

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034695**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.06

(21) Номер заявки
201691487

(22) Дата подачи заявки
2015.01.23

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ЧЕЛОВЕКА К PD-L1

(31) **61/930,582; 62/089,549**

(32) **2014.01.23; 2014.12.09**

(33) **US**

(43) **2016.12.30**

(86) **PCT/US2015/012595**

(87) **WO 2015/112805 2015.07.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛС,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Пападопулос Николас Дж., Мерфи
Эндрю Дж., Серстон Гэвин, Иоффе
Элла, Бурова Елена (US)**

(74) Представитель:
**Карпенко О.Ю., Лыу Т.Н., Угрюмов
В.М., Дементьев В.Н., Глухарёва
А.О., Клюкин В.А., Строкова О.В.,
Христофоров А.А. (RU)**

(56) **WO-A1-2011066389
WO-A1-2010077634
WO-A1-2013166500
WO-A2-2007005874**

(57) Согласно изобретению предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с человеческим белком-лигандом 1 программируемой смерти (PD-L1), содержащие три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем (a) HCDR1 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 84; (b) HCDR2 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 86; (c) HCDR3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 88; (d) LCDR1 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 92; (e) LCDR2 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 94 и (f) LCDR3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 96, и способы их применения. Согласно определенным вариантам применения согласно изобретению предусмотрена фармацевтическая композиция для ингибирования активности PD-L1, нейтрализации активности PD-L1 и/или стимуляции Т-клеточной активации; выделенная полинуклеотидная молекула; вектор экспрессии; клетка-хозяин; способ получения антитела к PD-L1 или его антигенсвязывающего фрагмента; применение антитела или фармацевтической композиции для усиления иммунного ответа у субъекта, ингибирования Т-регуляторной (Treg) клетки у субъекта и/или усиления Т-клеточной активации у субъекта, ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки у субъекта; способ усиления иммунного ответа у субъекта, ингибирования Т-регуляторной (Treg) клетки у субъекта, усиления Т-клеточной активации у субъекта и/или ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки у субъекта.

B1**034695****034695****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к антителам человека и антигенсвязывающим фрагментам антител человека, которые специфически связываются с лигандом иммуномодулирующего рецептора, лигандом 1 программируемой смерти (PD-L1), и терапевтическим и диагностическим способам применения указанных антител.

Предшествующий уровень техники

Лиганд 1 программируемой смерти (PD-L1) (также называемый B7-H1 или CD274) представляет собой состоящий из 290 аминокислот белок-рецепторный лиганд, широко экспрессируемый как на лимфоидных, так и на нелимфоидных тканях, например, на CD4 и CD8 Т-клетках, клетках макрофагальной линии, периферических тканях, а также на опухолевых клетках и инфицированных вирусом клетках (Dong et al. 1999, *Nature Med.*). PD-L1 связывается с рецепторами PD-1 и B7-1, которые принадлежат семейству CD28/CTLA-4 (антиген цитотоксических Т-лимфоцитов)/ICOS (индуцируемый костимулятор) Т-клеточных соингибирующих рецепторов (Chen et al. 2013, *Nature Rev. Immunol.* 13: 227-242), и ослабляет иммунный ответ путем ингибирования Т-клеточной активации. Связывание PD-L1 с PD-1 или B7-1 приводит к уменьшению Т-клеточной пролиферации и секреции цитокинов, снижая гуморальные и клеточные иммунные ответы при таких заболеваниях, как злокачественная опухоль и вирусная инфекция.

Экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках и инфицированных вирусом клетках используется опухолями и хроническими вирусными инфекциями, чтобы ускользнуть от иммунного ответа. PD-L1 экспрессируется на широком разнообразии опухолей, и исследования на животных моделях показали, что PD-L1 на опухолях ингибирует Т-клеточную активацию и лизис опухолевых клеток и может привести к повышенной гибели опухоль-специфических Т-клеток. При хронических вирусных инфекциях PD-L1, экспрессированный на инфицированных вирусом клетках, связывается с PD-1 на вирус-специфических Т-клетках, и указанные Т-клетки становятся "истощенными", теряя эффекторные функции и пролиферативный потенциал (Freeman 2008, *PNAS* 105: 10275-10276). Система PD-1:PD-L1 также играет важную роль в развитии индуцированных Т-регуляторных клеток (Treg) и в поддержании функции Treg (Francisco et al. 2010, *Immunol. Rev.* 236: 219-242).

Поскольку PD-L1 играет важную роль в опухолевом иммунитете и инфекционном иммунитете, он является оптимальной мишенью для иммунотерапии. Блокирование PD-L1 с помощью антагонистов, включая в себя моноклональные антитела, было исследовано в различных видах лечения злокачественных опухолей и хронических вирусных инфекций (Ribas 2012, *NEJM* 366: 2517-2519; Freeman 2008, *PNAS* 105: 10275-10276; Sheridan 2012, *Nature Biotechnology* 30: 729-730).

Моноклональные антитела к PD-L1 известны в настоящей области техники и описаны, например, в патентах США №№ 7943742, 8383796, 8217149, патентных публикациях США №№ 20090055944, 20120003056, 20130034559, 20130045200, 20130045201, 20130045202 и в международных патентных публикациях WO 2007005874, WO 2011066389, WO 2010077634, Европейских патентах EP 1907424 и EP 1899379.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают PD-L1. Антитела согласно настоящему изобретению являются применимыми, среди прочего, для нацеленного воздействия на клетки, экспрессирующие PD-L1, такие как злокачественные клетки или инфицированные вирусом клетки, и для модулирования активности PD-L1. Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению являются применимыми для ингибирования или нейтрализации активности PD-L1 и для стимуляции Т-клеточной активации, например, при таких обстоятельствах, когда опосредованный Т-клетками цитолиз является целесообразным или желательным. Антитела являются применимыми в лечении такого заболевания или нарушения, как злокачественная опухоль и вирусная инфекция.

Антитела согласно настоящему изобретению могут являться полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут содержать только антигенсвязывающую часть (например, фрагмент Fab, F(ab')₂ или scFv), и могут быть модифицированы так, чтобы оказать влияние на их функциональность, например, устранить остаточные эффекторные функции (Reddy et al., 2000, *J. Immunol.* 164:1925-1933).

Способы и техники идентификации CDR в пределах аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR хорошо известны в настоящей области техники и могут использоваться для идентификации CDR в пределах определенных аминокислотных последовательностей HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем документе. Иллюстративные общепринятые подходы, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают в себя, например, определение согласно Kabat, определение согласно Chothia и определение AbM. В общих чертах, определение согласно Kabat основано на изменчивости последовательностей, определение согласно Chothia основано на расположении областей структурных петель, и определение AbM представляет собой сочетание между подходами согласно Kabat и Chothia. См. Например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997) и Martin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989). Общедоступные базы данных также доступны для идентификации последовательностей CDR в пределах антитела.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к PD-L1, характеризующиеся модифицированным паттерном гликозилирования. Согласно определенным вариантам осуществления можно применить модификацию для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитело, у которого отсутствует фрагмент фукозы, присутствующий на олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). Для других применений может быть осуществлена модификация галактозилирования для модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

Согласно настоящему изобретению предусмотрено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с человеческим белком-лигандом 1 программируемой смерти (PD-L1), причем выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарности области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем

- (a) HCDR1 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 84;
- (b) HCDR2 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 86;
- (c) HCDR3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 88;
- (d) LCDR1 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 92;
- (e) LCDR2 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 94 и
- (f) LCDR3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 96.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 82; и вариабельную область легкой цепи (LCVR), характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 90.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые относятся к изотипу IgG1 или IgG4.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрена фармацевтическая композиция для ингибирования активности PD-L1, нейтрализации активности PD-L1 и/или стимуляции Т-клеточной активации, причем фармацевтическая композиция содержит выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с PD-L1 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрена выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрена выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидные последовательности.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрена клетка-хозяин для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, экспрессирующая вектор.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрен способ получения антитела к PD-L1 или его антигенсвязывающего фрагмента, причем способ предусматривает культивирование клетки при условиях, обеспечивающих возможность получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и выделения антитела или фрагмента, полученного таким образом.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено применение выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для усиления иммунного ответа у субъекта, ингибирования Т-регуляторной (Treg) клетки у субъекта и/или усиления Т-клеточной активации у субъекта.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено применение фармацевтической композиции для усиления иммунного ответа у субъекта, для ингибирования Т-регуляторной (Treg) клетки у субъекта и/или усиления Т-клеточной активации у субъекта.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено применение, при котором субъект характеризуется наличием опухоли.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено применение, при котором субъект характеризуется наличием вирусной инфекции.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено применение, при котором вирусная инфекция включает в себя HIV, HCV, HBV, HPV, LCMV, SIV или их комбинацию.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено применение выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки у субъекта.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено применение фармацевтической композиции для ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки у субъекта.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено применение, при котором опухоль включает в себя почечноклеточную карциному, злокачественную опухоль мозга, плоскоклеточную карциному

