 1,6 μ m циклической плазмиды pKD1, могут использоваться для трансформации дрожжей *Kluveromyces*. Альтернативно, экспрессирующая система для крупномасштабного получения рекомбинантного телячьего химозина было опубликовано для *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). Также раскрыты стабильные мультикопийные экспрессирующие векторы для секреции зрелого рекомбинантного человеческого сывороточного альбумина с помощью промышленных штаммов *Kluveromyces*. Fleer et al., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

(d) Промоторный компонент.

Экспрессирующие и клонирующие векторы, как правило, содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и является функционально связанным с нуклеиновой кислотой, кодирующей антитело. Промоторы, подходящие для применения с прокариотическими хозяевами, включают промотор *rhoA*, промоторные системы β -лактамазы и лактамазы, промотор щелочной фосфатазы, промоторная система триптофана (*trp*), гибридные промоторы, такие как *tac*-промотор. Однако также подходят и другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для применения в бактериальных системах также будут содержать последовательность Шайна-Дальгарно, функционально связанную с ДНК, кодирующей антитело.

Также известны промоторные последовательности эукариот. Виртуально все эукариотические гены содержат AT-богатую область, расположенную приблизительно на 25-30 оснований выше (в 5'-области) сайта инициации транскрипции. Другая последовательность, обнаруженная на расстоянии 70-80 оснований выше (в 5'-области) от старта транскрипции многих генов, представляет собой область CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом. На 3'-конце большинства эукариотических генов присутствует последовательность AATAAA, которая может являться сигналом для добавления поли-A хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности вставлены подходящим образом в эукариотические экспрессирующие векторы.

Примеры подходящих промоторных последовательностей для применения с дрожжевыми хозяевами включают промоторы 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как энзолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируват декарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкоза-6-фосфатизомераза, 3-фосфоглицерат мутаза, пируваткиназа, триозофосфатизомераза,

фосфоглюкоза-изомеразы и глюкокиназы.

Другие дрожжевые промоторы, которые являются индуцируемыми промоторами, обладающими дополнительными преимуществами транскрипции, контролируемой условиями роста, представляют собой области промотора для алкоголь дегидрогеназы 2, изоцитохрома C, кислой фосфатазы, деструктивных ферментов, ассоциированных с метаболизмом азота, металлотионеина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и ферментов, отвечающих за утилизацию мальтозы и галактозы. Подходящие векторы и промоторы для применения в дрожжевой экспрессии дополнительно описаны в EP 73657. Дрожжевые энхансеры также преимущественно используются вместе с дрожжевыми промоторами.

Транскрипция антитела из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих может контролироваться, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как Аденовирус 2), бычий вирус папилломы, птичий вирус саркомы, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В, Обезьяний вирус 40 (SV40), или из гетерологичных промоторов млекопитающих, как например, актиновый промотор или иммуноглобулиновый промотор, или из промоторов белков теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системой клеток-хозяев.

Ранние и поздние промоторы вируса SV40 обычно получают в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит последовательность начала репликации вируса SV40. Немедленно-ранний промотор человеческого цитомегаловируса стандартно получают в виде фрагмента рестрикции HindIII E. Система для экспрессии ДНК в хозяевах-млекопитающих с использованием бычьего вируса папилломы в качестве вектора раскрыта в пат. США № 4419446. Модификация данной системы описана в пат. США № 4601978. См. также Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982) об экспрессии кДНК человеческого β -интерферона в мышинных клетках под контролем промотора тимидинкиназы из вируса простого герпеса. Альтернативно, в качестве промотора может использоваться длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

(e) Компонент энхансерного элемента.

Транскрипцию ДНК, кодирующей антитело по настоящему изобретению, высшими эукариотами часто повышают путем вставки энхансерной последовательности в вектор. Известно множество энхансерных последовательностей из генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин, α -фетопротейн и инсулин). Как правило, специалист будет применять энхансер из вируса эукариотической клетки. Примеры включают энхансер SV40, который находится в поздней области от точки начала репликации (п.н. 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы в поздней области от точки начала репликации, и энхансеры аденовируса. См. также Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) по поводу энхансерных элементов для активации эукариотических промоторов. Энхансер может сплайсироваться в векторе по 5'- или 3'-положению по отношению к последовательности, кодирующей антитело, но предпочтительно он локализован в 5'-области от промотора.

(f) Компонент терминации транскрипции.

Экспрессирующие векторы, используемые в эукариотических клетках-хозяевах (дрожжевые, грибные, клетки насекомых, растительные клетки, животные клетки, человеческие или ядродержащие клетки из других многоклеточных организмов) также будут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны в 5'- и изредка в 3'-области нетранслируемых участков эукариотической или вирусной ДНК или кДНК. Эти участки содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой области мРНК, кодирующей антитело. Один из применяемых компонентов терминации транскрипции представляет собой участок полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO94/11026 и экспрессирующий вектор, раскрытый в настоящем изобретении.

(g) Селекция и трансформация клеток-хозяев.

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах настоящего изобретения представляют собой прокариотические, дрожжевые или клетки высших эукариот, описанные выше. Подходящие прокариоты для этой цели включают эубактерии, такие как грам-отрицательные или грам-положительные организмы, например, Enterobacteriaceae, такие как Escherichia, например, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например, Salmonella typhimurium, Serratia, например, Serratia marcescans, и Shigella, а также Bacilli, такие как B. subtilis и B. licheniformis (например, B. licheniformis 41P, раскрытые в DD 266710, опубликованном 12 апреля 1989 г.), Pseudomonas, такие как P. aeruginosa, и Streptomyces. Один из предпочтительных хозяев для клонирования среди E. coli представляет собой E. coli 294 (ATCC 31446), хотя другие штаммы, такие как E. coli B, E. coli X1776 (ATCC 31537), и E. coli W3110 (ATCC 27325) также подходят. Эти примеры являются иллюстративными, а не ограничивающими.

Полноразмерное антитело, белки химерных антител и фрагменты антител могут продуцироваться в бактериях, конкретно, когда не требуется гликозилирование и эффекторная функция Fc, как например, когда терапевтическое антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом (например, с токсином), который сам по себе демонстрирует эффективность в разрушении опухолевых клеток. Полноразмерные антитела имеют более продолжительный период полужизни в кровотоке. Продуцирование в E. coli более

быстрое и более экономичное. Для экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см. пат. США № 5648237 (Carter et al.), патент США № 5789199 (Joly et al.), патент США № 5840523 (Simmons et al.), в которых описан участок инициации трансляции (TIR) и сигнальные последовательности для оптимизации экспрессии и секреции. См. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), p. 245-254, где описана экспрессия фрагментов антител в *E. coli*. После экспрессии антитело может быть выделено из клеточной массы *E. coli* в растворимой фракции и может быть очищено посредством, например, колонки с протеином А или G в зависимости от изоформа. Конечную очистку проводят аналогично способу очистки антител, экспрессированных, например, в клетках СНО.

Дополнительно к прокариотам, эукариотические микробы, такие как нитевидные грибы или дрожжи, также представляют собой подходящие клонирующие и экспрессирующие хозяева для векторов, кодирующих антитела. *Saccharomyces cerevisiae* или обычные пекарские дрожжи являются наиболее широко используемыми среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Однако ряд других генов, видов и штаммов общедоступны и применяются в настоящем изобретении, такие как *Schizosaccharomyces pombe*; хозяева *Kluyveromyces*, такие как, например, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilae* (ATCC 36906), *K. thermotolerans*, и *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis*; и нитевидные грибы, такие как, например, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, и хозяева *Aspergillus*, такие как *A. nidulans* и *A. niger*. Для обзора обсуждения применения дрожжей и нитевидных грибов для продуцирования терапевтических белков см., например, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004).

Могут быть выбраны некоторые грибы и дрожжевые штаммы, в которых пути гликозилирования "гуманизированы", что приводит к продуцированию антитела с частично или полностью человеческим профилем. См., например, Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) (где описана гуманизация путей гликозилирования в *Pichia pastoris*); и Gerngross et al., выше.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированного антитела также получают из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают растительные клетки и клетки насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы и варианты и соответствующие необязательные клетки-хозяева насекомых, такие как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка), и *Bombyx mori*. Множество вирусных штаммов для трансфекции общедоступны, например, L-1 вариант *Autographa californica* NPV и Bm-5 штамм *Bombyx mori* NPV, и такие вирусы могут использоваться в качестве вируса в настоящем изобретении согласно изобретению, конкретно для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Культуры растительных клеток хлопка, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата, ряски (*Lenina-seae*), люцерны (*M. truncatula*), и табака также могут применяться в качестве хозяев. См., например, патент США № 5959177, 6040498, 6420548, 7125978, и 6417429 (где описана технология PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

Клетки позвоночных могут использоваться в качестве хозяев, и размножение клеток позвоночных в культуре (тканевая культура) стало рутинной процедурой. Примеры применяемых линий клеток-хозяев представляют собой обезьянью почечную линию CV1, трансформированную SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); человеческую эмбриональную почечную линию (клетки 293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (ВНК, ATCC CCL 10); мышинные клетки сертоли (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); обезьяньи почечные клетки (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки зеленой мартишки (VERO-76, ATCC CRL-1587); человеческие клетки карциномы шейки матки (HELA, ATCC CCL 2); собачьи почечные клетки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крыс *buffalo* (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI клетки (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); MRC 5 клетки; FS4 клетки; и клеточная линия гепатомы человека (Hep G2). Другие применяемые клеточные линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичников китайского хомяка (CHO), включая клетки DHFR⁻ CHO (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и миеломные клеточные линии, такие как NS0 и Sp2/0. Для обзора некоторых клеточных линий млекопитающих, подходящих для продуцирования антител, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), p. 255-268.

Клетки-хозяева трансфицируются вышеописанными экспрессирующими или клонирующими векторами для продуцирования антител и культивируются в обычной питательной среде, модифицированной с соответствующими изменениями для индуцирования промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих целевые последовательности.

(h) Культивирование клеток-хозяев.

Клетки-хозяева, используемые для продуцирования антитела по настоящему изобретению, могут культивироваться в различных средах. Для культивирования клеток-хозяев подходят коммерчески дос-

тупные среды, такие как Ham F10 (Sigma), Минимальная поддерживающая среда ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), и модифицированная Дульбекко среда Игла ((DMEM), Sigma). Кроме того, любая среда, описанная в Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), патент США № 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; или патент США Re. 30985, может использоваться в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любая из этих сред может быть дополнена при необходимости гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния, и фосфаты), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как Гентамицин™), микроэлементами (которые могут быть определены как неорганические соединения, как правило, присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, известных специалистам в данной области. Культуральные условия, такие как температура, pH и т.п. являются такими, как использовались ранее для клеток-хозяев, выбранных для экспрессии, и эти условия известны специалисту в данной области.

(xi) Очистка антитела.

При использовании рекомбинатных методов, антитело может продуцироваться внутриклеточно, в периплазмическое пространство либо секретироваться напрямую в среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, то на первом этапе удаляется дисперсный дебрис либо клеток-хозяев, либо лизированных фрагментов, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации. Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992) описывают процедуру выделения антител, которые секретируются в периплазмическое пространство *E. coli*. Вкратце, клеточную массу размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), EDTA и фенолметилсульфонилфторида (PMSF) в течение примерно 30 мин. Клеточный дебрис может удаляться центрифугированием. Если антитело секретируется в среду, то надосадочная жидкость из таких экспрессирующих систем, как правило, концентрируется с помощью коммерчески доступного фильтра для концентрации белка, например, блока ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеаз, такой как PMSF, может быть включен на любом из вышеуказанных этапов для ингибирования протеолиза, а антибиотики могут быть включены для предотвращения роста случайных контаминантов.

Приготовленная из клеток композиция с антителом может быть очищена с помощью, например, гидроксиапатитной хроматографии, хроматографии гидрофобного взаимодействия, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография, как правило, является одним из предпочтительных методов очистки. Возможность применения протеина А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа любого иммуноглобулинового Fc-домена, присутствующего в антителе. Протеин А может быть использован для очистки антител, в основе которых лежат тяжелые цепи $\gamma 1$, $\gamma 2$, или $\gamma 4$ (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Протеин G рекомендуется для всех мышинных изотипов и для человеческого $\gamma 3$ (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). Матрицей, к которой прикрепляется аффинный лиганд, чаще всего является агароза, но также имеются другие варианты матриц. Механически устойчивые матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол позволяют использовать более быстрые скорости потока и более короткие периоды проведения процесса по сравнению с агарозой. В случае когда антитело содержит домен C_{H3}, для очистки используют смолу Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Также доступны другие методы очистки белков, такие как фракционирование на ионообменной колонке, преципитация этанолом, обратная фаза ВЭЖХ, хроматография на силикагеле, хроматография на гепариновой сефарозе™, хроматография на анионообменной и катионообменной смоле (как например, на колонке с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и преципитация с сульфатом аммония, в зависимости от извлекаемого антитела.

В общем, в данной области техники хорошо известны различные методы получения антител для исследований, тестов и для клинических применений, которые согласуются с вышеописанными методами и/или считаются целесообразными специалистом в данной области для конкретного антитела, представляющего интерес.

С. Селекция биологически активных антител.

Антитела, полученные как описано выше, могут подвергаться одному или нескольким анализам на "биологическую активность" для селекции антитела с целевыми свойствами исходя из терапевтической перспективы или для селекции составов и условий, которые сохраняют биологическую активность антитела. Антитело может тестироваться на его способность связываться с антигеном, против которого оно было создано. Например, для антитела к PDL1, антигенсвязывающие свойства антитела могут оцениваться в анализе, который детектирует способность связываться с PDL1. В некоторых воплощениях связывание антитела может определяться, например, с помощью насыщения связывания; ИФА; и/или конкурентных анализов (например, РИА). Кроме того, антитело может подвергаться другим анализам на биологическую активность, например, с целью оценки его эффективности в качестве терапевтического

средства. Такие анализы известны в данной области и зависят от антигена-мишени для предназначенного применения антитела. Например, биологические эффекты блокады PD-L1 с помощью антитела могут оцениваться в CD8⁺Т-клетках, в мышинной модели вируса лимфатического хориоменингита (LCMV) и/или в модели сингенной опухоли, например, как описано в патенте США 8217149.

Для скрининга на предмет поиска антител, которые связываются с конкретным эпитопом на антигене, представляющем интерес, (например, таких, которые блокируют связывание антитела к PDL1, например, с PD-L1), может осуществляться стандартный эпитоп перекрестный конкурентный анализ, такой как описан в *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Альтернативно, может осуществляться эпитопное картирование, например, как описано в Champe et al., *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 (1995), для определения того, связывается ли антитело с эпитопом, представляющим интерес.