головы и шеи, злокачественную опухоль желудка, злокачественную опухоль почки, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль яичника, злокачественную опухоль предстательной железы, немелкоклеточный рак легкого, злокачественную опухоль толстой и прямой кишки, множественную миелому или меланому.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрен способ усиления иммунного ответа у субъекта, ингибирования Т-регуляторной (Treg) клетки у субъекта, усиления Т-клеточной активации у субъекта и/или ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки у субъекта, предусматривающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации со вторым терапевтическим средством или терапией, включающими NSAID, кортикостероид, антитело к Т-клеточному соингибитору, антитело к опухоль-специфическому антигену, антитело к антигену инфицированной вирусом клетки, антитело к PD-1, ингибитор IDO, ингибитор Ang2, ингибитор EGFR, ингибитор TGFP, пищевую добавку, такую как антиоксидант, антагонист VEGF, такой как антитело к VEGF, низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF, ингибирующий VEGF белок слияния, операцию, облучение, химиотерапевтическое средство, цитотоксическое средство, противовирусное лекарственное средство или их комбинацию.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрен способ усиления иммунного ответа у субъекта, ингибирования Т-регуляторной (Treg) клетки у субъекта, усиления Т-клеточной активации у субъекта и/или ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки у субъекта, предусматривающий введение фармацевтической композиции в комбинации со вторым терапевтическим средством или терапией, включающими NSAID, кортикостероид, антитело к Т-клеточному соингибитору, антитело к опухоль-специфическому антигену, антитело к антигену инфицированной вирусом клетки, антитело к PD-1, ингибитор IDO, ингибитор Ang2, ингибитор EGFR, ингибитор TGFP, пищевую добавку, такую как антиоксидант, антагонист VEGF, такой как антитело к VEGF, низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF, ингибирующий VEGF белок слияния, операцию, облучение, химиотерапевтическое средство, цитотоксическое средство, противовирусное лекарственное средство или их комбинацию.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрен способ, при котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, интрадермально, интраперитонеально, перорально, внутримышечно или интракраниально.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрен способ, при котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическую композицию, вводят в дозе, составляющей приблизительно 0,1 мг/кг массы тела - приблизительно 60 мг/кг массы тела субъекта.

Другие варианты осуществления станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 представляет собой схему основанного на использовании люциферазы биоанализа PD-L1, описанного в примере 8 в настоящем документе. Панель А: Неактивные клетки Jurkat; Панель В: Клетки Jurkat активированы кластеризацией Т-клеточного рецептора (TCR) посредством биспецифического антитела CD3×CD20; Панель С: Активация PD-1 ослабляет ответ в активированных клетках Jurkat; Панель D: Блокирующий PD-L1 восстанавливает ответ в активированных клетках Jurkat.

На фиг. 2 проиллюстрированы результаты роста опухоли и выживаемости для мышей, которым имплантировали опухолевые клетки Colon-26 на 0 день и которых лечили с помощью указанных комбинаций молекул путем инъекции на 3, 6, 10, 13 и 19 дни ("модель опухоли с ранним лечением"). На графике изображен объем опухоли (в мм³) для различных экспериментальных групп в различные временные точки после имплантации. Стрелками вверх по оси X указано время введения лечебных инъекций. "mIgG2a" представляет собой контроль изотипа IgG2; "Fc" представляет собой контроль Fc человека; "белок-ловушка для VEGF" представляет собой афлиберцепт; "анти-PD-1" представляет собой клон RPMI-14 к PD-1 мыши; "анти-PD-L1" представляет собой моноклональное антитело к PD-L1, описанное в другом месте в настоящем документе.

На фиг. 3 проиллюстрированы результаты роста опухоли и выживаемости для мышей, которым имплантировали опухолевые клетки Colon-26 на 0 день и которых лечили с помощью указанных комбинаций молекул путем инъекции на 3, 6, 10, 13 и 19 дни ("модель опухоли с ранним лечением"). На графике изображен объем опухоли (в мм³) отдельных мышей в каждой экспериментальной группе на 28 день после имплантации. "mIgG2a" представляет собой контроль изотипа IgG2; "Fc" представляет собой контроль Fc человека; "белок-ловушка для VEGF" представляет собой афлиберцепт; "анти-PD-1" представляет собой клон RPMI-14 к PD-1 мыши; "анти-PD-L1" представляет собой моноклональное антитело к PD-L1, описанное в другом месте в настоящем документе.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Перед тем как будут описаны настоящие способы, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными способами и описанными экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология применяется исключительно с целью описания конкретных вариантов осуществления и не предусмотрена как ограничивающая, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен толь-

ко прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, которое обычно понятно специалисту в настоящей области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в настоящем документе, можно использовать в осуществлении на практике или тестировании настоящего изобретения, ниже будут описаны предпочтительные способы и материалы. Все упомянутые в настоящем документе публикации полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Термин "PD-L1" относится к лиганду 1 программируемой смерти, также известному как CD274 и B7H1. Аминокислотная последовательность полноразмерного PD-L1 представлена в GenBank под регистрационным номером NP_054862.1 и также обозначена в настоящем документе как SEQ ID NO: 351. Термин "PD-L1" также включает в себя варианты белка PD-L1, характеризующиеся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 345, 346, 347 или 348. Термин "PD-L1" включает в себя рекомбинантный PD-L1 или его фрагмент. Термин также предусматривает PD-L1 или его фрагмент, соединенный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека или сигнальной последовательностью, такой как ROR1. Например, термин включает в себя последовательности, иллюстративно представленные как SEQ ID NO: 347 или 348, содержащие Fc мыши (mIgG2a) или Fc человека (hIgG1) на С-конце, соединенные с аминокислотными остатками 19-239 полноразмерного PD-L1 (SEQ ID NO: 351; NP_054862.1). Варианты белка, иллюстративно представленные как SEQ ID NO: 345, содержат гистидиновую метку на С-конце, соединенную с аминокислотными остатками 19-239 NP_054862.1. Если не указано происхождение от вида, не относящегося к человеку, термин "PD-L1" означает PD-L1 человека.

PD-L1 представляет собой 290 аминокислотный белок с внеклеточным IgV-подобным и IgC-подобным доменами (аминокислоты 19-239 полноразмерного PD-L1), трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом, составляющим приблизительно 30 аминокислот. PD-L1 конститутивно экспрессируется на многих клетках, таких как антигенпрезентирующие клетки (например, дендритные клетки, макрофаги и В-клетки) и на гемопоэтических и негемопоэтических клетках (например, клетках сосудистого эндотелия, островках поджелудочной железы и сайтах иммунных привилегий). PD-L1 также экспрессируется на широком разнообразии опухолей и инфицированных вирусом клетках и представляет собой компонент иммуносупрессорной среды (Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519). PD-L1 связывается с одним из двух соингибиторов Т-клеток, PD-1 и B7-1.

Термин "PD-1" относится к белку программируемой смерти 1, Т-клеточному соингибитору, также известному как CD279. Аминокислотная последовательность полноразмерного PD-1 представлена в GenBank под регистрационным номером NP_005009.2 и также представлена в настоящем документе как SEQ ID NO: 352. Термин также включает в себя PD-1 или его фрагмент, соединенный, например, с гистидиновой меткой, Fc мыши или человека или сигнальной последовательностью, такой как ROR1. Например, термин включает в себя последовательности, иллюстративно представленные как SEQ ID NO: 349 или 350, содержащие Fc мыши (mIgG2a) или Fc человека (hIgG1) на С-конце, соединенные с аминокислотными остатками 25-170 NP_005009.2 с заменой C93S.

PD-1 представляет собой представителя семейства CD28/CTLA-4/ICOS Т-клеточных соингибиторов. PD-1 представляет собой 288-аминокислотный белок с внеклеточным N-концевым доменом, который является IgV-подобным, трансмембранным доменом и внутриклеточным доменом, содержащим тирозинсодержащий ингибирующий мотив иммунорецептора (ITIM) и тирозинсодержащий свич-мотив иммунорецептора (ITSM) (Chattopadhyay et al. 2009, Immunol. Rev.). Рецептор PD-1 характеризуется наличием двух лигандов, PD-L1 и PD-L2.

Термин "B7-1" относится к антигену активации Т-лимфоцитов, также известному как костимулирующий фактор CD80. B7-1 представляет собой 288 аминокислотный мембранный рецептор с внеклеточным N-концевым доменом, который содержит IgV-подобную (aa 37-138) и IgC-подобную (aa 154-232) области, трансмембранным доменом (aa 243-263) и С-концевой внутриклеточной областью (aa 263-288). Аминокислотная последовательность полноразмерного B7-1 представлена в GenBank под регистрационным номером NP_005182.1.

Используемый в настоящем документе термин "Т-клеточный соингибитор" относится к лиганду и/или рецептору, который модулирует иммунный ответ посредством Т-клеточной активации или супрессии. Термин "Т-клеточный соингибитор", также известный как Т-клеточная косигнальная молекула, включает в себя без ограничения PD-1, белок гена активации лимфоцита 3 (LAG-3, также известный как CD223), антиген-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), аттенуатор В и Т-лимфоцитов (BTLA), CD-28, 2B4, LY108, Т-клеточный иммуноглобулин и муцин-3 (TIM3), Т-клеточный иммунорецептор с иммуноглобулином и ITIM (TIGIT; также известный как VSIG9), ассоциированный с лейкоцитами иммуноглобулиноподобный рецептор 1 (LAIR1; также известный как CD305), индуцируемый Т-клеточный костимулятор (ICOS; также известный как CD278), B7-1 (CD80) и CD160.

Предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулина, состоящим из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями (т.е. "полные молекулы антитела"), а также к их мультимерам (например, IgM) или антигенсвязывающим фрагментам. Каждая тяжелая цепь

состоит из вариабельной области тяжелой цепи ("HCVR" или " V_H ") и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи ("LCVR" или " V_L ") и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, которые называются определяющие комплементарность области (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, которые называются каркасные области (FR). Каждая из V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) может быть идентичной последовательностям зародышевой линии человека или может являться полностью природно или искусственно модифицированной. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основании сравнительного анализа двух или более CDR.

Также возможна замена одного или нескольких остатков CDR или пропуск одной или нескольких CDR. В научной литературе были описаны антитела, которые для связывания могут обойтись без одной или двух CDR. Padlan с соавт. (1995 FASEB J. 9:133-139) проанализировали контактные области между антителами и их антигенами, на основании опубликованных кристаллических структур, и пришли к выводу, что только приблизительно одна пятая - одна третья остатков CDR фактически контактирует с антигеном. Padlan также обнаружил многие антитела, в которых одна или две CDR не характеризуются наличием аминокислот в контакте с антигеном (см. также, Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320:415-428).

Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, можно идентифицировать на основании предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDRH2 зачастую не являются необходимыми), из областей CDR согласно Kabat, лежащих за пределами CDR согласно Chothia, с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирически. Если CDR или ее остаток(остатки) пропущен(ы), как правило, он замещен аминокислотой, занимающей соответствующее положение в другой последовательности антитела человека или консенсусе таких последовательностей. Положения для замены в пределах CDR и аминокислоты для замещения также могут быть выбраны эмпирически. Эмпирические замены могут являться консервативными или неконсервативными заменами.

Раскрытые в настоящем документе полностью человеческие моноклональные антитела к PD-L1 могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR областях вариабельных доменов тяжелой и легкой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии. Такие мутации можно легко выявить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела, и их антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, причем одна или несколько аминокислот в пределах одной или нескольких каркасных и/или CDR областей мутированы до соответствующего(их) остатка(ов) последовательности зародышевой линии, из которой произошло антитело, или до соответствующего(их) остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии человека, или до консервативной аминокислотной замены соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в настоящем документе обобщенно называются "мутации зародышевой линии"). Специалист в настоящей области техники, начиная с раскрытых в настоящем документе последовательностей вариабельной области тяжелой и легкой цепи, может без труда получить различные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. Согласно определенным вариантам осуществления все каркасные и/или CDR остатки в пределах доменов V_H и/или V_L мутируют обратно с получением остатков, встречающихся в исходной последовательности зародышевой линии, из которой произошло антитело. Согласно другим вариантам осуществления только определенные остатки мутируют обратно до исходной последовательности зародышевой линии, например, только мутированные остатки, встречающиеся в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только мутированные остатки, встречающиеся в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. Согласно другим вариантам осуществления один или несколько каркасных и/или CDR остатков мутируют до соответствующего(их) остатка(ов) последовательности другой зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой изначально произошло антитело). Более того, антитела согласно настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или больше мутаций зародышевой линии в пределах каркасных и/или CDR областей, например, при этом определенные отдельные остатки мутируют до соответствующего остатка конкретной последовательности зародышевой линии, тогда как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняют или мутируют до соответствующего остатка последовательности другой зародышевой линии. Будучи полученными, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или несколько мутаций зародышевой линии, можно легко исследовать в отношении одного или нескольких требуемых свойств, таких как, улучшенная специфичность связывания, увеличенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонисти-

ческие или агонистические биологические свойства (если таковые могут иметь место), сниженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом, предусмотрены в пределах настоящего изобретения.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены полностью человеческие моноклональные антитела к PD-L1, содержащие варианты любой из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, характеризующиеся одной или несколькими консервативными заменами. Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к PD-L1, характеризующиеся аминокислотными последовательностями HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из раскрытых в настоящем документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR.

Предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин "антитело человека" включают в себя антитела, характеризующиеся переменными и константными областями, происходящими из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. mAb человека согласно настоящему изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Тем не менее, не предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин "антитело человека" включает в себя mAb, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, мыши), были привиты на последовательности FR человека. Термин включает в себя антитела, рекомбинантно произведенные в не являющемся человеком млекопитающем, или в клетках не являющегося человеком млекопитающего. Не предусмотрено, что термин включает в себя антитела, выделенные из субъекта - человека или созданные в нем.

Используемый в настоящем документе термин "мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы" относится к биспецифическим, триспецифическим или мультиспецифическим антигенсвязывающим молекулам и их антигенсвязывающим фрагментам. Мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы могут являться специфическими в отношении различных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении эпитопов больше чем одного целевого полипептида. Мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула может представлять собой отдельный мультифункциональный полипептид или она может представлять собой мультимерный комплекс из двух или больше полипептидов, которые ковалентно или нековалентно соединены друг с другом. Термин "мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы" включает в себя антитела согласно настоящему изобретению, которые могут быть связаны или могут коэкспрессироваться с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент может быть функционально связан (например, с помощью химического сочетания, генетического слияния, нековалентной связи или иным образом) с одним или несколькими другими молекулярными структурными единицами, такими как белок или его фрагмент с получением биспецифической или мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы со второй специфичностью связывания. Согласно настоящему изобретению термин "мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы" также включает в себя биспецифические, триспецифические или мультиспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Согласно определенным вариантам осуществления антитело согласно настоящему изобретению функционально связано с другим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом с получением биспецифического антитела со второй специфичностью связывания. Биспецифические и мультиспецифические антитела согласно настоящему изобретению описаны в другом месте в настоящем документе.

Термин "специфически связывает" или "специфически связывается с" или подобное означает, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который является относительно стабильным при физиологических условиях. Специфическое связывание можно охарактеризовать равновесной константой диссоциации, составляющей по меньшей мере приблизительно 1×10^{-8} М или меньше (например, меньшая K_D означает более сильное связывание). Способы определения того, связываются ли две молекулы специфически, хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и подобное. Как описано в настоящем документе, с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, были идентифицированы антитела, которые специфически связываются с PD-L1. Более того, мультиспецифические антитела, которые связываются с одним доменом в PD-L1 и одним или несколькими дополнительными антигенами, или биспецифические, которые связываются с двумя различными областями PD-L1, тем не менее, рассматривают как антитела, которые "специфически связывают" согласно используемому в настоящем документе термину.

Термин антитело с "высокой аффинностью" относится к тем mAb, которые характеризуются аффинностью связывания с PD-L1, выражаемой как K_D , составляющей по меньшей мере 10^{-8} М; предпочтительно 10^{-9} М; более предпочтительно 10^{-10} М, даже более предпочтительно 10^{-11} М, даже более предпоч-

тительно 10^{-12} М, согласно измерению с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™ или ELISA для определения аффинности в растворе.

Под термином "медленная скорость диссоциации", " K_{off} " или " k_d " подразумевают антитело, которое диссоциирует от PD-L1 с константой скорости, составляющей $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ или меньше, предпочтительно $1 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ или меньше, что определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™.

Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и подобное включают в себя любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела, или "фрагмент антитела" относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с PD-L1.