D. Приготовление композиций.

После приготовления антитела, представляющего интерес, (например, методы получения антител, которые были составлены, как описано в настоящем изобретении, будут конкретно разобраны ниже и известны в данной области), готовят фармацевтическую композицию, содержащую его. В некоторых воплощениях антитело для включения в композицию не подвергалось прежде лиофилизации, и композиция, представляющая интерес, представляет собой водную композицию. В некоторых воплощениях антитело представляет собой полноразмерное антитело. В одном воплощении антитело в композиции представляет собой фрагмент антитела, такой как F(ab')₂, в случае чего требуются решения проблем, которых может не быть в случае полноразмерного антитела (как например укорачивание антитела до Fab). Терапевтически эффективное количество антитела, присутствующего в композиции, определяют, принимая во внимание, например, объемы целевых доз и способ(ы) введения. Примерная концентрация антитела в композиции составляет примерно от 25 примерно до 150 мг/мл, или примерно от 30 примерно до 140 мг/мл, или примерно от 35 примерно до 130 мг/мл, или примерно от 40 примерно до 120 мг/мл, или примерно от 50 примерно до 130 мг/мл, или примерно от 50 примерно до 125 мг/мл, или примерно от 50 примерно до 120 мг/мл, или примерно от 50 примерно до 110 мг/мл, или примерно от 50 примерно до 100 мг/мл, или примерно от 50 примерно до 90 мг/мл, или примерно от 50 примерно до 80 мг/мл, или примерно от 54 примерно до 66 мг/мл.

Готовят водную композицию, содержащую антитело в рН-забуферированном растворе. Буфер по настоящему изобретению имеет рН в интервале примерно от 5 примерно до 7. В некоторых воплощениях рН находится в интервале примерно от 5 примерно до 6,5, рН находится в интервале примерно от 5 примерно до 6,4, в интервале примерно от 5 примерно до 6,3, рН находится в интервале примерно от 5 примерно до 6,2, рН находится в интервале примерно от 5 примерно до 6,1, рН находится в интервале примерно от 5,5 примерно до 6,1, рН находится в интервале примерно от 5 примерно до 6, рН находится в интервале примерно от 5 примерно до 5,9, рН находится в интервале примерно от 5 примерно до 5,8, рН находится в интервале примерно от 5,1 примерно до 6, рН находится в интервале примерно от 5,2 примерно до 6, рН находится в интервале примерно от 5,3 примерно до 6, рН находится в интервале примерно от 5,4 примерно до 6, рН находится в интервале примерно от 5,5 примерно до 6, рН находится в интервале примерно от 5,6 примерно до 6, рН находится в интервале примерно от 5,7 примерно до 6, или рН находится в интервале примерно от 5,8 примерно до 6. В некоторых воплощениях изобретения композиция имеет рН 6 или примерно 6. В некоторых воплощениях изобретения композиция имеет рН 5,9 или примерно 5,9. В некоторых воплощениях изобретения композиция имеет рН 5,8 или примерно 5,8. В некоторых воплощениях изобретения композиция имеет рН 5,7 или примерно 5,7. В некоторых воплощениях изобретения композиция имеет рН 5,6 или примерно 5,6. В некоторых воплощениях изобретения композиция имеет рН 5,5 или примерно 5,5. В некоторых воплощениях изобретения композиция имеет рН 5,4 или примерно 5,4. В некоторых воплощениях изобретения композиция имеет рН 5,3 или примерно 5,3. В некоторых воплощениях изобретения композиция имеет рН 5,2 или примерно 5,2. Примеры буферов, которые будут контролировать рН в данном интервале, включают ацетат гистидина (такого как L-гистидин) или ацетат натрия. В некоторых воплощениях буфер содержит ацетат гистидина или ацетат натрия в концентрации примерно от 15 примерно до 25 мМ. В некоторых воплощениях буфер содержит ацетат гистидина или ацетат натрия в концентрации примерно от 15 примерно до 25 мМ, примерно от 16 примерно до 25 мМ, примерно от 17 примерно до 25 мМ, примерно от 18 примерно до 25 мМ, примерно от 19 примерно до 25 мМ, примерно от 20 примерно до 25 мМ, примерно от 21 примерно до 25 мМ, примерно от 22 примерно до 25 мМ, примерно от 15 мМ, примерно от 16 мМ, примерно от 17 мМ, примерно от 18 мМ, примерно от 19 мМ, примерно от 20 мМ, примерно от 21 мМ, примерно от 22 мМ, примерно от 23 мМ, примерно от 24 мМ, или примерно 25 мМ. В одном воплощении буфер содержит ацетат гистидина или ацетат натрия в количестве примерно 20 мМ, рН 5. В одном воплощении буфер представляет собой ацетат гистидина или ацетат натрия в количестве примерно 20 мМ, рН 5,1. В одном воплощении буфер представляет собой ацетат гистидина или ацетат натрия в количестве примерно 20 мМ, рН 5,2. В одном воплощении буфер представляет собой ацетат гистидина или ацетат натрия в количестве примерно 20 мМ, рН 5,3. В одном воплощении буфер представляет собой ацетат гистидина или ацетат натрия в количестве примерно 20 мМ, рН 5,4. В одном воплощении буфер представляет собой ацетат гистидина

регацию антитела в композиции и/или минимизирует образование частиц в композиции и/или уменьшает адсорбцию. Например, поверхностно-активное вещество может присутствовать в композиции в количестве примерно от 0,001% примерно до 0,5% мас./об. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) составляет примерно от 0,005% примерно до 0,2%, примерно от 0,005% примерно до 0,1%, примерно от 0,005% примерно до 0,09%, примерно от 0,005% примерно до 0,08%, примерно от 0,005% примерно до 0,07%, примерно от 0,005% примерно до 0,06%, примерно от 0,005% примерно до 0,05%, примерно от 0,005% примерно до 0,04%, примерно от 0,008% примерно до 0,06%, примерно от 0,01% примерно до 0,06%, примерно от 0,02% примерно до 0,06%, примерно от 0,01% примерно до 0,05% или примерно от 0,02 примерно до 0,04%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,005% или примерно 0,005%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,006% или примерно 0,006%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,007% или примерно 0,007%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,008% или примерно 0,008%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,009% или примерно 0,009%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,01% или примерно 0,01%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,02% или примерно 0,02%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,03% или примерно 0,03%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,04% или примерно 0,04%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,05% или примерно 0,05%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,06% или примерно 0,06%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,07% или примерно 0,07%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,08% или примерно 0,08%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,1% или примерно 0,1%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,2% или примерно 0,2%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,3% или примерно 0,3%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,4% или примерно 0,4%. В некоторых воплощениях поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 20) присутствует в композиции в количестве 0,5% или примерно 0,5%.

В одном воплощении композиция содержит агенты, идентифицированные выше, (например, анти-тело, буфер, сахарозу и/или поверхностно-активное вещество) и по существу не содержит один или несколько консервантов, таких как бензиловый спирт, фенол, m-крезол, хлорбутанол и бензетоний Cl. В другом воплощении, консервант может быть включен в композицию, конкретно, где композиция является мультидозовой. Концентрация консерванта может находиться в интервале примерно от 0,1% примерно до 2%, предпочтительно примерно от 0,5% примерно до 1%. Один или несколько других фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ или стабилизаторов, таких как описанные в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980), могут быть включены в композицию при условии, что они не оказывают побочного воздействия на целевые характеристики композиции. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными по отношению к реципиентам в применяемых дозировках и концентрациях, и включают дополнительные буферные агенты; корастворители; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту и метионин; хелатирующие агенты, такие как EDTA; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); биодegradуемые полимеры, такие как полиэфиры; и/или солеобразующие противоионы. Примерные фармацевтически приемлемые носители в настоящем изобретении дополнительно включают диспергирующие агенты интерстициальных лекарственных средств, такие как растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, человеческие растворимые гликопротеины PH-20 гиалуронидазы, такие как gHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Некоторые примерные sHASEGP и методы их применения, включая gHuPH20, описаны в патентных публикациях США № 2005/0260186 и 2006/0104968. В одном аспекте sHASEGP объединяют с одной или с несколькими дополнительными гликозаминогликаназами, таким как хондроитиназы.

Композиция настоящего изобретения также может содержать более чем один белок, необходимый для лечения конкретного симптома, предпочтительно белок, который имеет дополняющие активности, которые не оказывают вредного воздействия на другой белок. Например, в случае, где антитело представляет собой антитело к PDL1, оно может объединяться с другим агентом (например, с химиотерапев-

тическим агентом и с противоопухолевым агентом).

В некоторых воплощениях оценивают или измеряют физическую стабильность, химическую стабильность или биологическую активность антитела в композиции. Любые методы, известные в данной области и описанные в примерах настоящего изобретения, могут использоваться для оценки стабильности и биологической активности антитела в композиции. Например, стабильность антитела в композиции может измеряться, в частности, с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC или эксклюзионная ВЭЖХ), с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования под контролем изображения (ICIEF), пептидного картирования, с помощью анализа малых объемов методом светотени (HIAC), и методов капиллярного электрофореза (CE), таких как анализ SE-додецилсульфат натрия (SE-SDS) и SE-гликановый анализ. В некоторых воплощениях антитело в композиции стабильно при -20°C в течение по меньшей мере примерно 6 месяцев, по меньшей мере примерно 8 месяцев, по меньшей мере примерно 10 месяцев, по меньшей мере примерно 12 месяцев, по меньшей мере примерно 14 месяцев, по меньшей мере примерно 16 месяцев, по меньшей мере примерно 18 месяцев, по меньшей мере примерно 20 месяцев, по меньшей мере примерно 21 месяцев, по меньшей мере примерно 22 месяцев, по меньшей мере примерно 23 месяцев, по меньшей мере примерно 24 месяцев, по меньшей мере примерно 3 лет, или по меньшей мере примерно 4 лет. В некоторых воплощениях антитело в композиции стабильно при $2-8^{\circ}\text{C}$ (например, 5°C) в течение по меньшей мере примерно 6 месяцев, по меньшей мере примерно 8 месяцев, по меньшей мере примерно 10 месяцев, по меньшей мере примерно 12 месяцев, по меньшей мере примерно 14 месяцев, по меньшей мере примерно 16 месяцев, по меньшей мере примерно 18 месяцев, по меньшей мере примерно 20 месяцев, по меньшей мере примерно 21 месяцев, по меньшей мере примерно 22 месяцев, по меньшей мере примерно 23 месяцев, или по меньшей мере примерно 24 месяцев. В некоторых воплощениях стабильность антитела в композиции после хранения (т.е. мономера антитела) измеряют с помощью эксклюзионной хроматографии. В некоторых воплощениях стабильность антитела в композиции после хранения (т.е. мономера антитела) измеряют с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования под контролем изображения. В некоторых воплощениях процентное содержание мономера антитела в композиции по сравнению с суммарным содержанием белка (например, включая антитело и агрегаты) составляет выше чем примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 86%, примерно 87%, примерно 88%, примерно 89%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94% или примерно 95% после хранения при -20°C в течение по меньшей мере примерно 6 месяцев, по меньшей мере примерно 12 месяцев, по меньшей мере примерно 18 месяцев, или по меньшей мере примерно 24 месяцев. В некоторых воплощениях процентное содержание мономера антитела в композиции по сравнению с суммарным содержанием белка (например, включая антитело и агрегаты) составляет выше чем примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 86%, примерно 87%, примерно 88%, примерно 89%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94% или примерно 95% после хранения при $2-8^{\circ}\text{C}$ (например, 5°C) в течение по меньшей мере примерно 6 месяцев, по меньшей мере примерно 12 месяцев, по меньшей мере примерно 18 месяцев, или по меньшей мере примерно 24 месяцев. В некоторых воплощениях процентное содержание мономера антитела в композиции по сравнению с суммарным содержанием белка (например, включая антитело и агрегаты) составляет выше чем примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 86%, примерно 87%, примерно 88%, примерно 89%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94% или примерно 95% после взбалтывания при комнатной температуре (например, примерно от 15 до 25°C) в течение по меньшей мере примерно 2 ч, по меньшей мере примерно 4 ч, по меньшей мере примерно 6 ч, по меньшей мере примерно 8 ч, по меньшей мере примерно 10 ч, по меньшей мере примерно 12 ч, по меньшей мере примерно 14 ч, по меньшей мере примерно 16 ч, по меньшей мере примерно 18 ч, по меньшей мере примерно 20 ч, или по меньшей мере примерно 24 ч. В некоторых воплощениях процентное содержание всех агрегатов (например, высокомолекулярных частиц и низкомолекулярных частиц) в композиции составляет менее чем примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, примерно 0,5%, примерно 0,6%, примерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, или примерно 10% после хранения при -20°C в течение по меньшей мере примерно 6 месяцев, по меньшей мере примерно 12 месяцев, по меньшей мере примерно 18 месяцев, или по меньшей мере примерно 24 месяцев. В некоторых воплощениях процентное содержание всех агрегатов (например, высокомолекулярных частиц и низкомолекулярных частиц) в композиции составляет менее чем примерно 0,1%, примерно 0,2%, примерно 0,3%, примерно 0,4%, примерно 0,5%, примерно 0,6%, при-

мерно 0,7%, примерно 0,8%, примерно 0,9%, примерно 1%, примерно 2%, примерно 3%, примерно 4%, примерно 5%, примерно 6%, примерно 7%, примерно 8%, примерно 9%, или примерно 10% после взбалтывания при комнатной температуре (например, примерно 15-25°C) в течение по меньшей мере примерно 2 ч, по меньшей мере примерно 4 ч, по меньшей мере примерно 6 ч, по меньшей мере примерно 8 ч, по меньшей мере примерно 10 ч, по меньшей мере примерно 12 ч, по меньшей мере примерно 14 ч, по меньшей мере примерно 16 ч, по меньшей мере примерно 18 ч, по меньшей мере примерно 20 ч, или по меньшей мере примерно 24 ч. В любом из воплощений настоящего изобретения стабильная композиция может храниться в стеклянном флаконе, в контейнере из металлического сплава или в пакете для внутривенного введения (IV). В некоторых воплощениях металлический сплав представляет собой нержавеющую сталь 316L или сплав "Хастеллой".

Композиции, используемые для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Этого легко достичь фильтрацией через стерильную фильтрационную мембрану до или после приготовления композиции.

III. Способы лечения и введение композиций антител.

Композицию вводят млекопитающему, нуждающемуся в лечении с помощью антитела, предпочтительно человеку в соответствии с известными методами, такими как внутривенное введение (например, в виде болюса или с помощью непрерывной инфузии в течение некоторого периода времени), с помощью внутримышечного, внутривентриального, внутриспинального, внутрисуставного, внутрисиновиального, внутриоболочечного, перорального, местного или ингаляционного пути введения. В одном воплощении композицию вводят млекопитающему с помощью внутривенного введения. Для таких целей, композицию могут инъектировать с использованием шприца или, например, посредством IV-катетера. В одном воплощении композицию вводят млекопитающему с помощью подкожного введения.

Соответствующая дозировка ("терапевтически эффективное количество") антитела будет зависеть, например, от типа подвергаемого лечению состояния, тяжести и типа состояния, от того, вводится ли антитело для превентивных или терапевтических целей, предыдущей терапии, истории болезни пациента и ответа на антитело, типа используемого антитела, и в зависимости от усмотрения лечащего врача. Антитело вводят подходящим образом пациенту однократно или многократно, а также антитело может вводиться пациенту в любое время после постановки диагноза. Антитело может вводиться в виде единственной терапии или совместно с другими лекарственными средствами или терапиями, применяемыми для лечения рассматриваемого патологического состояния.