Согласно конкретным вариантам осуществления антитело или фрагменты антитела согласно настоящему изобретению могут быть конъюгированы с таким фрагментом, как лиганд или терапевтический фрагмент ("иммуноконъюгат"), такой как антибиотик, второе антитело к PD-L1 или антитело с другим антигеном, таким как опухоль-специфический антиген, антиген инфицированной вирусом клетки, или Т-клеточный соингибитор, или с иммунотоксином, или с любым другим терапевтическим фрагментом, применимым для лечения заболевания или состояния, включая в себя, например, злокачественную опухоль, хроническую вирусную инфекцию или аутоиммунное заболевание.

Предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое по существу не содержит другие антитела (Ab), характеризующиеся другими антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с PD-L1, или его фрагмент, по существу не содержит Ab, которые специфически связываются с антигенами, отличными от PD-L1).

Предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин "блокирующее антитело" или "нейтрализующее антитело" (или "антитело, которое нейтрализует активность PD-L1" или "антагонистическое антитело") относится к антителу, чье связывание с PD-L1 приводит к ингибированию по меньшей мере одной биологической активности PD-L1. Например, антитело согласно настоящему изобретению может предотвращать или блокировать связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1.

Предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин "активирующее антитело" или "усиливающее антитело" (или "агонистическое антитело") относится к антителу, чье связывание с PD-L1 приводит к увеличению или стимуляции по меньшей мере одной биологической активности PD-L1. Например, антитело согласно настоящему изобретению может увеличивать или усиливать связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1.

Используемый в настоящем документе термин "поверхностный плазмонный резонанс" относится к оптическому явлению, которое позволяет проанализировать биомолекулярные взаимодействия в режиме реального времени путем обнаружения изменений в концентрациях белка в пределах биосенсорной матрицы, например, с использованием системы BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Уппсала, Швеция и Пискатауэй, Нью-Джерси).

Предусмотрено, что используемый в настоящем документе термин " K_D " относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует с конкретным сайтом связывания антигена в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Отдельный антиген может иметь больше чем один эпитоп. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями на антигене и могут характеризоваться различными биологическими эффектами. Термин "эпитоп" также относится к сайту на антигене, с которым реагирует В и/или Т-клетки. Он также относится к области антигена, которая связывается антителом. Эпитопы могут быть определены как структурные или функциональные. Функциональные эпитопы, как правило, представляют собой подгруппу структурных эпитопов и содержат такие остатки, которые вносят прямой вклад в аффинность взаимодействия. Эпитопы также могут являться конформационными, то есть, состоящими из нелинейных аминокислот. Согласно определенным вариантам осуществления эпитопы могут включать в себя детерминанты, которые представляют собой химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи Сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и согласно определенным вариантам осуществления могут характеризоваться конкретными трехмерными структурными характеристиками и/или конкретными характеристиками заряда.

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичная", относящийся к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает на то, что будучи оптимально выровненными с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью), существует идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере у приблизительно 90%, и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, согласно измерению с помощью любого хорошо известного алгоритма идентичности после-

довательности, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, характеризующаяся существенной идентичностью относительно эталонной молекулы нуклеиновой кислоты, может в определенных обстоятельствах кодировать полипептид, характеризующийся такой же или по существу сходной аминокислотной последовательностью, что и полипептид, кодируемой эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно в отношении полипептидов, термин "существенное сходство" или "по существу сходный" означает, что две пептидных последовательности, будучи оптимально выровненными, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за открытие делеции по умолчанию, обладают по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, даже более предпочтительно по меньшей мере 95, 98 или 99% идентичностью последовательности. Предпочтительно положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются на консервативные аминокислотные замены. "Консервативная аминокислота замена" представляет собой замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, характеризующимся боковой цепью (группой R) со сходными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В общем, консервативная аминокислотная замена не будет по существу изменять функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга на консервативные замены, процент или степень сходства можно отрегулировать в сторону повышения для корректировки в отношении консервативной природы замены. Средства для проведения такой корректировки хорошо известны специалистам в настоящей области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, которая включена в настоящий документ посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают в себя 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; 3) амидосодержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных аминокислотных замен представляют собой следующее: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин.

Альтернативно, консервативное замещение представляет собой любое изменение, характеризующееся положительным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45, включенной в настоящий документ посредством ссылки. "Умеренно консервативное" замещение представляет собой любое изменение, характеризующееся неотрицательным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательности для полипептидов, как правило, измеряют с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков проверяет соответствие сходных последовательностей с использованием величин сходства, присвоенных различным заменам, делециям и другим модификациям, включая в себя консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды от различных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнить с использованием FASTA с параметрами по умолчанию или рекомендуемыми параметрами; программы в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и идентичность последовательностей в процентах областей наилучшего перекрытия между последовательностями поискового запроса и поиска (Pearson (2000) ранее). Другой предпочтительный алгоритм при сравнении последовательности согласно настоящему изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от различных организмов, представляет собой компьютерную программу BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

Под фразой "терапевтически эффективное количество" подразумевают количество, которое производит требуемый эффект, для которого его вводят. Точное количество будет зависеть от цели лечения и его сможет определить специалист в настоящей области техники с использованием известных техник (см., например, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Используемый в настоящем документе термин "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, нуждающемуся в облегчении, профилактике и/или лечении заболевания или нарушения, такого как хроническая вирусная инфекция, злокачественная опухоль или аутоиммунное заболевание.

Используемый в настоящем документе термин "противораковое лекарственное средство" означает любое средство, применимое для лечения злокачественной опухоли, включая в себя без ограничения цитотоксины и такие средства, как антиметаболиты, алкилирующие средства, антрациклины, антибиотики-

ки, антимитотические средства, прокарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, кортикостероиды, митотан (O,P'-(DDD)), интерфероны и радиоактивные средства. Используемый в настоящем документе термин "цитотоксин или цитотоксическое средство" означает любое средство, которое является вредным для клеток. Примеры включают в себя Taxol® (паклитаксел), цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митоминин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрацидин, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин и их аналоги или гомологи.

Используемый в настоящем документе термин "противовирусное лекарственное средство" относится к любому лекарственному средству или терапии, используемым для лечения, профилактики или облегчения вирусной инфекции у субъекта - хозяина. Термин "противовирусное лекарственное средство" включает в себя без ограничения зидовудин, ламивудин, абакавир, рибавирин, лопинавир, эфавиренз, кобицистат, тенофовир, рилпивирин, болеутоляющие средства и кортикостероиды. В контексте настоящего изобретения вирусные инфекции включают в себя длительные или хронические инфекции, вызванные вирусами, включая в себя без ограничения вирус иммунодефицита человека (HIV), вирус гепатита В (HBV), вирус гепатита С (HCV), вирус папилломы человека (HPV), вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) и вирус иммунодефицита обезьян (SIV).

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению специфически связываются с PD-L1 и модулируют взаимодействие PD-L1 с PD-1 или с B7-1. Антитела к PD-L1 может связываться с PD-L1 с высокой аффинностью или с низкой аффинностью. Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению представляют собой блокирующие антитела, причем антитела связываются с PD-L1 и блокируют взаимодействие PD-L1 с PD-1 или с B7-1. Согласно определенным вариантам осуществления блокирующие антитела согласно настоящему изобретению блокируют связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1 и/или стимулируют или усиливают Т-клеточную активацию. Согласно определенным вариантам осуществления блокирующие антитела являются применимыми для стимуляции или усиления иммунного ответа и/или для лечения субъекта, страдающего от злокачественной опухоли или хронической вирусной инфекции. Антитела при введении нуждающемуся в этом субъекту могут снижать хроническую инфекцию, вызванную таким вирусом, как HIV, LCMV или HBV, у субъекта. Их можно использовать для ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта. Их можно использовать отдельно или в качестве вспомогательной терапии с другими терапевтическими фрагментами или модальностями, известными в настоящей области техники для лечения злокачественной опухоли или вирусной инфекции. Согласно определенным вариантам осуществления антитела к PD-L1, которые связываются с PD-L1 с низкой аффинностью, используют в качестве мультиспецифических антигенсвязывающих молекул, причем первая специфичность связывания связывается с PD-L1 с низкой аффинностью, и вторая специфичность связывания связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из другого эпитопа PD-L1, Т-клеточного соингибитора, такого как PD-1, опухоль-специфический антиген и специфический для инфицированной клетки антиген.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению агонистические антитела, причем антитела связываются с PD-L1 и усиливают взаимодействие PD-L1 и PD-1/B7-1. Согласно определенным вариантам осуществления активирующие антитела усиливают связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1 и/или ингибируют или подавляют Т-клеточную активацию. Активирующие антитела согласно настоящему изобретению могут быть применимыми для ингибирования иммунного ответа у субъекта и/или для лечения аутоиммунного заболевания.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела к PD-L1 представляют собой мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы, причем они содержат первую специфичность связывания с PD-L1 и вторую специфичность связывания с антигеном, выбранным из группы, состоящей из другого эпитопа PD-L1, Т-клеточного соингибитора, такого как PD-1, опухоль-специфический антиген и специфический для инфицированной клетки антиген. Согласно определенным вариантам осуществления первая специфичность связывания связывается с PD-L1 с низкой аффинностью, например с K_D , составляющей 10^{-8} М, 10^{-7} М или больше.

Определенные антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению способны связываться и нейтрализовать активность PD-L1, что определяют с помощью *in vitro* или *in vivo* анализов. Способность антител согласно настоящему изобретению связывать и нейтрализовать активность PD-L1 можно измерить с использованием любого стандартного способа, известного специалистам в настоящей области техники, включая в себя анализы связывания или анализы определения активности, описанные в настоящем документе.

Неограничивающие, иллюстративные *in vitro* анализы для измерения активности связывания проиллюстрированы в примере 3 в настоящем документе. В примере 3 аффинности связывания и кинетические константы антител к PD-L1 человека для PD-L1 человека и PD-L1 яванского макака определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса и измерения проводили на приборе T200 Biacore. В примерах 4 и 5 анализы блокирования использовали для определения способности антител к PD-L1 блокировать PD-L1-связывающую способность PD-1 или связывающую способность с B7-1 *in vitro*. В примере 6 анализы блокирования использовали для определения перекрестной конкуренции между различ-

ными антителами к PD-L1. В примере 7 описано связывание антител с клетками, избыточно экспрессирующими PD-L1. В примере 8 люциферазный анализ использовали для определения способности антител к PD-L1 противодействовать передаче сигнала PD-1/PD-L1 в Т-клетках.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению способны усиливать или стимулировать Т-клеточную активацию *in vitro* и у субъекта со злокачественной опухолью или у субъекта, инфицированного таким вирусом, как LCMV. Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению используют в комбинации со вторым терапевтическим средством, таким как антитело к опухоль-специфическому антигену или Т-клеточному соингибитору, чтобы усиливать иммунный ответ и ингибировать рост опухоли у субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления агонистические антитела согласно настоящему изобретению способны усиливать связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1 и могут ингибировать Т-клеточную активацию *in vitro* и/или у субъекта с аутоиммунным заболеванием.

Антитела, специфические в отношении PD-L1, могут не содержать никаких дополнительных меток или фрагментов или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. Согласно одному варианту осуществления метка или фрагмент представляет собой биотин. В анализе связывания расположение метки (если она присутствует) может определить ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевую биотин, будет ориентироваться так, что C-концевая часть пептида будет удалена от поверхности. Согласно одному варианту осуществления метка может представлять собой радиоактивный изотоп, флуоресцентный краситель или MRI-обнаруживаемую метку. Согласно определенным вариантам осуществления такие меченые антитела можно использовать в диагностических анализах, включая в себя анализы полученных изображений.

Антигенсвязывающие фрагменты антител

Если иное не указано особо, используемый в настоящем документе термин "антитело" следует понимать как включающий молекулы антител, содержащие две тяжелых цепи иммуноглобулина и две легких цепи иммуноглобулина (т.е. "полные молекулы антитела"), а также их антигенсвязывающие фрагменты. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и подобное включают в себя любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывается с антигеном с образованием комплекса. Используемые в настоящем документе термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела или "фрагмент антитела" относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с PD-L1. Фрагмент антитела может включать в себя фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fv, фрагмент dAb, фрагмент, содержащий CDR, или выделенную CDR. Согласно определенным вариантам осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептиду или его фрагменту мультиспецифической антигенсвязывающей молекулы. Согласно таким вариантам осуществления термин "антигенсвязывающий фрагмент" включает в себя, например, внеклеточный домен PD-1, который специфически связывается с PD-L1. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получить, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных техник, таких как обработка протеолитическими ферментами или рекомбинантные техники генной инженерии, включающие в себя манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующую вариабельные и (необязательно) константные домены антитела. Такая ДНК является известной и/или легко доступной, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая в себя, например, библиотеки фагов-антител), или ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и провести с ней химически манипуляции или использовать техники молекулярной биологии, например, для расположения одного или нескольких вариабельных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию, или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или делеции аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают в себя следующее: (i) фрагменты Fab; (ii) фрагменты F(ab')₂; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как пептид CDR3), или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, CDR-привитые антитела, диатела, триатела, тетратела, мини-антитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтическое средство на основе модульного белка малого размера (SMIP) и вариабельные домены IgNAR акулы, также предусмотрены в пределах используемого в настоящем документе выражения "антигенсвязывающий фрагмент".

Антигенсвязывающий фрагмент антитела будет, как правило, содержать по меньшей мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может характеризоваться любым размером или аминокислотным составом и, как правило, будет содержать по меньшей мере одну CDR, которая является смежной или находится в одной рамке считывания с одной или несколькими каркасными последовательностями.

В антигенсвязывающих фрагментах, характеризующихся доменом V_H , связанным с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены друг относительно друга в любом подходящем расположении. Например, вариабельная область может являться димерной и содержать димеры $V_H - V_H$, $V_H - V_L$ или $V_L - V_L$. Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

Согласно определенным вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. Неограничивающие, иллюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые можно обнаружить в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению, включают в себя: (i) V_H-C_H1 ; (ii) V_H-C_H2 ; (iii) V_H-C_H3 ; (iv) $V_H-C_H1-C_H2$; (v) $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$; (vi) $V_H-C_H2-C_H3$; (vii) V_H-C_L ; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2 ; (x) V_L-C_H3 ; (xi) $V_L-C_H1-C_H2$; (xii) $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$; (xiii) $V_L-C_H2-C_H3$ и (xiv) V_L-C_L . В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, включая в себя любая перечисленные выше иллюстративные конфигурации, вариабельные и константные домены могут быть либо напрямую соединены друг с другом, либо могут быть соединены с помощью полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые дают в результате гибкое или полугибкое соединение между смежными вариабельным и/или константным доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно настоящему изобретению могут содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций вариабельных и константных доменов, перечисленных выше, в нековалентном соединении друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, с помощью дисульфидной(ых) связи(ей)).

Аналогично полным молекулам антител антигенсвязывающие фрагменты могут являться моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела будет, как правило, содержать по меньшей мере два различных вариабельных домена, причем каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с различным эпитопом на одном и том же антигене. Любой мультиспецифический формат антител, включая в себя иллюстративные биспецифические форматы антител, раскрытые в настоящем документе, может быть адаптирован для применения в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела согласно настоящему изобретению с использованием рутинных техник, доступных в настоящей области техники.

Получение антител человека

В настоящей области техники известны способы получения антител человека в организме трансгенных мышей. Любые такие известные способы можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения антител человека, которые специфически связываются с PD-L1.

Иммуноген, содержащий любое одно из следующего, можно использовать для получения антител к PD-L1. Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению получают от мышей, иммунизированных первичным иммуногеном, таким как полноразмерный PD-L1 [см. регистрационный номер GenBank NP_054862.1 (SEQ ID NO: 351)], или рекомбинантной формой PD-L1 или модифицированными фрагментами PD-L1 человека (SEQ ID NO: 345, 347 или 348) или модифицированными фрагментами PD-L1 яванского макака (SEQ ID NO: 346), с последующей иммунизацией вторичным иммуногеном или иммуногенно активным фрагментом PD-L1.

Согласно определенным вариантам осуществления иммуноген может представлять собой пептид из N-концевой или C-концевой области PD-L1. Согласно одному варианту осуществления иммуноген представляет собой внеклеточный IgV-подобный и/или IgC-подобный домен PD-L1. Согласно определенным вариантам осуществления согласно настоящему изобретению иммуноген представляет собой фрагмент PD-L1, который находится в диапазоне аминокислотных остатков приблизительно 19 - 239 SEQ ID NO: 351 (NP_054862.1).

Согласно определенным вариантам осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный пептид PD-L1, экспрессированный в *E. coli* или в любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO).

Согласно определенным вариантам осуществления антитела, которые специфически связываются с PD-L1, можно получить с использованием фрагментов вышеперечисленных областей или пептидов, которые выходят за пределы обозначенных областей приблизительно на 5 - приблизительно 20 аминокислотных остатков от любого или обоих из N- или C-конца областей, описанных в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления любую комбинацию вышеперечисленных областей или их фрагментов можно использовать в получении специфических антител PD-L1.