В качестве общего предположения, терапевтически эффективное количество антитела, вводимого человеку, будет находиться в интервале примерно от 0,01 примерно до 50 мг/кг массы пациента, либо с помощью однократного введения, либо с помощью многократных введений. В некоторых воплощениях антитело вводят в суточной дозе, составляющей, например, примерно от 0,01 примерно до 45 мг/кг, примерно от 0,01 примерно до 40 мг/кг, примерно от 0,01 примерно до 35 мг/кг, примерно от 0,01 примерно до 30 мг/кг, примерно от 0,01 примерно до 25 мг/кг, примерно от 0,01 примерно до 20 мг/кг, примерно от 0,01 примерно до 15 мг/кг, примерно от 0,01 примерно до 10 мг/кг, примерно от 0,01 примерно до 5 мг/кг или примерно от 0,01 примерно до 1 мг/кг. В некоторых воплощениях антитело вводят в количестве 15 мг/кг. Однако могут быть применимы другие режимы дозирования. В одном воплощении антитело к PDL1, описанное в настоящем изобретении, вводят человеку в дозе, составляющей примерно 100 мг, примерно 200 мг, примерно 300 мг, примерно 400 мг, примерно 500 мг, примерно 600 мг, примерно 700 мг, примерно 800 мг, примерно 900 мг, примерно 1000 мг, примерно 1100 мг, примерно 1200 мг, примерно 1300 мг или примерно 1400 мг в первый день 21-дневного курса. Доза может вводиться в виде однократной дозы или многократно (например, 2 или 3 дозы), как например, инфузией. Доза вводимого антитела в комбинированной терапии может уменьшаться по сравнению с единственной терапией. Прогресс данной терапии легко отследить с помощью стандартных методов.

Композиции, содержащие антитело к PDL1, описанное в настоящем изобретении, могут использоваться в разнообразных *in vitro* и *in vivo* диагностиках и в терапевтических применениях. Например, композиция, содержащая антитело, может вводиться объекту или индивидууму для лечения заболевания или расстройства (например, заболевания или расстройства, опосредованного взаимодействием PD-1 и PD-L1).

В некоторых воплощениях заболевание или расстройство представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых воплощениях злокачественное новообразование представляет собой локальное проявление или метастатическое. В некоторых воплощениях злокачественное новообразование, выбранное из группы, состоящей из твердой опухоли, гематологического злокачественного новообразования, рака мочевого пузыря, злокачественного новообразования мозга, рака молочной железы, рака прямой кишки, колоректального рака, желудочно-кишечного рака, глиомы, рака головы, лейкоза, рака печени, рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого), лимфомы, миеломы, рака шеи, рака яичников, меланомы, рака поджелудочной железы, рака почек, рака слюнной железы, рака желудка, рака тимуса, эпителиального рака, рака щитовидной железы, и плоскоклеточной карциномы головы и шеи. В некоторых воплощениях подвергаемый лечению объект или индивидуум имеет PD-L1-положительные злокачественные клетки (например, детектированные с помощью ИГХ).

В некоторых воплощениях заболевание или расстройство представляет собой инфекцию. В некото-

рых воплощениях инфекция представляет собой хроническую инфекцию. В некоторых воплощениях инфекция представляет собой вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, грибную инфекцию, инфекцию гельминтами или инфекцию простейшими. В некоторых воплощениях вирусная инфекция выбрана из группы, состоящей из инфекции цитомегаловирусом Эпштейна-Барра, вирусом гепатита В, гепатита С, вирусом герпеса, вирусом кори, вирусом гриппа, вирусом иммунодефицита человека, человеческим Т-лимфотропным вирусом, вирусом лимфоцитарного хориоменингита, респираторно-синцитальным вирусом и/или риновирусом. В некоторых воплощениях бактериальная инфекция выбрана из группы, состоящей из *Helicobacter* spp., *Mycobacterium* spp., *Porphyromonas* spp., *Chlamydia* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Klebsiella* spp., *Borrelia* spp., *Bacterioides* spp., и *Treponema* sp. В некоторых воплощениях протозойная инфекция выбрана из группы, состоящей из *Leishmania* sp., *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma* spp., *Toxoplasma* spp., *Tyranosoma* spp., и *Taenia* sp. В некоторых воплощениях грибная инфекция выбрана из группы, состоящей из бластомикоза, кокцидиоидоза, гистоплазмоза, кандидоза, криптококкоза, аспергиллеза, мукомикоза и пневмоцистоза.

В некоторых воплощениях заболевание или расстройство представляет собой воспалительное заболевание. В некоторых воплощениях воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из следующих: острый рассеянный энцефаломиелит, болезнь Аддисона, болезнь Альцгеймера, болезнь Бехтерева, синдром антифосфолипидных антител, атеросклероз, аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунный гепатит, артрит, болезнь Бехчета, болезнь Бергера, буллезный пемфигоид, целиакия, болезнь Чагаса, холангит, болезнь Крона, дерматомиозит, сахарный диабет типа 1, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, трансплантат против хозяина, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, болезнь Хашимото, крапивница, гиперсиндром IgE, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, системная красная волчанка, волчаночный нефрит, рассеянный склероз, миастения Gravis, отторжения трансплантации органов, болезнь Паркинсона, пузырчатка, пернициозная анемия, полимиозит, первичный билиарный цирроз печени, псориаз, синдром Рейно, ревматоидный артрит, склеродермия, синдром Шегрена, височный артериит, тиреоидит, неспецифический язвенный колит, увеит, васкулит и гранулематоз Вегенера.

В некоторых воплощениях композиция, содержащая антитело, может вводиться объекту или индивидууму совместно с другим терапевтическим агентом для лечения заболевания или расстройства. Например, для лечения злокачественного новообразования композиция с антителом к PDL1, описанная в настоящем изобретении, может вводиться совместно с другой противоопухолевой терапией (например, с химиотерапией или с другой терапией антителами).

IV. Готовые изделия или наборы.

В другом воплощении изобретения, предлагается готовое изделие или набор, содержащий контейнер, который содержит в себе водную фармацевтическую композицию по изобретению, и необязательно предлагаются инструкции по ее применению. Подходящие контейнеры включают, например, флаконы, ампулы, пакеты и шприцы. Контейнер может быть из различных материалов, таких как стекло, пластик (такой как поливинилхлорид или полиолефин), или металлический сплав (такой как нержавеющая сталь или "хастеллой"). Типичный контейнер представляет собой 300 мл - контейнер из металлического сплава (например, для хранения при -20°C). Другой типичный контейнер может представлять собой 10-50 мл-стеклянный флакон (например, для хранения при 2-8°C). Например, контейнер может представлять собой стеклянный флакон объемом 10 мл, 15 мл, 20 мл, или 50 мл. Контейнер содержит в себе композицию и имеет маркировку, или вместе с контейнером прилагаются инструкции по применению. Изделие может дополнительно включать другие материалы желательные с коммерческой и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и листок-вкладыш с инструкцией по применению. В некоторых воплощениях готовое изделие дополнительно включает один или несколько других агентов (например, химиотерапевтический агент, противоопухолевый агент). Подходящие контейнеры для одного или нескольких агентов включают, например, флаконы, ампулы, пакеты и шприцы.

Предполагается, что описания достаточно для того, чтобы специалист смог практически осуществить изобретение. Специалисту в данной области на основе описания выше очевидны различные модификации изобретения дополнительно к тем, что были представлены, и они попадают в рамки прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, процитированные в настоящем изобретении, включены ссылкой во всей полноте и для всех целей.

Примеры

Изобретение будет более понятно при ссылке на следующие примеры. Однако их не следует рассматривать, как ограничение рамок изобретения. Понятно, что примеры и варианты, описанные в настоящем изобретении, даны в иллюстративных целях и, что различные модификации или изменения будут предложены специалистами в данной области с их учетом и должны быть включены в соответствии с рамками и областью применения настоящего изобретения и объемом притязаний прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1. Разработка композиции антитела к PDL1.

Антитело к PDL1 (α -PDL1) представляет собой агликозилированное антитело IgG1, выделенное из СНО, предназначенное для восстановления Т-клеточной функции через ингибирование взаимодействий

PDL1/PD1. Проблему на начальном этапе разработки составило потенциальное окисление и гликирование Trp вблизи от участков CDR и некоторое окисление метионина. Предварительные испытания надежности выявили, что оптимальным является более высокое pH, чем отмечалось ранее (pH 5,5). Целевая доза представляла собой фиксированную дозу, но при этом также рассматривалась доза на основе массы. Аналитические исследования проводили для анализа стабильности различных композиций, и в результате была выбрана композиция (60 мг/мл α -PDL1, 20 mM His AcO pH 5,8, 120 mM сахароза, 0,04% PS20). Начальные исследования композиции поддерживают до трех лет стабильности лекарственного вещества (DS) и лекарственного продукта (DS).

Материалы и методы.

Получение композиций α -PDL1.

Материал α -PDL1, который подвергался ультрафильтрации/диалфильтрации, подвергали исследованиям по разработке композиции. Материал диализовали в различных буферах с использованием диализных кассет 10000 Дальтон. После диализа концентрацию белка доводили до достижения целевой концентрации и вносили стоковый раствор 10% PS20 для достижения целевой концентрации PS20. Композиционный материал асептически добавляли в 2-мл стеклянные флаконы Forma Vitrum, заполняя объем на 1 мл и герметично закрывали с помощью 13 мм пробки Daikyo 777-1. Образцы хранили в вертикальном положении либо при 5, 25°C, либо при 40°C.

Цвет, внешний вид и прозрачность (САС).

Цвет образца, внешний вид и прозрачность определяли визуальным осмотром при белом флуоресцентном свете с черно-белым фоном при комнатной температуре, как описано в методах Европейской Фармакопеи (ЕФ) (Council of Europe. European Pharmacopoeia, 2008, 7th Ed., EP 2.2.2 and EP 2.2.1). 3-мл-флакон заполняли с помощью 1 мл каждого тестируемого образца. Отрицательный контроль (очищенная вода) с соответствующим объемом образца использовали для сравнения.

Измерения концентрации белка.

Концентрацию белка определяли путем измерения УФ-поглощения на спектрофотометре Agilent 8453 (Санта Клара, Калифорния) посредством волнометрического разведения образца приблизительно до 0,5 мг/мл с использованием 0,9% солевого раствора. За 0 принимали 0,9% солевой раствор, и поглощение измеряли при A_{\max} приблизительно 280 нм, а также при 320 нм. Различие между A_{\max} и A_{320} рассчитывали с получением скорректированного значения A_{\max} , используемого для определения конечной концентрации белка с коэффициентом поглощения 1,5 мл $\text{см}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$.

Измерение мутности.

Среднюю оптическую плотность образцов при 350 нм измеряли в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см на спектрофотометре Agilent 8453. Очищенную воду использовали в качестве пустого контроля.

Метод светотени для невидимых частиц (анализ НИАС).

Подсчет частиц в образцах осуществляли с использованием светотени, измеряемой с помощью HI-AC-Rouco модели 9703 (НАСН, Лавленд, Колорадо). Среднее совокупное количество частиц на миллилитр ≥ 2 мкм, ≥ 5 мкм, ≥ 10 мкм и ≥ 25 мкм заносили в таблицу для каждого образца с использованием программы PharmSpec v2.0. На один тест осуществляли четыре считывания, предполагая суммарный объем 1,6 мл каждого образца, первое считывание не учитывали, а 3 оставшихся усредняли.

Эксклюзионная хроматография (SEC или эксклюзионная ВЭЖХ).

Распределение вариантов по размеру определяли с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) с использованием колонки TosoHaas Bioscience G3000 SWXL (Южный Сан Франциско, Калифорния) при 30°C на Agilent 1200 ВЭЖХ (Санта Клара, Калифорния, США). Все образцы инъецировали неразведенными в количестве 50 мкг на колонку и элюировали в течение 60 мин с УФ-поглощением при 280 нм. Два различных метода SEC использовали для тестирования образцов. В методе 1 использовали 0,2 М фосфат калия, 0,25 М хлорид калия, pH 6,2, в то время как в методе 2 использовали 0,2 М фосфат калия, 0,25 М хлорид калия, pH 6,2 с 10об./об. % изопропанолом в качестве подвижной фазы. Результаты представлены в виде относительного процента площади пика от суммарной площади под кривой.

Капиллярное изoeлектрическое фокусирование под контролем изображения (iCIEF).

Распределение заряженных вариантов оценивали с помощью iCIEF с использованием анализатора iCE280 (ProteinSimple) с фторуглеродным покрытием капиллярного картриджа (100 мкм \times 5 см). Раствор амфолита состоял из смеси 0,35% метилцеллюлозы (MC), 0,75% Pharmalyte 3-10 амфолит-носитель, 4,2% Pharmalyte 8-10,5 амфолит-носитель, и 0,2% pI маркер 7,40 и 0,15% pI маркер 9,77 в очищенной воде. Анолит представлял собой 80 mM фосфорную кислоту, а католит представлял собой 100 mM гидроксид натрия, оба в 0,1% метилцеллюлозе. Образцы разводили в очищенной воде и добавляли CrV к каждому разведенному раствору в соотношении фермента к субстрату 1:100 с последующим инкубированием при 37°C в течение 20 мин. Образцы, обработанные CrV, смешивали с раствором амфолита и затем фокусировали путем введения напряжения 1500В в течение 1 мин с последующим напряжением 3000В в течение 10 мин. Изображение сфокусированных заряженных вариантов α -PDL1 получали путем пропускания ультрафиолетового излучения 280 нм через капилляр и в объектив цифровой камеры с устройством с

зарядовой связью. Изображение затем анализировали для определения распределения различных заряженных вариантов.

Пептидное картирование.

Метод пептидного картирования использовали для отслеживания окисления триптофана (W) и метионина (M). Для получения пептидных карт α -PDL1, белок гидролизовали с помощью трипсина после экспонирования белка с дитиотреитолом (DTT) и иодоуксусной кислотой (IAA), в процессе, который восстанавливает дисульфидные связи и изменяет конечные свободные тиолы с получением карбоксиметильных производных. Полученные в результате пептиды разделяли с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ) и отслеживали при 214 нм. Массы триптических пептидов определяли с помощью ЖХ-МС-анализа разделенной гидролизованной смеси с использованием масс-спектрометра ThermoFisher Scientific LTQ-Orbitrap.

Результаты.

Выбор буферной системы.

В процессе разработки композиции оценивали две буферные системы. Одна представляла собой 20 мМ ацетат гистидина, содержащий 240 мМ сахарозы, с pH 5,5, а другая представляла собой 200 мМ сукцинат аргинина с pH 5,5. Ускоренное исследование стабильности обнаружило, что α -PDL1 обладал лучшей стабильностью в буфере ацетата гистидина по сравнению с буфером сукцината аргинина (табл. 1). Таким образом, ацетат гистидина был выбран для дальнейшей разработки композиций.

Таблица 1

Нулевой порядок скорости деградации α -PDL1 для ICIEF и Главного пика эксклюзивной ВЭЖХ в буфере ацетата гистидина и в буфере сукцината аргинина при 30°C

Буферы	Скорость % уменьшения главного пика за месяц при 30С	
	ICIEF	ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ВЭЖХ
Ацетат Гистидина*	5,7	1
Сукцинат Аргинина**	17,6	1,5

Замечание: все композиции хранили до 1 месяца при 30°C. Анализ осуществляли с использованием ICIEF и эксклюзивной ВЭЖХ;

* 150 мг/мл α -PDL1 в 20 мМ ацетате L-гистидина, 240 мМ сахарозы и 0,02% мас./об. полисорбата 20 при pH 5,5;

** 150 мг/мл α -PDL1 в 200 мМ сукцината аргинина, 0,02% мас./об. полисорбата 20 при pH 5,5.

Выбор стабилизатора.