С использованием технологии VELOCIMMUNE® (см., например, патент США № 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моноклональных антител, вначале выделяют химерные антитела к PD-L1 с высокой аффинностью, характеризующиеся вариабельной областью человека и константной областью мыши. Технология VELOCIM-

MUNE® предусматривает получение трансгенной мыши, характеризующейся геномом, содержащим переменные области тяжелой и легкой цепи человека, функционально связанные с эндогенными локусами константной области мыши, так что в ответ на антигенную стимуляцию мышь производит антитело, содержащее переменную область человека и константную область мыши. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с кДНК, кодирующей константные области тяжелой и легкой цепи человека. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Биоэквиваленты

Антитела к PD-L1 и фрагменты антител согласно настоящему изобретению включают в себя белки, характеризующиеся аминокислотными последовательностями, которые отличаются от таковых в описанных антителах, но которые сохраняют способность связываться с PD-L1. Такие варианты антител и фрагменты антител содержат одну или несколько вставок, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая является по существу эквивалентной биологической активности описанных антител. Аналогично, кодирующие антитело последовательности ДНК согласно настоящему изобретению включают в себя последовательности, которые содержат одну или несколько вставок, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело или фрагмент антитела, который является, по существу, биоэквивалентом антителу или фрагменту антитела согласно настоящему изобретению.

Два антигенсвязывающих белка, или антитела, считаются биоэквивалентными, если, например, они представляют собой фармацевтические эквиваленты или фармацевтические альтернативы, чья скорость и степень абсорбции не демонстрирует значительного различия при введении в одной и той же молярной дозе при сходных экспериментальных условиях, или в однократной дозе, или в многократных дозах. Некоторые антитела будут рассматриваться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они являются эквивалентными в степени своей абсорбции, но не в своей скорости абсорбции, и все еще могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражены в этикетке, не являются значимыми для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при хроническом применении, и считаются медицински незначительными для конкретного исследуемого лекарственного продукта.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если отсутствует клинически значимое различие в их безопасности, чистоте или эффективности.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациент может переключиться один или несколько раз с эталонного продукта на биологический продукт без прогнозируемого увеличения риска неблагоприятных эффектов, включая в себя клинически значимое изменение иммуногенности, или пониженная эффективность, по сравнению с непрерывной терапией без такого переключения.

Согласно одному варианту осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют посредством общего механизма или механизмов действия для условий или условий применения, в той степени, в которой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность можно продемонстрировать с помощью *in vivo* и/или *in vitro* способов. Параметры биоэквивалентности включают в себя, например, (a) *in vivo* испытание на людях или других млекопитающих, в котором концентрацию антитела или его метаболитов измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функцию от времени; (b) *in vitro* испытание, которое соотносит с *in vivo* данными биодоступности в отношении человека и которое является достаточно прогнозическим в отношении этих данных; (c) *in vivo* испытание на людях или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряют как функцию от времени; и (d) в хорошо контролируемом клиническом испытании, которое устанавливает безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител согласно настоящему изобретению можно сконструировать, например, путем создания различных замен остатков или последовательностей или делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, не являющихся необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно удалить или заменить другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных межмолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать в себя варианты антител, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Антитела к PD-L1, содержащие варианты Fc

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения предусмотрены антитела к PD-L1, содержащие домен Fc, содержащий одну или несколько мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислотном значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к

PD-L1, содержащие мутацию в области C_H2 или C_H3 домена Fc, причем мутация(и) увеличивает(ют) аффинность домена Fc по отношению к FcRn в кислом окружении (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут приводить к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают в себя, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. Согласно одному варианту осуществления модификация содержит модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254, и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). Согласно еще одному варианту осуществления модификация содержит модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к PD-L1, содержащие домен Fc, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из следующего: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Согласно одному варианту осуществления согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к PD-L1, содержащие домен Fc, содержащий мутацию S108P в шарнирной области IgG4 для стимуляции стабилизации димера. Все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций домена Fc и другие мутации в пределах варьируемых доменов антител, раскрытых в настоящем документе, предусмотрены в пределах объема настоящего изобретения.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела к PD-L1, содержащие химерную константную (C_H) область тяжелой цепи, причем химерная область C_H содержит сегменты, происходящие из областей C_H больше чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела согласно настоящему изобретению могут содержать химерную область C_H, содержащую часть или весь домен C_H2, происходящий из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, комбинированную с частью или всем доменом C_H3, происходящим из молекулы IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению содержат химерную область C_H, характеризующуюся химерной шарнирной областью. Например, химерный шарнир может содержать "верхнюю шарнирную" аминокислотную последовательность (аминокислотные остатки от положений 216 до 227 согласно нумерации EU), происходящую из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека, комбинированную с "нижней шарнирной" последовательностью (аминокислотные остатки от положений 228 до 236 согласно нумерации EU), происходящую из шарнирной области IgG1 человека, IgG2 человека или IgG4 человека. Согласно определенным вариантам осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, происходящие из верхнего шарнира IgG1 человека или IgG4 человека, и аминокислотные остатки, происходящие из нижнего шарнира IgG2 человека. Антитело, содержащее химерную область C_H согласно описанию в настоящем документе, может согласно определенным вариантам осуществления проявлять модифицированные эффекторные функции Fc, не оказывая неблагоприятного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, USSN. 14/170166, поданную 31 января 2014 г., полное раскрытие которой тем самым включено в настоящий документ посредством ссылки).

Биологические характеристики антител

В общем, антитела согласно настоящему изобретению функционируют путем связывания с PD-L1. Согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к PD-L1 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают растворимые мономерные или димерные молекулы PD-L1 с высокой аффинностью. Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают мономерный PD-L1 (например, при 25°C или при 37°C) с K_D, составляющей меньше чем приблизительно 318 пМ согласно измерению с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают мономерный PD-L1 с K_D, составляющей меньше чем приблизительно 300 пМ, меньше чем приблизительно 250 пМ, меньше чем приблизительно 150 пМ, меньше чем приблизительно 100 пМ, или меньше чем приблизительно 50 пМ, согласно измерению с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или, по существу, сходного анализа.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают димерный PD-L1 (например, при 25 или при 37°C) с K_D, составляющей

меньше чем приблизительно 15 пМ согласно измерению с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают димерный PD-L1 с K_D , составляющей меньше чем приблизительно 12 пМ, меньше чем приблизительно 10 пМ, меньше чем приблизительно 8 пМ или меньше чем приблизительно 5 пМ, согласно измерению с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или по существу сходного анализа.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с PD-L1 яванского макака (*Macaca fascicularis*) (например, при 25°C или при 37°C) с K_D , составляющей меньше чем приблизительно 28 нМ согласно измерению с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с PD-L1 яванского макака с K_D , составляющей меньше чем приблизительно 25 нМ, меньше чем приблизительно 20 нМ, меньше чем приблизительно 15 нМ, меньше чем приблизительно 10 нМ или меньше чем приблизительно 5 нМ, согласно измерению с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или по существу сходного анализа.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с PD-L1 с диссоциационным периодом полувыведения ($t^{1/2}$), составляющим больше чем приблизительно 1 мин согласно измерению с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе, или по существу сходного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению связывают PD-L1 с $t^{1/2}$, составляющим больше чем приблизительно 5 мин, больше чем приблизительно 10 мин, больше чем приблизительно 30 мин, больше чем приблизительно 50 мин, больше чем приблизительно 60 мин, больше чем приблизительно 70 мин, больше чем приблизительно 80 мин, больше чем приблизительно 90 мин, больше чем приблизительно 100 мин, больше чем приблизительно 200 мин, больше чем приблизительно 300 мин, больше чем приблизительно 400 мин, больше чем приблизительно 500 мин, больше чем приблизительно 600 мин, больше чем приблизительно 700 мин или больше чем приблизительно 800 мин, согласно измерению с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, с использованием формата анализа, определенного в примере 3 в настоящем документе (например, формат захвата mAb или захвата антигена), или по существу сходного анализа.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют связывание PD-L1 с PD-1 с IC_{50} , составляющей меньше чем приблизительно 770 пМ согласно определению с использованием иммуноанализа на основе ELISA, например, как показано в примере 4, или по существу сходного анализа. Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые блокируют связывание PD-L1 с B7-1 с IC_{50} , составляющей меньше чем приблизительно 10 нМ согласно определению с использованием иммуноанализа на основе ELISA, например, как показано в примере 4, или, по существу, сходного анализа. Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с PD-L1 и усиливают связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению могут связываться с внеклеточным доменом PD-L1 или с фрагментом домена. Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению могут связываться больше чем с одним доменом (перекрестнореагирующие антитела). Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению могут связываться с эпитопом, расположенным во внеклеточном домене, содержащем аминокислотные остатки 19-239 NP_054862.1 (SEQ ID NO: 351). Согласно определенным вариантам осуществления антитела могут связываться с эпитопом, содержащим одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 1-221 SEQ ID NO: 345-348 или 353.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению могут функционировать путем блокирования или ингибирования PD-1-связывающие или B7-1-связывающей активности, связанной с PD-L1, путем связывания с любой другой областью или фрагментом полноразмерного белка, аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID NO: 351. Согласно определенным вариантам осуществления антитела могут ослаблять или модулировать взаимодействие между PD-L1 и PD-1/B7-1.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению могут представлять собой биспецифические антитела. Биспецифические антитела согласно настоящему изобретению могут связывать один эпитоп в одном домене и могут также связывать второй эпитоп в другом домене PD-L1. Согласно определенным вариантам осуществления биспецифические антитела согласно настоящему изобретению могут связывать два различных эпитопа в одном и том же домене. Согласно одному варианту осуществления мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содер-