Сахарозу (120 мМ) выбирали в качестве стабилизатора для жидкой композиции α -PDL1 на основе ее способности защищать белок от агрегации, индуцированной замораживанием/оттаиванием, а также на основе ее функции в качестве криопротектора в течение продолжительного хранения в замороженном состоянии лекарственного вещества (DS) и хранения лекарственного продукта (DP) при 2-8°C.

В процессе разработки композиции, α -PDL1 при 50 мг/мл в 20 мМ ацетата L-гистидина, pH 5,5, 0,02% мас./об. полисорбата 20, и различные концентрации сахарозы в интервале от 0 до 120 мМ подвергали пяти циклам замораживания/оттаивания. Качество продукта измеряли с помощью анализа эксклюзивной ВЭЖХ, который выявил, что 60 мМ сахарозы достаточно для предотвращения повышения ВМЧ (высокомолекулярных частиц) α -PDL1 (табл. 2). Кроме того, было показано, что 120 мМ сахароза поддерживает стабильность лекарственного вещества при хранении в замороженном виде при -20°C в течение по меньшей мере 6 месяцев (табл. 3). Таким образом, на основе результатов исследования замораживания/оттаивания, а также исследований продолжительной стабильности лекарственного вещества, которое хранили при -20°C, для жидкой композиции α -PDL1 была выбрана сахароза в концентрации 120 мМ.

Таблица 2

Эффект концентрации сахарозы в отношении стабильности α -PDL1 с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, процент высокомолекулярных частиц во время замораживания и оттаивания

Сахароза конц. (мМ)	З/О циклы	ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ВЭЖХ		САС	рН
		% ВМВ	%Мономер		
Т0	Не доступно	1, 2	98, 8	SY, CL, PFVP	5, 6
0 мМ	5	1, 4	98, 6	SY, CL, PFVP	5, 7
60 мМ	5	1, 2	98, 8	SY, CL, PFVP	5, 7
120 мМ	5	1, 2	98, 8	SY, CL, PFVP	5, 6

Замечание: все композиции содержат 50 мг/мл α -PDL1, 20 мМ ацетата L-гистидина, 0,02% мас./об. полисорбата 20, рН 5,5. Анализ осуществляли с использованием эксклюзионной ВЭЖХ; З/О=замораживание/оттаивание; ВМЧ=высокомолекулярные частицы; SY=желтоватый; CL=прозрачный; PFVP=особенно свободный от видимых частиц.

Таблица 3

Данные по долгосрочной стабильности для разработанной партии лекарственного вещества α -PDL1

Темп. (°C)	Время (дни/мес яцы)	Q12005 САС	Q12003 рН	Q12398 дозировка (мг/мл)	Кислотный участок (площадь %)	Q12631 ICIEF			Q12589 SEC		Q12695 CE-SDS-NGS (не восстановленный)			Q12708 Эффективность (%относительной эффективности)
						Главный Пик (площадь %)	Основной участок (площадь %)	Совокупность форм ВМЧ (площадь %)	Пик мономера (площадь %)	Совокупность форм НМЧ (площадь %)	Совокупность Пре-пиков (% CPA)	Главный Пик (% CPA)	Совокупность пост-пиков (% CPA)	
NA	T10/0	SY,CL,P FVP	5,9	60,1	17,3	79,7	3	0,7	99,2	0,1	2,7	97	0,3	107
-20°C	30/1	SY,CL,P FVP	5,9	62,9	16,9	80,2	2,9	0,6	99,3	0,1	2,8	97	0,2	109
-20°C	61/2	SY,CL,P FVP	5,9	61,4	16,5	80,8	2,7	0,6	99,4	0,1	2,5	97,3	0,3	NT
-20°C	91/3	SY,CL,P FVP	5,9	62,5	18,1	79	3	0,6	99,3	0,1	2,8	97,1	0,2	96
-20°C	183/6	SY,CL,P FVP	5,9	61,1	17,9	79	3,1	0,6	99,4	0,1	3,1	96,6	0,3	100
5°C	30/1	SY,CL,P FVP	5,9	61,1	18,1	79	2,9	0,7	99,2	0,1	2,6	97	0,4	101
5°C	61/2	SY,CL,P FVP	5,9	62,3	17,4	79,8	2,8	0,8	99,2	0,1	2,9	96,7	0,4	NT
5°C	91/3	SY,CL,P FVP	5,9	63,9	17,4	80,1	2,5	0,9	99	0,1	3	96,5	0,5	107
5°C	183/6	SY,CL,P FVP	5,9	59,5	19,7	77,4	3	1,1	98,8	0,1	3,3	95,9	0,8	102

Замечание: все композиции содержат 60 мг/мл α -PDL1 в 20 мМ ацетата L-гистидина, 120 мМ сахарозы, 0,04% PS20, рН 5,8. 25 мл 316L небольшие банки из нержавеющей стали использовали для данного исследования; NA=недоступно; САС=цвет, внешний вид и прозрачность; SY=желтоватый, CL=прозрачный, PFVP=практически свободен от видимых частиц; ВМЧ=высокомолекулярные частицы; НИЧ=низкомолекулярные частицы; ICIEF=капиллярное изоэлектрическое фокусирование под контролем изображения; CE-SDS=капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия; NT=не тестировали; TBD=будет определено.

Предварительные исследования устойчивости композиции: выбор концентрации белка, рН и концентрации полисорбата 20.

План дробного факторного эксперимента (DOE) использовали для дополнительного исследования эффектов параметров композиции α -PDL1 в отношении стабильности белка. Тестировали суммарно двенадцать различных композиций α -PDL1 (десять экспериментов и две центральных точки). Три фактора, которые варьировались в исследовании, это рН в интервале 5-6 с интервалом 0,5 единиц, концентрация белка в интервале 40-120 мг/мл, и концентрация полисорбата 20 в интервале 0,005% - 0,06% мас./об. (табл. 4). Все композиции бли забуферированы с помощью 20 мМ ацетата гистидина, содержащего 120 мМ сахарозу, за исключением последних двух композиций, как указано в табл. 4. Композицию с 25 мМ ацетата гистидина оценивали, поскольку предполагалось, что она будет представлять собой худший случай в смысле риска окисления. Буфер 20 мМ ацетата натрия оценивали в виде резервной буферной системы и сравнивали с буфером ацетата гистидина. Композиции хранили при 25°C в течение 2 месяцев и при 40°C в течение 1 месяца. Данные по стабильности из вышеописанных исследований статистически анализировали на предмет взаимодействий между параметрами композиции с использованием программы JMP (JMP, Версия 9, SAS Institute Inc., Кэри, Северная Каролина).

Таблица 4

Лекарственное вещество α -PDL1 и композиции лекарственного продукта оценивали в исследовании DOE

Композиция	антитело к PDL1 (мг/мл)	Раствор pH	PS20 (%масс./об.)	His-Ацетат (мМ)	Сахароза (мМ)
F1a	50	5,5	0,04	20	120
F2a	100	5,5	0,04	20	120
F3	40	6	0,06	20	120
F4	120	5	0,06	20	120
F5	120	6	0,005	20	120
F6	40	5	0,06	20	120
F7	120	5	0,005	20	120
F8	40	6	0,005	20	120
F9	40	5	0,005	20	120
F10	120	6	0,06	20	120
F11b	50	5,5	0,06	25	120
F12c	50	5,5	0,04	20 (Na-Ace)	120

Замечание: a - центральные точки; b - худший случай: низкая концентрация белка, высокая концентрация PS20, высокая концентрация гистидина; c - тестировали буфер 20 мМ ацетата натрия (Na-Ace).

По сравнению с pH 5 и 5,5, композиция при pH 6 имела чуть более медленную скорость потери главного пика, что определяли с помощью ICIEF при 40 и 25°C (фиг. 1А-В и 2А-В соответственно). Никакого значительного влияния концентрации на потерю главного пика не наблюдали с помощью ICIEF. Анализ композиции F1 продемонстрировали, что увеличение количества кислого варианта способствовало, прежде всего, потере главного пика в ICIEF, в то время как вклад в потерю пика основного заряженного варианта был незначительным. При таких же условиях хранения композиция при pH 6 также имела более медленную скорость потери пика мономера, что измеряли с помощью эксклюзионной ВЭЖХ при 40 и при 25°C (фиг. 3А-В и 4А-В соответственно). Анализ композиции F1 продемонстрировал, что как образование ВМЧ, так и НМЧ способствовало потере мономера в SEC при повышенных температурах (т.е. 40 и 25°C). Оба профиля изменений pH, полученные с помощью SEC и ICIEF, обнаружили, что pH 5,5-6 является оптимальным интервалом pH для α -PDL1. Чтобы попасть внутрь диапазона условий стабильности белка при pH выше 5,5 и разрешить колебания $\pm 0,3$ единицы pH в композиции активного вещества и лекарственного продукта, было выбрано значение pH 5,8.

Вышеописанные исследования композиций также обнаружили, что композиции, содержащие 120 мг/мл α -PDL1, при pH в интервале 5-6 имели чуть более высокую, но не значительно, скорость потери пика мономера благодаря более высокой скорости образования ВМЧ по сравнению с композициями 40 мг/мл при таком же pH, что определяли с помощью эксклюзионной ВЭЖХ (фиг. 3А-В и 4А-В). На основе этих данных и для поддержания композиции с улучшенной стабильностью продукта и для облегчения дозирования для пациента выбрали концентрацию α -PDL1, составляющую 60 мг/мл.

Не наблюдали никакого влияния на стабильность белка, оказываемого концентрацией полисорбата 20 (PS20) в интервале от 0,005-0,06% мас./об., что было выявлено в вышеописанном статистическом анализе (фиг. 1-4).

Известно, что примеси пероксида водорода, содержащиеся в исходном материале полисорбата 20 могут вызвать окисление триптофана (W) и метионина (M). L-гистидин также повышает вышеописанный риск окисления. Образцы выбранного худшего случая композиций, содержащих более высокие концентрации полисорбата 20 и L-гистидина, анализировали с помощью пептидного картирования. Результаты анализа показали, что даже комбинация более высокой концентрации гистидина (25 мМ буфер ацетат гистидина) и более высокого количества PS20 (0,06% PS20) не продемонстрировала значительного риска окисления (табл. 5), и поэтому гистидиновый буфер подходит для применения в композиции α -PDL1.

Таблица 5

Процент окисления Trp и M в выбранных композициях с помощью пептидной карты

Выбранные композиции					% Окисления			
	Конц.(мг/мл)	Буфер(мМ)	PS20(%)	Моменты времени	W CDR HC2	W CDR HC4	W CDR HC10	LC27 M253
F1	50	20 мМ His-Ace	0,04	T0	0,1	0,1	0,1	5,5
F3	40	20 мМ His-Ace	0,06	25C, 2M	0,2	0,2	0,2	6,4
F10	120	20 мМ His-Ace	0,06	25C, 2M	0,2	0,1	0,2	6,7
F11	50	25 мМ His-Ace	0,06	25C, 2M	0,2	0,2	0,2	6,6

Замечание: Все составы хранили до 1 месяца при 40°C. Анализ осуществляли с использованием Пептидной карты. W=Триптофан; M=Метионин.

Для оценки возможной деградации PS20 в композиции при хранении Композиции F1-F10 (табл. 4) хранили при 40°C в течение 1 месяца, при 25°C в течение 2 месяцев, при 5°C в течение 2 месяцев или при 5°C в течение 6 месяцев. Не наблюдали никакой деградации PS20 в тестируемых композициях при хранении при любой из повышенных температур (т.е. 40 и 25°C) и при 5°C. Изменение объема заполнения выбранных композиций (т.е. F1, F2, F3 и F6) до 7 мл (высокое заполнение) или до 4 мл (низкое заполнение) и затем хранение при 5°C в течение 6 месяцев также не имело никакого значительного влияния на скорость деградации PS20 (фиг. 5).

Образование невидимых частиц (SbVP) в различных композициях при хранении при 5°C в течение 6 месяцев оценивали с помощью анализа НИАС, что являлось мерой стабильности (табл. 6). Не наблюдали никаких измеряемых изменений в SbVP в тестируемых композициях.

Таблица 6

НИАС-данные для образования SbVP через 6 месяцев хранения при 5°C

Образец	Момент времени (месяц)	Размер частиц (кумулятивная встречаемость/мл)			
		2мкМ	5мкМ	10мкМ	25мкМ
F1	0	802	193	61	5
	6	1190	278	80	6
F2	0	799	146	43	12
	6	370	112	29	2
F3	0	485	133	34	4
	6	163	52	14	2
F4	0	211	65	31	8
	6	181	48	8	1
F5	0	872	359	195	79
	6	340	89	23	1
F6	0	233	61	16	3
	6	116	34	16	3
F7	0	134	29	13	4
	6	144	42	9	0
F8	0	433	118	34	1
	6	564	98	23	2
F9	0	498	114	17	1
	6	144	21	6	0
F10	0	610	124	23	0
	6	248	75	28	3

Замечание: два флакона с объемом 1 мл объединяли вместе для осуществления анализа НИАС в малом объеме.

Стабильность композиций дополнительно исследовали с использованием эксперимента замораживания/оттаивания. Композиции F1-F10 (табл. 4) подвергали либо пяти циклам замораживания/оттаивания во время хранения при -20°C, либо хранили при повышенной температуре хранения 5°C от 0 до 6 месяцев и затем анализировали с помощью SEC и ICIEF на предмет процентного содержания мономера α -PDL1 (фиг. 6A и B) и процентного содержания главного пика в композиции (фиг. 6C и D). Не наблюдали никакого значительного изменения процентного содержания мономера и главного пика после циклов замораживания/оттаивания и хранения в указанных временных точках.

Стабильность лекарственного вещества в композиции F2 (табл. 4) оценивали с помощью проведения пяти циклов замораживания/оттаивания во время хранения в небольшой банке из нержавеющей стали при -20°C в течение до 6 месяцев с последующим измерением стабильности с помощью SAC, SEC и ICIEF (табл. 7). Не наблюдали никаких изменений после хранения в течение 6 месяцев при -20°C .

Таблица 7

Стабильность активного вещества в небольших банках из нержавеющей стали, которые хранили при -20°C

Временные точки	З/О циклы	Q12005	Q12589	Q12631
		SAC Прозрачность	SEC (% мономера)	ICIEF (% главного пика)
T0	0	CL/SY	98,6	80,1
1M	1	CL/SY	98,6	79,1
2M	2	CL/SY	98,7	80,2
3M	3	CL/SY	98,8	80,9
6M	5	CL/SY	98,6	80,2

Замечание: З/О=замораживание/оттаивание; SY=желтоватый; CL=прозрачный.

Стабильность активного вещества в композиции, содержащей 100 мг/мл α -PDL1, 20 мМ ацетата гистидина, 120 мМ сахарозы, 0,04% PS20, pH 5,6, оценивали с помощью проведения трех циклов замораживания/оттаивания с последующим хранением в небольшой банке из нержавеющей стали или из сплава "хастеллой" при -20 , 5 или 25°C в течение до 3 месяцев с последующим измерением стабильности с помощью SEC (фиг. 7A и B). Не наблюдали различий между хранением в небольшой банке из нержавеющей стали и из сплава "хастеллой" при pH 5,6. Активное вещество оставалось стабильным сроком до 3 месяцев при -20°C после трех циклов замораживания/оттаивания. Несмотря на различия между банками из нержавеющей стали и из сплава "хастеллой", они обе подходили для использования для хранения лекарственного вещества.

Стабильность лекарственного продукта в композиции, содержащей 50 мг/мл α -PDL1, 20 мМ ацетата гистидина, 120 мМ сахарозы, 0,04% PS20, pH 5,6, оценивали при хранении в объеме 16мл, заполненном во флакон объемом 20 мл при -5 , 25 или 40°C в течение до 3 месяцев с последующим измерением стабильности с помощью SEC и ICIEF (фиг. 8A и B). Не наблюдали никаких изменений после хранения в течение трех месяцев при 5°C . Скорость деградации pH 5,6 в месяц при 40°C составила 0,66 и 22% с помощью анализа SEC и ICIEF соответственно.

Оценка буфера в композиции F12 выявила, что буфер ацетата натрия обеспечивал аналогичную стабильность белка, как и буфер ацетата гистидина, что выяснили на основе скорости деградации главного пика, измеренной с помощью эксклюзионной ВЭЖХ и ICIEF (табл. 8). Две тестированные композиции представляли собой 50 мг/мл α -PDL1 в 20 мМ ацетата L-гистидина, 120 мМ сахарозы, 0,04 мас./об.% полисорбата 20 при pH 5,5 и 0 мг/мл α -PDL1 в 20 мМ ацетата натрия, 120 мМ сахарозы и 0,04% мас./об. полисорбата 20 при pH 5,5.

Таблица 8

Нулевой порядок скорости деградации α -PDL1 для ICIEF и Главного пика с использованием эксклюзионной ВЭЖХ в буфере ацетата гистидана и в буфере ацетата натрия при 40°C

Концентрация α -PDL1 (мг/мл)	Скорость уменьшения % главного пика в месяц	
	ICIEF	Эксклюзионная ВЭЖХ
Ацетат Гистидина	23	0,67
Ацетат Натрия	21	0,74

Замечание: все композиции хранили до 1 месяца при 40°C .

В общем, DoE-разработанные исследования стабильности обнаружили, что при 40°C не наблюдалось с помощью ICIEF значительного влияния концентрации на потери главного пика, в то время как при более низком pH наблюдалась чуть более быстрая скорость потери главного пика (фиг. 1A-B). При 40°C не наблюдали значительных взаимодействий с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, однако композиции с более высокой концентрацией демонстрировали более быструю потерю мономера (фиг. 3A-B). Также было обнаружено, что при более низком pH имеет место большая скорость потери мономера. Аналогичные результаты наблюдали при 25°C (фиг. 2A-B и 4A-B). Статистический анализ не обнаружил особенно значимых взаимодействий (связей) между любыми из параметров тестируемых композиций.

Исследования при взбалтывании и термическом стрессе.

Исследовали стабильность лекарственного продукта в присутствии повышенных концентраций PS20 при воздействии стресса взбалтывания в стеклянных флаконах. Композицию, содержащую 57 мг/мл в 20 мМ ацетата гистидина, 120 мМ сахарозы, pH 5,5, оценивали в объеме 1 мл, заполненном в стеклянный флакон объемом 2 мл, с различными концентрациями PS20 в интервале от 0,005% до 0,06%. Стеклянные флаконы взбалтывали при 70 об/мин в течение 3 дней при комнатной температуре перед измерением стабильности с помощью SEC (фиг. 9А) и перед измерением мутности (фиг. 9В). Композиция с PS20 на уровне в интервале 0,005-0,06% не имела изменений по части стабильности во время взбалтывания. Однако композиции, лишенные PS20, демонстрировали повышение потери мономера благодаря повышению количества ВМЧ. В данном эксперименте, 0,005% PS20 было достаточно для защиты от стресса взбалтывания в стеклянных флаконах.

Исследовали стабильность композиций лекарственного продукта (табл. 4), который хранили при различных температурах и времени и затем подвергали стрессу взбалтывания в стеклянных флаконах. Каждую из композиций F1-F10 оценивали в объеме 1 мл, который заполняли в стеклянный флакон объемом 2 мл. Стеклянные флаконы взбалтывали при 70 об/мин в течение 1 дня при комнатной температуре перед измерением стабильности с помощью SEC (фиг. 10). В данном эксперименте взбалтывание не оказывало влияние на стабильность лекарственного продукта при хранении в течение продолжительного времени при 40, 25 или 5°C.

С целью поддержания транспортировки пакетов для внутривенной инъекции, которая часто происходит в больницах, осуществляли исследование стабильности при взбалтывании с α -PDL1, включенным в состав вместе с 20 мМ ацетатом гистидина, 240 мМ сахарозой, pH 5,5 с 0,005-0,02% мас./об. полисорбатом 20. Наиболее широко применяемые пакеты для внутривенных инъекций, а именно из поливинилхлорида объемом 250 мл (PVC) или из полиолефина (PO), содержащие изотонический раствор хлорида натрия (0,9% NaCl), оценивали с помощью введения 400-600 мг растворов α -PDL1 и взбалтывания их с использованием орбитального шейкера при 100 об/мин при 5°C в течение до 6 ч. Результаты исследования на основе дозирования по массе продемонстрировали, что минимум 0,015% мас./об. полисорбата 20 в растворе белка необходимо для предотвращения образования видимых частиц (связанных с осаждением белка) во время транспортировки (табл. 9). Кроме того, для уменьшения риска деградации полисорбата 20 в течение срока хранения, концентрацию полисорбата 20 повышали с 0,02 до 0,04% мас./об.

Таблица 9

Исследование взбалтывания IV пакета с различными количествами PS20 в лекарственном продукте α -PDL1

% PS20 в DP	Образцы	САС	ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ВЭЖХ		Невидимые Частицы (мд/л)	
			%ВМЧ	%Мономер	≥10мкм	≥25мкм
0,005%	250мл PO пакет, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	250мл PO пакет, взбалтывание при 5°C в течение 2 часов	Наблюдаемые видимые частицы Эксперимент останавливали	NT	NT	NT	NT
	250мл PVC пакет, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	250мл PVC пакет, взбалтывание при 5°C в течение 2 часов	Наблюдаемые видимые частицы Эксперимент останавливали	NT	NT	NT	NT
0,01%	250мл PO пакет, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	250мл PO пакет, взбалтывание при 5°C в течение 2 часов	Наблюдаемые видимые частицы Эксперимент останавливали	NT	NT	NT	NT
	250мл PVC пакет, T0	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT
	250мл PVC пакет, взбалтывание при 5°C в течение 4 часов	CO, CL, PFVP	NT	NT	NT	NT

	250мл РО пакет, T0	CO, CL, PFVP	1,2	98,8	21	2
	250мл РО пакет, взбалтывание при 5°C в течение 4 часов	CO, CL, PFVP	1,3	98,7	195	19
0,015%	250мл PVC пакет, T0	CO, CL, PFVP	1,2	98,8	16	0
	250мл PVC пакет, взбалтывание при 5°C в течение 4 часов	CO, CL, PFVP	1,2	98,8	24	2

Замечание: все композиции 50 мг/мл α -PDL1 в 20 мМ ацетата L-гистидина, 240 мМ сахарозы при pH 5,5. Анализ осуществляли с использованием эксклюзионной ВЭЖХ. NT=не тестировали; CAC=цвет, внешний вид, и прозрачность; CO=бесцветный; CL=прозрачный; PFVP=практически свободен от видимых частиц.

Оценка стабильности композиций α -PDL1.

Проводили скрининг pH на материалах, полученных из Master Cell Bank и из Working Cell Bank, pH в интервале 5,2-6,3 в композиции, содержащей 20 мМ ацетата гистидина, 120 мМ сахарозу, и 0,04% PS20 (табл. 10). Анализ с помощью эксклюзионной ВЭЖХ и ICIEF продемонстрировал, что при pH 5,7-6,3 композиции были химически и физически стабильны, и допустимый интервал pH 5,5 -6,3 в композиции является подходящим (фиг. 11А и В). При более высоком значении pH уменьшались скорости деградации мономера и главного пика, причем скорости выравнивались при pH примерно 5,7 и 6,3.

Таблица 10

Скрининг pH композиций

Концентрация (мг/мл)	pH	Контейнер	Температура (°C)	Временные точки
120	5, 2, 5, 7, 6, 6, 3	1 мл заполняли в 2мл-флакон	40	T0, 1неделя, 2 недели, 1 месяц
40	5, 2, 5, 7, 6, 6, 3	1 мл заполняли в 2мл-флакон	40	T0, 1неделя, 2 недели, 1 месяц

Исследовали эффект вспомогательных веществ композиции в отношении окисления триптофана (W) и метионина (M) в композициях α -PDL1. Пептидное картирование продемонстрировало, что значительного повышения окисления не наблюдалось. Композиции, содержащие 20 мМ ацетата гистидина, 120 мМ сахарозы, 0,04% PS20 с раствором pH 5,8, продемонстрировали отсутствие явного повышения окисления триптофана и метионина при хранении композиции в течение одного месяца при повышенных температурах как для лекарственного продукта, так и для лекарственного вещества (табл. 11).

Таблица 11

Процент окисления Trp и M²⁵³ и M⁴²⁹ в выбранных композициях с помощью пептидной карты

Образец	% Окисления				
	W CDR H2	W CDR H4	W CDR H10	M ²⁵³	M ⁴²⁹
DP, 50 мг/мл, T0	0,35	0,26	0,12	4,86	0,92
DP, 50 мг/мл, 40°C, T=1M	0,63	0,26	0,31	5,85	1,10
DS, 100 мг/мл, SS, 25°C, T=1M	0,52	0,27	0,28	5,61	1,17

Замечание: все композиции α -PDL1 содержали 20 мМ ацетата L-гистидина, 120 мМ сахарозу, 0,04% PS20, pH 5,8.

На основе результатов этих исследований композиций и статистического анализа для клинических исследований была выбрана жидкая композиция, состоящая из 60 мг/мл α -PDL1 в 20 мМ ацетата гистидина, 120 мМ сахарозы, 0,04% полисорбата 20 с целевым pH 5,8.

Дозирование для клинических испытаний проводили с постоянной дозой 1200 мг α -PDL1 на пациента. Конфигурацию флаконов номинальным объемом 20 мл заполнения (1200 мг α -PDL1) выбирали для выявления профиля целевого продукта.

Исследования замораживания/оттаивания проводили с назначенной композицией, содержащей 60 мг/мл α -PDL1 в 20 мМ ацетата L-гистидина, 120 мМ сахарозы, и 0,02% мас./об. полисорбата 20 при pH 5,8. Результаты анализа после пяти циклов замораживания/оттаивания подтвердили, что 120 мМ сахара защищала α -PDL1 от агрегации, индуцированной замораживанием/оттаиванием (табл. 12). Аналогично, для продолжительной стабильности назначенной жидкой композиции выявили, что она стабильна в течение более 6 месяцев при 2-8°C (табл. 13). Непрерывное отслеживание в течение около 36 месяцев осуществляется для данной композиции в настоящее время. Целевая композиция и тестируемые интервалы исследования для лекарственного продукта и лекарственного вещества α -PDL1 представлены в табл. 14.

Таблица 12

Репрезентативные данные стабильности при замораживании/оттаивании для опытной партии лекарственного вещества α -PDL1

№ Циклы Заморажива- ния- Оттаивания	САС	Концент- рация (мг/мл)	pH	ICIEF			ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ВЭЖХ			CE SDS NGS (не восстановленный)			Эффектив- ность (% специфической активности)
				Кислотный участок (площадь %)	Главный Пик (площадь %)	Основной участок (площадь %)	Совокупность форм ВМЧ (площадь%)	Мономер (площадь %)	Совокупность форм НМЧ (площадь%)	Совокупность Пре-пиков (% CPA)	Главный Пик (% CPA)	Совокупность пост-пиков (% CPA)	
Недоступно	CL/SY/PFVP	60,1	5,9	19	78	3	0,5	99,4	0,1	2,9	97	0,1	107
5	CL/SY/PFVP	62	5,9	20	77	3	0,5	99,4	0,1	2,7	97,1	0,2	111

Замечание: партия PP400L-02142013 содержит 60 мг/мл α -PDL1 в 20 мМ ацетата L-гистидина, 120 мМ сахарозы и 0,04% мас./об. полисорбата 20 при pH 5,8. CL=прозрачный; SY=желтоватый; PFVP=практически свободен от видимых частиц; NA=недоступно, ICIEF=капиллярное изоэлектрическое фокусирование под контролем изображения; CE-SDS=капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия; ВМЧ=высокомолекулярные частицы; НМЧ=низкомолекулярные частицы.

Таблица 13

Данные стабильности для опытной партии лекарственного средства α -PDL1

Темп (°C)	Время (дни/месяцы)	САС	pH	Крепость (мг/мл)	Изображенный cIEF			ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ВЭЖХ			CE SDS NGS (не восстановленный)			Эффектив- ность (% специфическ ой активности)	Невидимые частицы* (мг/л)	
					Кислот- ный участок (площадь %)	Главный Пик (площадь %)	Основ- ный участок (площадь %)	Совокуп- ность форм ВМЧ (площадь %)	Пик мономера (площадь %)	Совокуп- ность форм НМЧ (площадь %)	Совокуп- ность Пре- пиков (% CPA)	Главный Пик (% CPA)	Совокуп- ность пост- пиков (% CPA)		≥10 мкм	≥25 мкм
Недост- упно	T=0/0	SY/CL/PFVP	5,9	59,9	18,1	78,9	2,9	0,6	99,3	0,1	2,7	97	0,3	99	37	30
5	30/1	SY/CL/PFVP	5,9	59,9	18,3	78,6	3,1	0,6	99,3	0,1	2,7	96,9	0,4	NT	26	2
5	61/2	SY/CL/PFVP	5,9	61,7	18,4	78,9	2,7	0,7	99,3	0,1	2,8	96,9	0,4	NT	3	0
5	91/3	SY/CL/PFVP	5,9	61,7	17,1	80,1	2,8	0,7	99,2	0,1	2,7	97	0,4	102	18	3
5	183/6	SY/CL/PFVP	5,9	60,8	18,4	78,6	3	0,7	99,2	0,1	3,1	96,5	0,4	101	3	0

Партия PP400L-02142013-DP содержит 60 мг/мл α -PDL1 в 20 мМ ацетата L-гистидина, 120 мМ сахара и 0,04% мас./об. полисорбата 20 при pH 5,8. NA=недоступно; САС=цвет, внешний вид и прозрачность; SY=желтоватый, CL=прозрачный, PFVP=практически свободен от видимых частиц; ВМЧ=высокомолекулярные частицы; НМЧ=низкомолекулярные частицы; ICIEF=капиллярное изоэлектрическое фокусирование под контролем изображения; CE-SDS=капиллярный электрофорез с додецилсульфатом натрия; NT=не тестировали.