жит первую антигенсвязывающую специфичность, причем первая специфичность связывания содержит внеклеточный домен или его фрагмент PD-1; и вторую антигенсвязывающую специфичность по отношению к другому эпитопу PD-L1. Согласно другому варианту осуществления мультиспецифическая антигенсвязывающая молекула содержит первую антигенсвязывающую специфичность, причем первая специфичность связывания содержит внеклеточный домен или его фрагмент B7-1 и вторую антигенсвязывающую специфичность по отношению к другому эпитопу PD-L1.

Согласно одному варианту осуществления согласно настоящему изобретению предусмотрено полностью человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с PD-L1, причем антитело или его фрагмент проявляет одну или несколько следующих характеристик: (i) содержит HCVR, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 186, 202, 218, 234, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 306, 314, 322, 330 и 338, или, по существу, сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (ii) содержит LCVR, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 194, 210, 226, 242, 258 и 274, или по существу сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (iii) содержит домен HCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 280, 288, 296, 304, 312, 320, 328, 336 и 344, или по существу сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен LCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 200, 216, 232, 248, 264 и 280, или, по существу, сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (iv) содержит домен HCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 292, 300, 308, 316, 324, 332 и 340, или, по существу, сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен HCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 294, 302, 310, 318, 326, 334 и 342, или по существу сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен LCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 196, 212, 228, 244, 260 и 276, или по существу сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен LCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 198, 214, 230, 246, 262 и 278, или, по существу, сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (v) представляет собой мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую первую специфичность связывания с PD-L1 и вторую специфичность связывания с антигеном, выбранным из группы, состоящей из PD-L1, опухолевоспецифического антигена, антигена инфицированной вирусом клетки и Т-клеточного соингибитора; (vi) связывается с PD-L1 человека с K_D , составляющей приблизительно 4 пМ - приблизительно 645 нМ; (vii) связывается с PD-L1 яванского макака с K_D , составляющей приблизительно 70 пМ - приблизительно 400 нМ; (viii) блокирует или усиливает связывание PD-L1 с PD-1 с $IC_{50} \leq 770$ пМ; (ix) блокирует или усиливает связывание PD-L1 с B7-1 с $IC_{50} \leq 10$ нМ; (x) блокирует индуцированную PD-1 Т-клеточную отрицательную регуляцию и/или восстанавливает Т-клеточную передачу сигнала в анализе репортерного гена люциферазы в Т-клетках/APC; (xi) стимулирует Т-клеточную пролиферацию и активность в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR); (xii) индуцирует продукцию IL-2 и/или IFN γ в анализе MLR и (xiii) подавляет рост опухоли и увеличивает выживаемость у субъектов со злокачественной опухолью.

Согласно одному варианту осуществления согласно настоящему изобретению предусмотрено полностью человеческое моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который блокирует связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1, причем антитело или его фрагмент проявляет одну или несколько следующих характеристик: (i) содержит HCVR, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82, 98, 146, 162, 290, 306, 314 и 330, или по существу сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей

мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (ii) содержит LCVR, характеризующуюся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 90, 106, 154, 170 и 274, или, по существу, сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (iii) содержит домен HCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 88, 104, 152, 168, 296, 312, 320 и 336 или, по существу, сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен LCDR3, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 96, 112, 160, 176, и 280, или, по существу, сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (iv) содержит домен HCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 84, 100, 148, 164, 292, 308, 316 и 332, или, по существу, сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен HCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 86, 102, 150, 166, 294, 310, 318 и 334, или, по существу, сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; домен LCDR1, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 92, 108, 156, 172 и 276, или, по существу, сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; и домен LCDR2, характеризующийся аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 94, 110, 158, 174 и 278, или по существу сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности; (v) представляет собой мультиспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую первую специфичность связывания с PD-L1 и вторую специфичность связывания с антигеном, выбранным из группы, состоящей из другого эпитопа PD-L1, опухоль-специфического антигена, антигена инфицированной вирусом клетки и Т-клеточного соингибитора; (vi) связывается с PD-L1 человека с $K_D \leq 10^{-10} \text{M}$; (vii) связывается с PD-L1 яванского макака с $K_D \leq 10^{-7} \text{M}$; (viii) блокирует связывание PD-L1 с PD-1 или с B7-1; (ix) индуцированную PD-1 Т-клеточную отрицательную регуляцию и/или восстанавливает Т-клеточную передачу сигнала в анализе репортерного гена люциферазы в Т-клетках/APC; (xi) стимулирует Т-клеточную пролиферацию и активность в анализе реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR); (xii) индуцирует продукцию IL-2 и/или IFN γ в анализе MLR и (xiii) подавляет рост опухоли и увеличивает выживаемость у субъектов со злокачественной опухолью.

Антитела согласно настоящему изобретению могут обладать одной или несколькими вышеупомянутыми биологическими характеристиками или любыми их комбинациями. Другие биологические характеристики антител согласно настоящему изобретению станут очевидными специалисту в настоящей области техники из обзора настоящего раскрытия, включая в себя рабочие примеры в настоящем документе.

Видовая селективность и видовая перекрестная реактивность

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения антитела к PD-L1 связываются с PD-L1 человека, но не с PD-L1 от другого вида. Альтернативно, антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению согласно определенным вариантам осуществления связываются с PD-L1 человека и с PD-L1 от одного или нескольких не относящихся к человеку видов. Например, антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению могут связываться с PD-L1 человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от ситуации, с одним или несколькими из PD-L1 мыши, крысы, морской свинки, хомячка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, макака-резуса или шимпанзе. Согласно определенным вариантам осуществления антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению могут связываться с PD-L1 человека и яванского макака с одинаковыми аффинностями или с различными аффинностями.

Эпитопное картирование и связанные с ним технологии

Согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к PD-L1, которые взаимодействуют с одной или несколькими аминокислотами, встречающимися в пределах одного или нескольких доменов молекулы PD-L1, включая в себя, например, внеклеточный (IgV-подобный) домен, внеклеточный IgC-подобный домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Эпитоп, с которым связываются антитела, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше) аминокислот, расположенных в пределах любого из вышеупомянутых доменов молекулы PD-L1 (например, линейный эпитоп в домене). Альтернативно, эпитоп может состоять из множества не смежных аминокислот (или аминокислотных последо-

тельностью), расположенных в пределах любого или обоих из вышеупомянутых доменов молекулы PD-L1 (например, конформационный эпитоп).

Различные техники, известные специалистам в настоящей области техники, можно использовать для определения того, "взаимодействует ли антитело с одной или несколькими аминокислотами" в пределах полипептида или белка. Иллюстративные техники включают в себя, например, рутинные анализы перекрестного блокирования, такие как техники, описанные в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Другие способы включают в себя анализ на основе аланинового сканирования мутантов, пептидный блоттинг (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), кристаллографические исследования в анализе расщепления пептидов и анализ ЯМР. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Другой способ, который можно использовать для идентификации аминокислот в пределах полипептида, с которым взаимодействует антитело, представляет собой обмен водорода на дейтерий, обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии. В общих чертах, способ обмена водорода на дейтерий предусматривает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антителом с меченным дейтерием белком. Далее комплекс белок/антитело переносят в воду и способные к обмену части в пределах аминокислот, которые защищены комплексом антитела, подвергаются обратному обмену дейтерия на водород при скорости, более медленной, чем способные к обмену части в пределах аминокислот, которые не являются частью границы раздела. В результате аминокислоты, которые образуют часть границы раздела белок/антитело, могут сохранять дейтерий и, следовательно, проявляют относительно повышенную массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в границу раздела. После диссоциации антитела целевой белок подвергают протеазному расщеплению и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

Термин "эпитоп" относится к сайту антигена, на который реагируют В и/или Т-клетки. Эпитопы В-клеток могут быть образованы как непрерывной последовательностью аминокислот, так и разрозненными аминокислотами, оказавшимися в требуемом взаимном положении в результате укладки белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные непрерывной последовательностью аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, возникшие в результате укладки белка в третичную структуру, разрушаются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, формируется по крайней мере 3, а обычно по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислотами в уникальной пространственной конформации.