Таблица 14

Целевая композиция и тестируемые интервалы исследования для лекарственного вещества и лекарственного продукта α -PDL1

Параметр	Мишень	Тестируемые интервалы
		композиции
Концентрация α -PDL1	60 мг/мл	40-120 мг/мл
Концентрация ацетата L-гистидина	20 мМ	20 мМ
pH раствора	5,8	5-6
Концентрация сахарозы	120 мМ	0-240 мМ
Концентрация полисорбата 20 (масс./об.)	0,04%	0,005%-0,06% ^a

Так как лекарственный продукт α -PDL1 (60 мг/мл) будет вводиться посредством инфузии после разведения в изотоническом растворе хлорида натрия (0,9% NaCl), то тестировали совместимость и стабильность активного ингредиента при следующих моделированных условиях получения и введения: 1) Разведение лекарственного продукта α -PDL1 в инфузионных пакетах, содержащих 0,9% NaCl, в интервале 2,4-9,6 мг/мл (номинальная концентрация после разведения), чтобы перекрыть интервал дозировок в клиническом исследовании; 2) кратковременное экспонирование с инфузионными пакетами, содержащими изотонический раствор хлорида натрия (материал поверхности контакта пакета и продукта состоит из PVC (поливинилхлорид) или полиолефина); 3) использование устройств для внутривенной инфузии (поверхности, контактирующие с продуктом, PVC или полиолефин); и 4) использование встроенных фильтров 0,2 мкм (мембрана фильтра PES).

Образцы тестировали через 24 ч хранения при 2-8°C или через 24 ч при 30°C с экспонированием под рассеянным освещением. Образцы тестировали с использованием подходящих методов выявления стабильности, включающих: определение чистоты с помощью эксклюзионной ВЭЖХ и ICIEF, концентрации белка (с помощью УФ), невидимых частиц с помощью метода светотени, цвета, прозрачности/опалесцентности и pH (табл. 15).

Таблица 15

Стабильность α -PDL1, который разводили и хранили при 5 или 30°C в течение 24 ч в пакетах для инфузии 0,9% NaCl вместе или без встроенных фильтров 0,2 мкм

Образец	CAC	Концентрация (мг/мл)	Мутность A350	ICIEF			ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ВЭЖХ			pH	Частицы (количество/мл)	
				% Кислотных компонентов	% Главного Пика	% Основных компонентов	% ВМЧ	% Мономера	% ПМЧ		≥10мкм	≥25мкм
2,4 мг/мл в PVC-пакете, T0	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	19,5	75,7	4,8	0,4	99,5	0,1	5,9	25	1
2,4 мг/мл в PVC-пакете, t=5°C, 24 часов перед инфузией	CL, CO, PFVP	2,2	0,02	19,6	75,5	4,9	0,4	99,5	0,1	5,8	32	0
2,4 мг/мл в PVC-пакете, t=30°C, 24 часа перед инфузией	CL, CO, PFVP	2,2	0,01	19,3	76,6	4,1	0,3	99,5	0,1	5,8	32	0
2,4 мг/мл в PVC-пакете, t=5°C, 24 часа пропускали через инфузионное устройство без встроенного фильтра	CL, CO, PFVP	2,1	0,04	19,5	76,4	4,1	0,4	99,5	0,1	5,8	44	1
2,4 мг/мл в PVC-пакете, t=5°C, 24 часа пропускали через инфузионное устройство с встроенным фильтром	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	19,3	76,7	4,1	0,3	99,5	0,1	5,9	4	0
2,4 мг/мл в PVC-пакете, t=30°C, 24 часа пропускали через инфузионное устройство без встроенного фильтра	CL, CO, PFVP	2,1	0,02	20	75,7	4,3	0,3	99,6	0,1	5,9	29	0
2,4 мг/мл в PVC-пакете, t=30°C, 24 часа пропускали через инфузионное устройство с встроенным фильтром	CL, CO, PFVP	2	0,04	19,5	76,4	4,1	0,3	99,6	0,1	6	5	0
2,4 мг/мл в PO-пакете, T0	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	18,6	77,3	4,1	0,4	99,5	0,1	6,1	5	0
2,4 мг/мл в PO-пакете, t=5°C, 24 часа перед инфузией	CL, CO, PFVP	2,1	0,03	17,8	77,8	4,4	0,4	99,5	0,1	5,9	3	0
2,4 мг/мл в PO-пакете, t=30°C, 24 часа перед инфузией	CL, CO, PFVP	2,1	0,02	20,6	75,3	4,1	0,3	99,5	0,1	5,9	8	0
2,4 мг/мл в PO-пакете, t=5°C, 24 часа пропускали через инфузионное устройство без встроенного фильтра	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	20,5	75,3	4,2	0,4	99,5	0,1	5,9	48	0
2,4 мг/мл в PO-пакете, t=5°C, 24 часа пропускали через инфузионное устройство с встроенным фильтром	CL, CO, PFVP	2,1	0,02	21,0	74,8	4,3	0,4	99,5	0,1	5,9	1	0
2,4 мг/мл в PO-пакете, t=30°C, 24 часа пропускали через инфузионное устройство без встроенного фильтра	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	18,7	76,9	4,4	0,3	99,5	0,1	5,9	22	0
2,4 мг/мл в PO-пакете, t=30°C, 24 часа пропускали через инфузионное устройство с встроенным фильтром	CL, CO, PFVP	2,1	0,01	21,2	73,9	4,9	0,4	99,5	0,1	6	0	0

9,6 мг/мл в PVC-пакете, T0	CL, CO, PFVP	8,7	0,05	18,3	77,3	4,4	0,4	99,5	0,1	5,9	35	0
9,6 мг/мл в PVC-пакете, t=5°C, 24 часа перед инфузией	CL, CO, PFVP	8,6	0,03	19,0	76,8	4,2	0,4	9,5	0,1	5,9	6	1
9,6 мг/мл в PVC-пакете, t=30°C, 24 часа перед инфузией	CL, CO, PFVP	8,5	0,05	18,9	77	4,1	0,4	99,5	0,2	5,9	10	0
9,6 мг/мл в PVC-пакете, t=5°C, 24 часа пропускали через инфузионное устройство без встроенного фильтра	CL, CO, PFVP	8,8	0,03	19,2	76,4	4,4	0,3	99,6	0,1	6	29	0
9,6 мг/мл в PVC-пакете, t=5°C, 24 часа пропускали через инфузионное устройство с встроенным фильтром	CL, CO, PFVP	8,7	0,06	19,0	77,1	3,9	0,3	99,6	0,1	5,9	18	0
9,6 мг/мл в PVC-пакете, t=30°C, 24 часа пропускали через инфузионное устройство без встроенного фильтра	CL, CO, PFVP	8,1	0,04	19,1	76,6	4,3	0,4	99,5	0,2	6	8	0
9,6 мг/мл в PVC-пакете, t=30°C, 24 часа пропускали через инфузионное устройство с встроенным фильтром	CL, CO, PFVP	8,8	0,04	19,6	76,4	4	0,3	99,6	0,1	5,9	19	2
9,6 мг/мл в PO-пакете, T0	CL, CO, PFVP	8,4	0,03	18,6	78	3,4	0,4	99,5	0,1	5,8	33	2
9,6 мг/мл в PO-пакете, t=5°C, 24 часа перед инфузией	CL, CO, PFVP	8,6	0,04	19,2	76,4	4,4	0,4	99,5	0,1	5,9	32	0
9,6 мг/мл в PO-пакете, t=30°C, 24 часа перед инфузией	CL, CO, PFVP	8,7	0,04	19,3	76,7	4	0,4	99,5	0,1	5,9	18	0
9,6 мг/мл в PO-пакете, t=5°C, 24 часа пропускали через инфузионное устройство без встроенного фильтра	CL, CO, PFVP	8,5	0,05	19,8	75,8	4,5	0,4	99,5	0,1	5,9	38	1
9,6 мг/мл в PO-пакете, t=5°C, 24 часа пропускали через инфузионное устройство с встроенным фильтром	CL, CO, PFVP	8,2	0,04	18,6	77,2	4,3	0,3	99,5	0,1	5,8	8	0
9,6 мг/мл в PO-пакете, t=30°C, 24 часа пропускали через инфузионное устройство без встроенного фильтра	CL, CO, PFVP	8,5	0,03	19,4	76	4,6	0,4	99,5	0,1	5,9	48	7
9,6 мг/мл в PO-пакете, t=30°C, 24 часа пропускали через инфузионное устройство с встроенным фильтром	CL, CO, PFVP	8,0	0,05	19,7	76,1	4,2	0,3	99,5	0,1	5,8	10	0

CO=бесцветный, CL=прозрачный, PFVP=практически свободен от видимых частиц, A350=поглощение при 350 нм.

Таблица 16
Стабильность при взбалтывании α -PDL1, разведенного в 0,9% NaCl в инфузионных пакетах при 5°C в течение до 6 ч

Образец	CAC	Концентрация (мг/мл)	Мутность A350	ICIEF			ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ВЭЖХ			pH	Частицы (количество/мл)	
				% Кислотных компонентов	% Главный Пик	% Основных компонентов	% ВМЧ	% Мономера	% НМЧ		≥10мкм	≥25мкм
2,4 мг/мл в PO-пакете, T0	CL, CO, PFVP	2,13	0,02	17,5	79,1	3,4	0,8	99,1	0,1	5,9	3	0
2,4 мг/мл в PO-пакете, 2ч взбалтывания	CL, CO, PFVP	2,09	0,01	17,1	79,8	3,1	0,8	99,1	0,1	5,9	113	2
2,4 мг/мл в PO-пакете, 4ч взбалтывания	CL, CO, PFVP	2,12	0,02	17,3	79,6	3,1	0,8	99,1	0,1	5,9	31	0
2,4 мг/мл в PO-пакете, 6ч взбалтывания	CL, CO, PFVP	2,02	0,02	16,8	79,6	3,6	0,8	99,1	0,1	5,9	4	1
2,4 мг/мл в PO-пакете, T0	CL, CO, PFVP	2,42	0,02	17,9	78,6	3,5	0,8	99,1	0,1	5,9	6	0
2,4 мг/мл в PO-пакете, 2ч взбалтывания	CL, CO, PFVP	2,04	0,02	17,6	79,2	3,2	0,8	99,1	0,1	5,9	22	1
2,4 мг/мл в PO-пакете, 4ч взбалтывания	CL, CO, PFVP	2,10	0,03	18,5	78	3,6	0,8	99,1	0,1	5,9	22	1
2,4 мг/мл в PO-пакете, 6ч взбалтывания	CL, CO, PFVP	2,05	0,01	18,6	78,2	3,3	0,8	99,1	0,1	5,9	10	0

CO=бесцветный, CL=прозрачный, PFVP=практически свободен от видимых частиц, A350=поглощение при 350 нм.

Продукт, тестируемый в исследованиях моделированного введения, как описано выше, оставался физически и химически стабильным при тестируемых условиях. Пакеты для инфузии, устройства для инфузии, фильтры и/или вспомогательные средства для внутривенного введения, состоящие из различ-

ных материалов, содержащих продукт, добавляли после успешной аттестации.

Дополнительно к статистической стабильности осуществляли исследование эффекта взбалтывания в пакете для внутривенного введения, которое осуществляли с α -PDL1, включенным в состав вместе с 20 мМ ацетатом гистидина, 120 мМ сахарозой, pH 5,8 вместе с 0,02% PS20, который потенциально представляет собой самый низкий уровень PS20, который может наблюдаться в лекарственном продукте в течение срока хранения. Взбалтывание осуществляли при 2-8°C с использованием орбитального шейкера при скорости 100 об/мин. Данные предполагают, что при содержании 0,02% PS20 в лекарственном продукте, α -PDL1 остается стабильным при взбалтывании при 5°C после разведения в пакетах для внутривенного введения (табл. 16).

Последовательности антитела, используемые в примерах.

Вариабельный участок легкой цепи α -PDL1

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:7)

Вариабельны участок тяжелой цепи α -PDL1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTIVTVSSASTK
(SEQ ID NO:8)

Полноразмерная легкая цепь α -PDL1

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:9)

Полноразмерная тяжелая цепь α -PDL1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYY
ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTIVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCTPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDNLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSL
SPG (SEQ ID NO:10)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Стабильная водная фармацевтическая композиция, содержащая моноклональное антитело к PDL1 в концентрации 40-125 мг/мл, ацетат гистидина или ацетат натрия в концентрации 15-25 мМ, сахарозу в концентрации 60-240 мМ, полисорбат в концентрации 0,005-0,06% мас./об., pH которой равен 5-6,3;

при этом указанное моноклональное антитело содержит:

(а) вариабельную область легкой цепи, содержащую:

(1) HVR-L1 с аминокислотной последовательностью RASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 1);

(2) HVR-L2 с аминокислотной последовательностью SASFLYS (SEQ ID NO: 2);

(3) HVR-L3 с аминокислотной последовательностью QQYLYHPAT (SEQ ID NO: 3); и

(б) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

(1) HVR-H1 с аминокислотной последовательностью GFTFSDSWIH (SEQ ID NO: 4);

(2) HVR-H2 с аминокислотной последовательностью AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 5);

(3) HVR-H3 с аминокислотной последовательностью RHWPGGFDY (SEQ ID NO: 6).

2. Композиция по п.1, в которой указанное моноклональное антитело находится в концентрации 40-80 мг/мл.

3. Композиция по п.1, в которой указанное моноклональное антитело составляет 54-66 мг/мл.

4. Композиция по п.1, в которой указанное моноклональное антитело находится в концентрации 60 мг/мл.

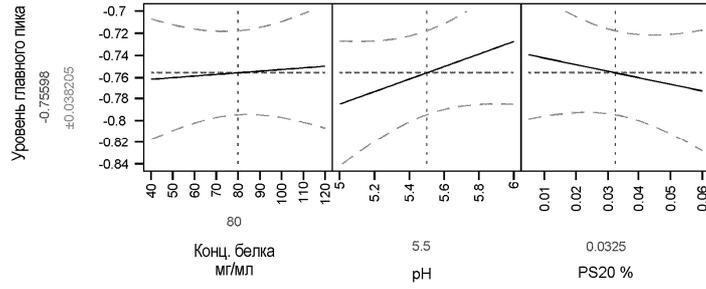
5. Композиция по п.1, в которой указанное моноклональное антитело составляет 60-125 мг/мл.

6. Композиция по п.1, в которой указанное моноклональное антитело находится в концентрации 125 мг/мл.

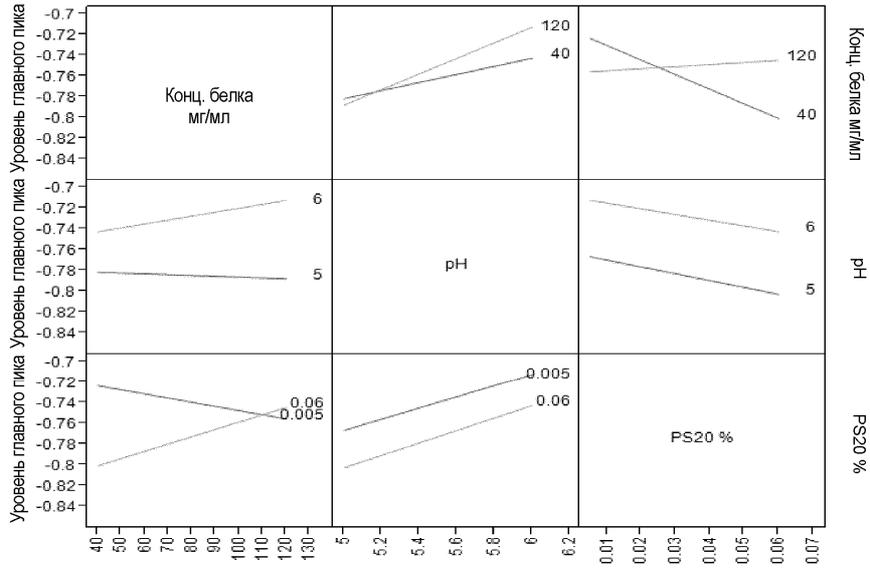
7. Композиция по любому из пп.1-6, в которой указанный ацетат гистидина или ацетат натрия находится в концентрации 17-22 мМ.

8. Композиция по любому из пп.1-6, в которой указанный ацетат гистидина или ацетат натрия находится в концентрации 20 мМ.
9. Композиция по любому из пп.1-8, в которой указанная сахароза находится в концентрации 60-180 мМ.
10. Композиция по любому из пп.1-8, в которой указанная сахароза находится в концентрации 120 мМ.
11. Композиция по любому из пп.1-10, которая имеет рН 5,5-6,1.
12. Композиция по любому из пп.1-10, которая имеет рН 5,5-5,8.
13. Композиция по любому из пп.1-12, в которой указанный полисорбат представляет собой полисорбат 20.
14. Композиция по любому из пп.1-13, в которой указанный полисорбат находится в концентрации 0,02-0,04%.
15. Композиция по любому из пп.1-5 и 7-14, в которой указанное моноклональное антитело находится в концентрации 60 мг/мл, сахароза находится в концентрации 120 мМ и рН составляет 5,8.
16. Композиция по любому из пп.1, 6-8 и 11-14, в которой указанное моноклональное антитело находится в концентрации 125 мг/мл, сахароза находится в концентрации 240 мМ и рН композиции составляет 5,5.
17. Композиция по любому из пп.1-16, в которой указанное моноклональное антитело не подвергается предварительной лиофилизации.
18. Композиция по любому из пп.1-17, в которой указанное моноклональное антитело представляет собой гуманизированное антитело.
19. Композиция по любому из пп.1-18, которая стабильна при 2-8°C в течение по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяцев.
20. Композиция по п.19, в которой антитело сохраняет после хранения по меньшей мере 80% своей биологической активности.
21. Композиция по п.20, в которой биологическую активность измеряют путем связывания антитела с PD-L1.
22. Композиция по любому из пп.1-21, которая является стерильной.
23. Композиция по любому из пп.1-22, которая подходит для введения пациенту.
24. Композиция по п.23 для внутривенного (IV) введения.
25. Композиция по п.1, в которой указанное моноклональное антитело находится в концентрации 60 мг/мл, ацетат гистидина находится в концентрации 20 мМ, сахароза находится в концентрации 120 мМ, полисорбат представляет собой полисорбат 20 в концентрации 0,04% мас./об. и рН композиции равен 5,8.
26. Композиция по п.1, в которой моноклональное антитело находится в концентрации 125 мг/мл, ацетат гистидина находится в концентрации 20 мМ, сахароза находится в концентрации 240 мМ, полисорбат представляет собой полисорбат 20 в концентрации 0,02% мас./об. и рН композиции равен 5,5.
27. Композиция по любому из пп.1-26, в которой указанное моноклональное антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.
28. Композиция по любому из пп.1-27, в которой указанное моноклональное антитело представляет собой полноразмерное антитело.
29. Композиция по п.28, в которой указанное моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.
30. Композиция по п.28 или 29, в которой указанное моноклональное антитело включает легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.
31. Композиция по любому из пп.1-27, в которой указанное моноклональное антитело представляет собой фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающий участок.
32. Композиция по п.31, в которой фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab или F(ab')₂.
33. Набор для лечения заболевания или расстройства, содержащий контейнер, включающий стабильную водную фармацевтическую композицию по любому из пп.1-32 и инструкции по применению, причем заболевание или расстройство выбрано из инфекции, злокачественного новообразования и воспалительного заболевания.
34. Набор по п.33, где контейнер представляет собой стеклянный флакон или контейнер из металлического сплава.
35. Набор по п.34, в котором металлический сплав представляет собой нержавеющую сталь 316L или сплав "Хастеллой".
36. Способ лечения заболевания или расстройства у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества композиции по любому из пп.1-32, где заболевание или расстройство выбрано из инфекции, злокачественного новообразования и воспалительного заболевания.

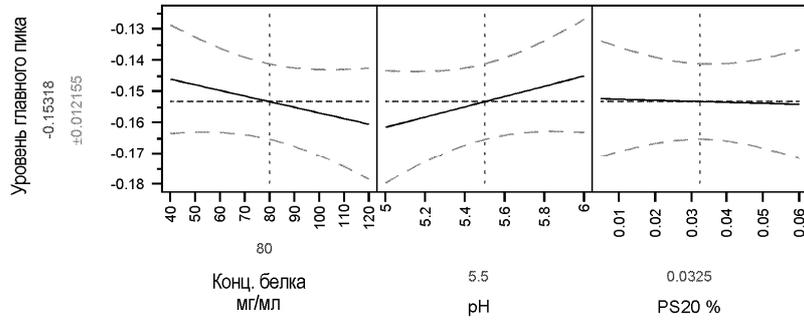
033817



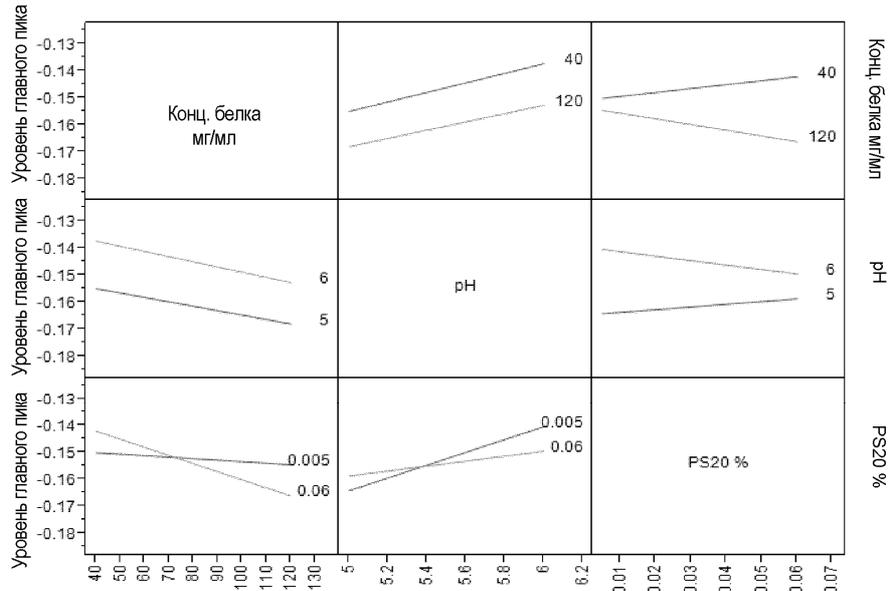
Фиг. 1А



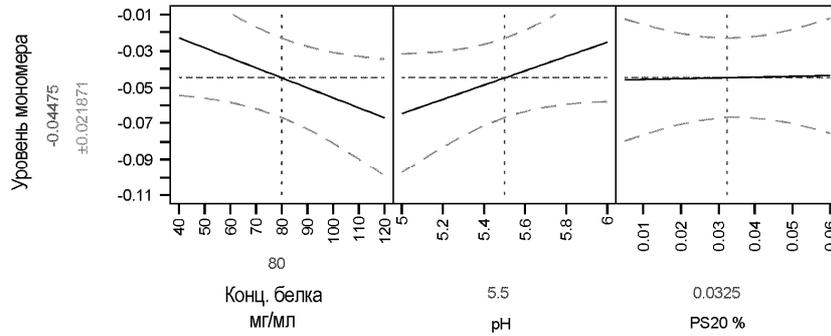
Фиг. 1В



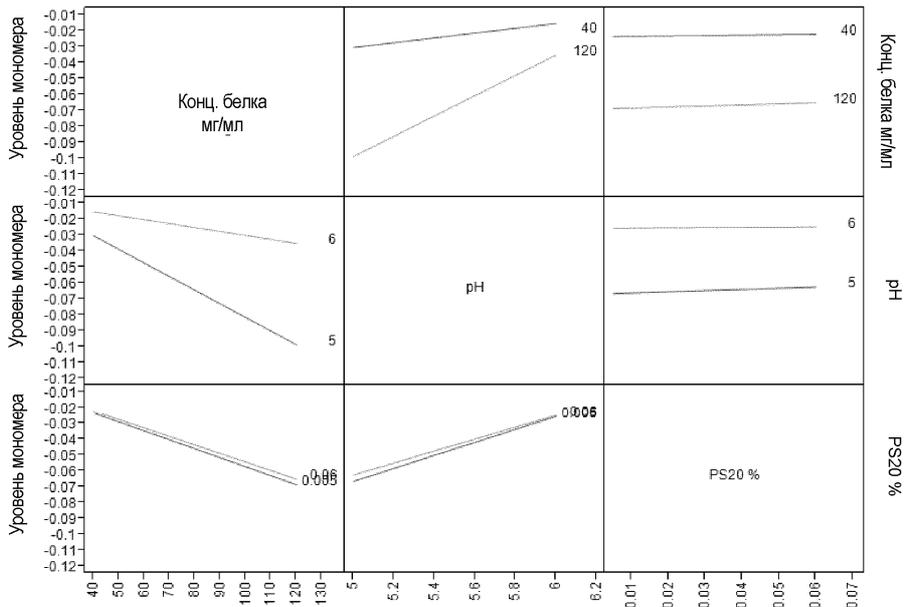
Фиг. 2А



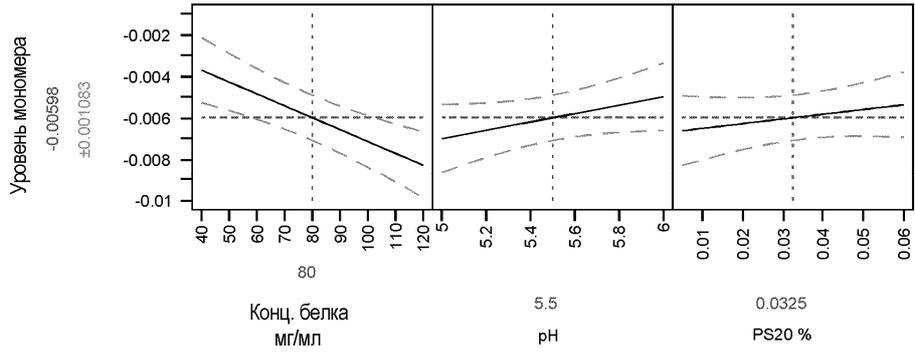
Фиг. 2В



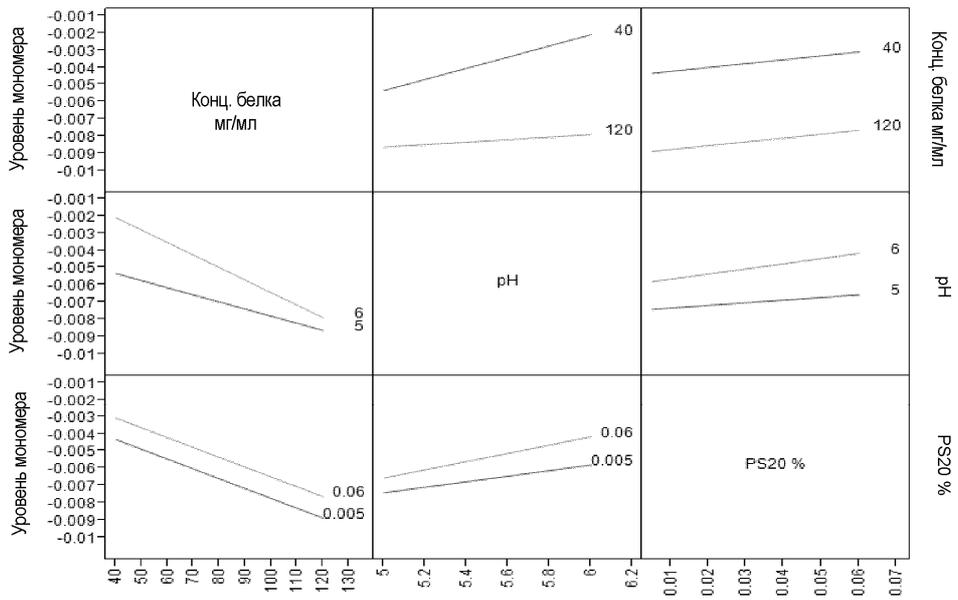
Фиг. 3А



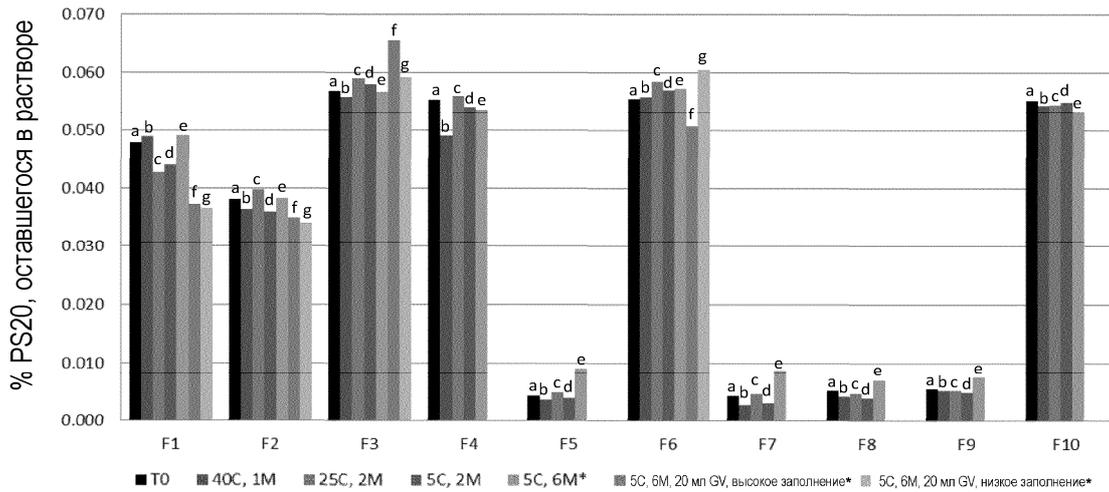
Фиг. 3В



Фиг. 4А

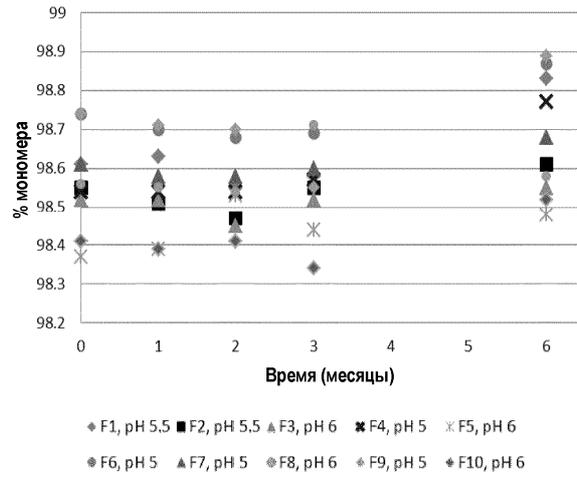


Фиг. 4В



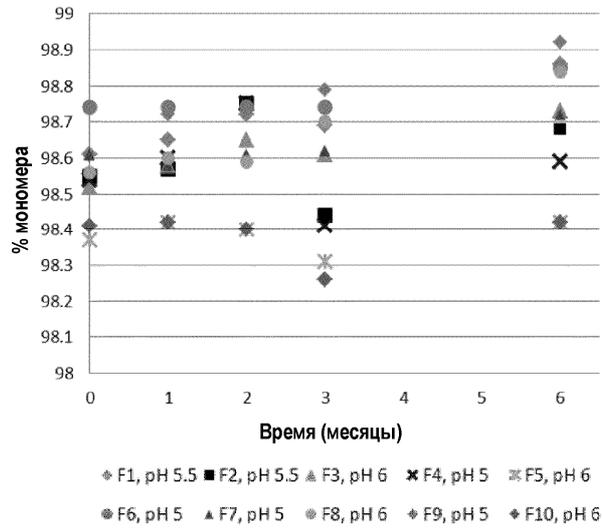
Фиг. 5

% мономера при -20С (в GV)



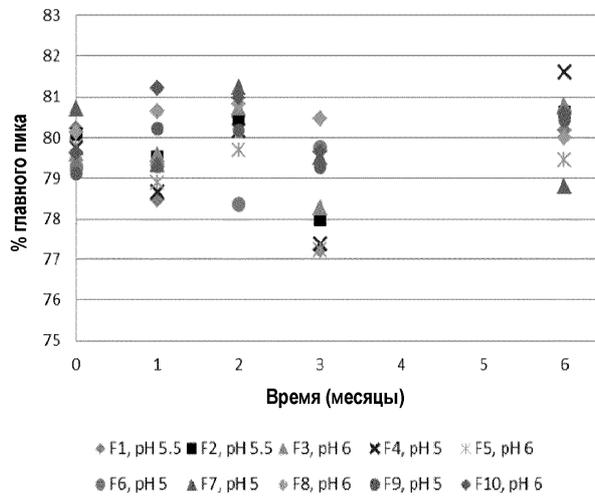
Фиг. 6А

% мономера при 5С



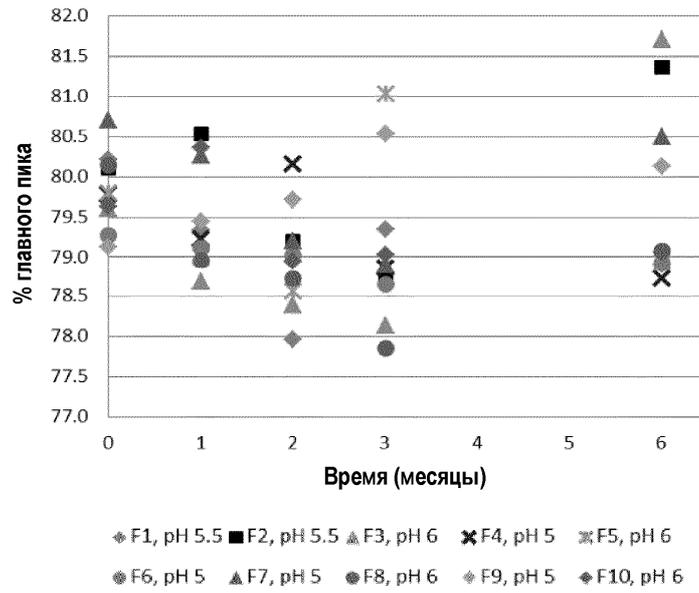
Фиг. 6В

% главного пика при -20С в GV

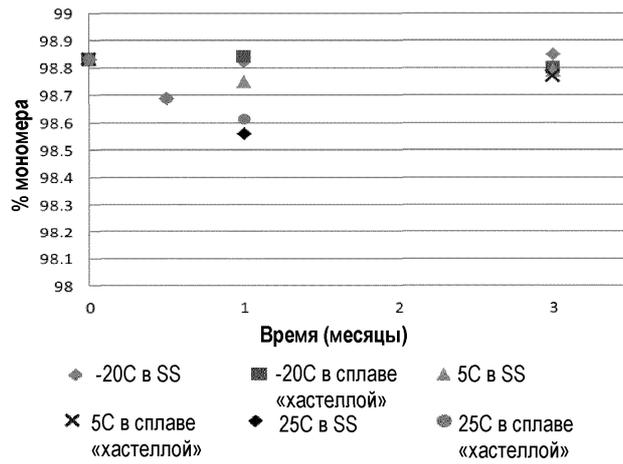


Фиг. 6С

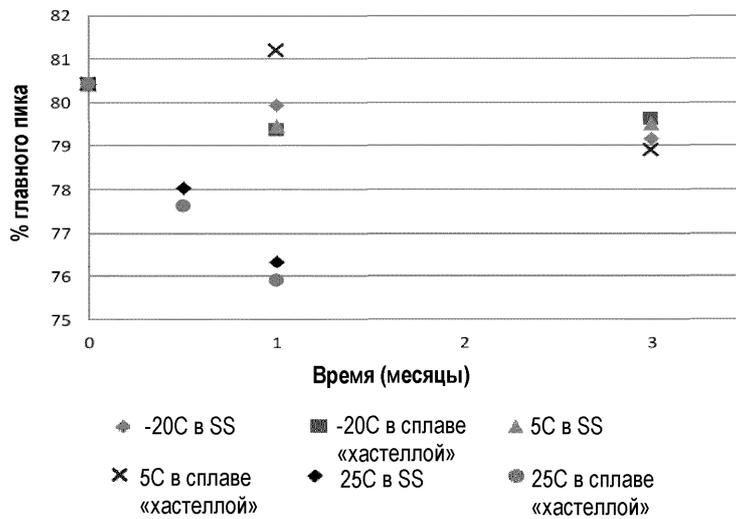
% главного пика при 5С



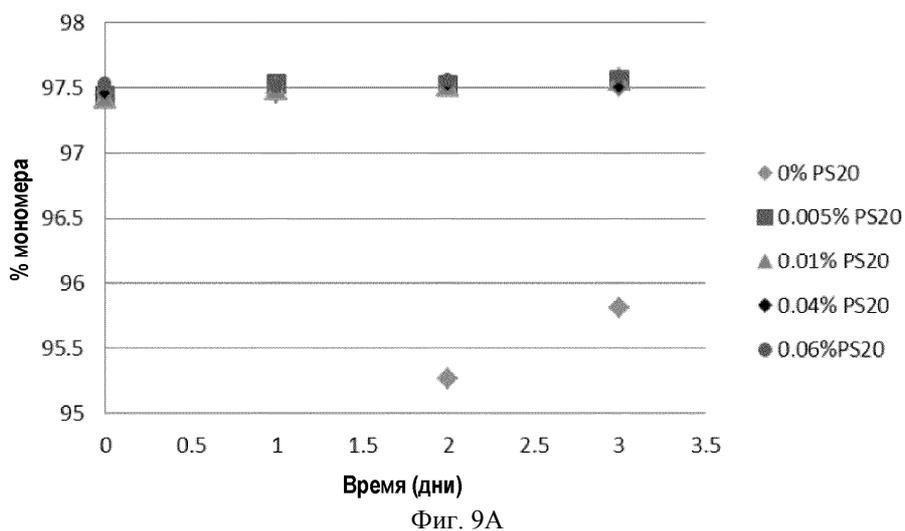
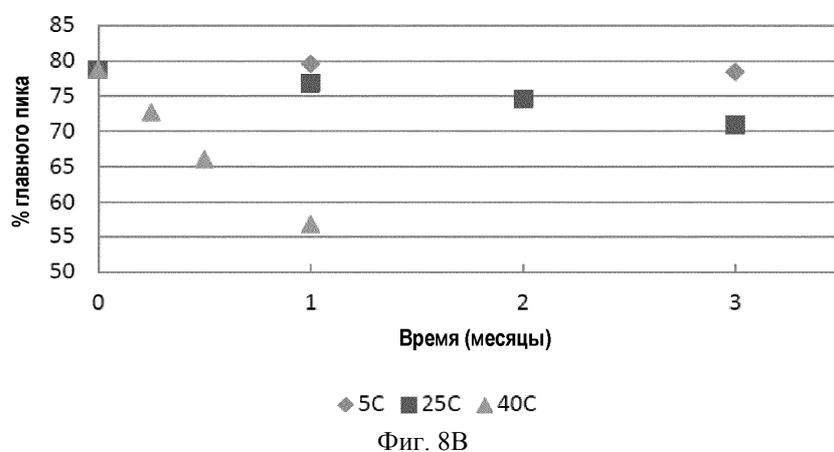
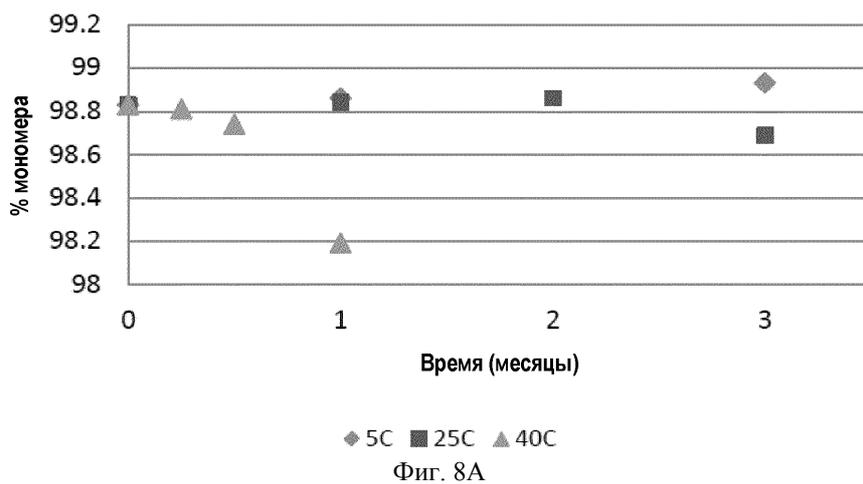
Фиг. 6D

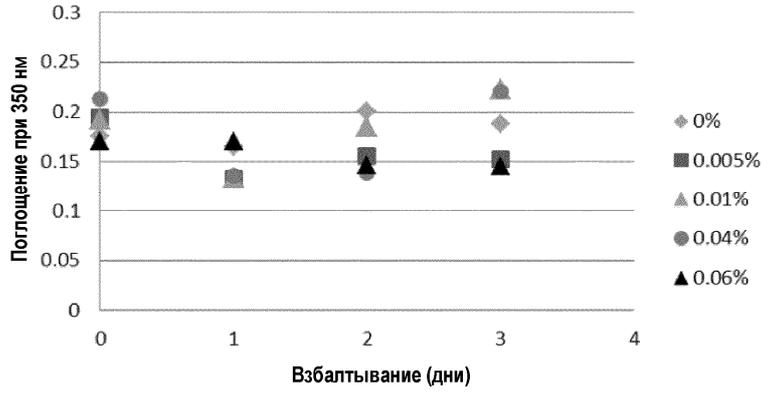


Фиг. 7А



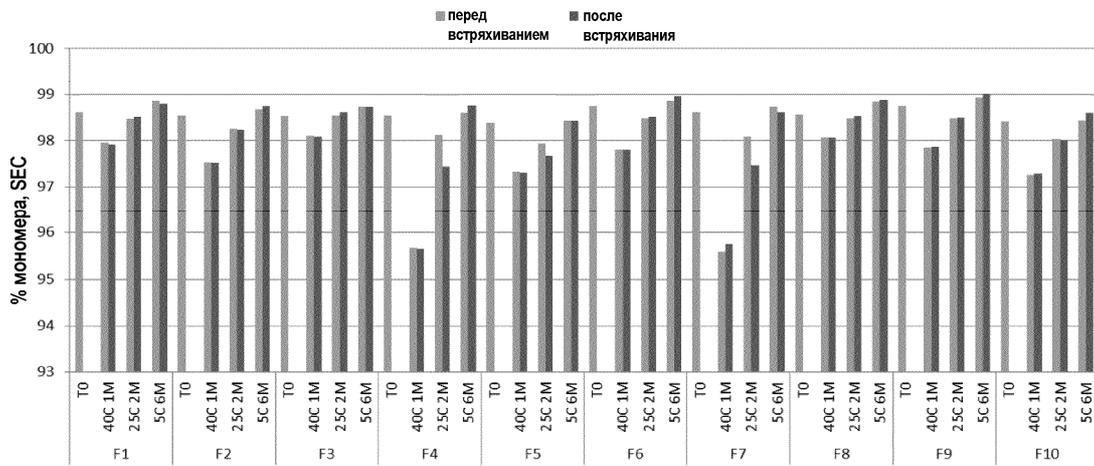
Фиг. 7B



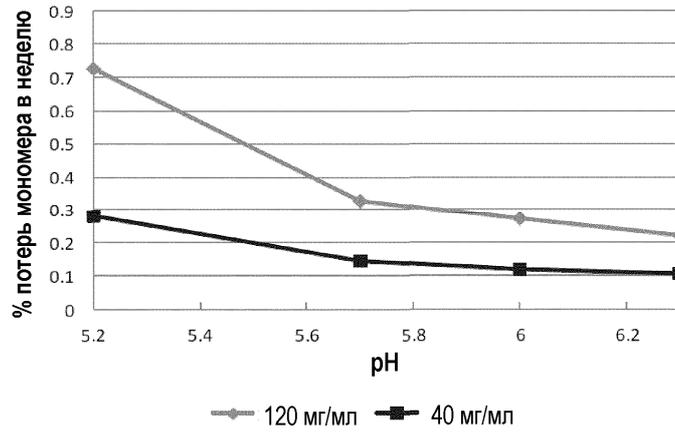


Фиг. 9В

% изменения мономера

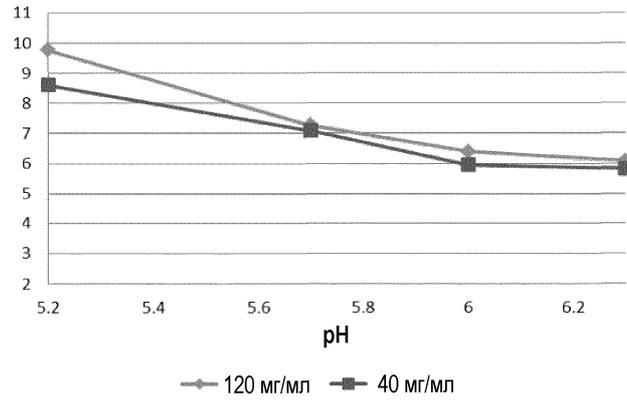


Фиг. 10



Фиг. 11А

033817



Фиг. 11В