Определение профиля с помощью модификации (MAP), также известное как определение профиля антител на основе структуры антигена (ASAP), представляет собой метод классификации большого числа моноклональных антител (mAb) к одному и тому же антигену в соответствии со сходствами профиля связывания каждого антитела с химически или ферментативно модифицированными антигенными поверхностями (см. US 2004/0101920, полностью включенную в настоящий документ посредством ссылки). Каждая категория может отражать уникальный эпитоп, который либо четко отличается от эпитопа, представленного в любой другой категории, либо частично перекрывается с ним. Подобная технология позволяет быстро отделять генетически идентичные антитела, так что их идентификация может быть сконцентрирована на генетически отличающихся антителах. В случае применения для скрининга гибридомы, MAP может способствовать идентификации редких клонов гибридомы, производящих mAbs с нужными характеристиками. MAP можно использовать для сортировки антител согласно настоящему изобретению в группы антител, связывающихся с различными эпитопами.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела к PD-L1 или их антигенсвязывающие фрагменты связывают эпитоп в пределах любой одной или нескольких областей, иллюстративно представленных в PD-L1, либо в натуральной форме, как иллюстративно представлено в SEQ ID NO: 351, либо полученных рекомбинантно, как иллюстративно представлено в SEQ ID NO: 345-348, или его фрагмент. Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению связываются с внеклеточной областью, содержащей одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 19-239 PD-L1. Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению связываются с областью, содержащей одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков 1-221 PD-L1 яванского макака, как иллюстративно представлено в SEQ ID NO: 346.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению, как показано в табл. 1, взаимодействуют по меньшей мере с одной аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 19 до приблизительно положения 130 SEQ ID NO: 351; или аминокислота остатками находящимися в диапазоне от приблизительно положения 130 до приблизительно положения 153 SEQ ID NO: 351; или аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 153 до приблизительно положения 210 SEQ ID NO: 351; или аминокислотных остатков, находящихся в диапазоне от приблизительно положения 210 до приблизительно положения 239 SEQ ID NO: 351. Ука-

занные области частично иллюстративно представлены в SEQ ID NO: 345 - 348.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к PD-L1, которые связываются с тем же эпитопом или частью эпитопа, что и любое из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе в табл. 1, или антитело, характеризующееся последовательностями CDR любого из иллюстративных антител, описанных в табл. 1. Аналогично, согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела к PD-L1, которые конкурируют за связывание с PD-L1 или фрагмент PD-L1 с любым из конкретных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе в табл. 1, или антителом, характеризующимся последовательностями CDR любого из иллюстративных антител, описанных в табл. 1. Например, согласно настоящему изобретению предусмотрены антитела к PD-L1, которые перекрестно конкурируют за связывание с PD-L1 с одним или несколькими антителами, определенными в примере 6 в настоящем документе (например, H2aM8309N, H1H9329P, H1H9336P, H2aM8314N, H2aM8316N, H2aM8718N, H1H9387P2, H1H9351P2, H1H9364P2, H1H9373P2 и H2aM8306N). Согласно настоящему изобретению также предусмотрены антитела к PD-L1, которые перекрестно конкурируют за связывание с PD-L1 с одним или несколькими антителами, определенными в примере 6 в настоящем документе (например, H1H9396P2, H2aM8317N, H2aM8321N, H1H9323P, H1H9382P2, H1H9344P2, H1H9345P2 и H1H9354P2).

Можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело или конкурирует за связывание с эталонным антителом к PD-L1 с использованием рутинных способов, известных в настоящей области техники. Например, для определения того, связывается ли исследуемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к PD-L1 согласно настоящему изобретению, позволяют эталонному антителу связаться с белком или пептидом PD-L1 в насыщающих условиях. Далее оценивают способность исследуемого антитела связываться с PD-L1 молекулой. Если исследуемое антитело способно связываться с PD-L1 после связывания в насыщающих условиях с эталонным антителом к PD-L1, можно сделать вывод, что исследуемое антитело связывается с другим эпитопом, чем эталонное антитело к PD-L1. С другой стороны, если исследуемое антитело не способно связываться с белком PD-L1 после связывания в насыщающих условиях с эталонным антителом к PD-L1, то исследуемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный эталонным антителом к PD-L1 согласно настоящему изобретению.

Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание с эталонным антителом к PD-L1, вышеописанную методологию связывания проводят в двух направлениях: в первом направлении позволяют эталонному антителу связаться с белком PD-L1 в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания исследуемого антитела с молекулой PD-L1. Во втором направлении позволяют исследуемому антителу связываться с молекулой PD-L1 в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой PD-L1. Если в обоих направлениях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой PD-L1, то делают вывод, что исследуемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с PD-L1. Как будет понятно специалисту в настоящей области техники, антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, может не обязательно связываться с эпитопом, идентичным эпитопу эталонного антитела, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела путем связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа.

Две антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. Иными словами, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже на 99% согласно измерению в анализе конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990 50:1495-1502). Альтернативно, две антитела характеризуются одинаковым эпитопом, если по существу все аминокислотные мутации в антигене, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого. Два антитела характеризуются перекрывающимися эпитопами, если некоторые аминокислотные мутации, которые снижают или устраняют связывание одного антитела, снижают или устраняют связывание другого.

Дополнительное рутинное экспериментирование (например, анализы пептидных мутаций и связывания) затем можно провести для подтверждения того, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания исследуемого антитела обусловлено связыванием с тем же эпитопом, что и эталонное антитело или того, отвечает ли стерическое блокирующее (или другое явление) за отсутствие наблюдаемого связывания. Эксперименты такого типа можно провести с использованием ELISA, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, доступного в настоящей области техники.

Иммуноконъюгаты

Изобретение предусматривает моноклональное антитело к PD-L1 человека, конъюгированное с терапевтическим фрагментом ("иммуноконъюгат"), таким как цитотоксин или химиотерапевтическое средство для лечения злокачественной опухоли. Используемый в настоящем документе термин "иммуноконъюгат" относится к антителу, которое химически или биологически соединено с цитотоксином, радиоактивным средством, цитокином, интерфероном, фрагментом мишени или репортера, ферментом, токсином, пептидом или белком или терапевтическим средством. Антитело может быть соединено с ци-

тотоксином, радиоактивным средством, цитокином, интерфероном, фрагментом мишени или репортера, ферментом, токсином, пептидом или терапевтическим средством в любой положении вдоль молекулы при условии, что оно способно связываться со своей мишенью. Примеры иммуноконъюгатов включают в себя конъюгаты антитела с лекарственным средством и белки слияния антитела и токсина. Согласно одному варианту осуществления средство может представлять собой второе отличающееся антитело к PD-L1. Согласно определенным вариантам осуществления антитело может быть конъюгировано со средством, специфическим в отношении опухолевой клетки или инфицированной вирусом клетки. Тип терапевтического фрагмента, который может быть конъюгирован с антителом к PD-L1, будет принимать во внимание подлежащее лечению состояние и требуемый терапевтический эффект, который необходимо достичь. Примеры подходящих средств для образования иммуноконъюгатов известны в настоящей области техники; см., например, международную патентную публикацию WO 05/103081.

Мультиспецифические антитела

Антитела согласно настоящему изобретению могут являться моноспецифическими, биспецифическими или мультиспецифическими.

Мультиспецифические антитела могут являться специфическими в отношении различных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении более одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

Согласно одному аспекту согласно настоящему изобретению предусмотрены мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или их антигенсвязывающие фрагменты, причем одна антигенсвязывающая специфичность иммуноглобулина является специфической в отношении эпитопа в пределах внеклеточного домена PD-L1 (например, в IgV-подобной области), или его фрагмента, а другая антигенсвязывающая специфичность иммуноглобулина является специфической в отношении связывания с другим эпитопом во внеклеточном домене PD-L1 (например, в IgC-подобной области), или второй терапевтической мишенью, или конъюгирована с терапевтическим фрагментом. Согласно определенным вариантам осуществления первая антигенсвязывающая специфичность может содержать PD-1 или B7-1 или его фрагмент. Согласно одному варианту осуществления первая антигенсвязывающая специфичность, которая связывается с PD-L1, содержит внеклеточный домен PD-1. Согласно определенным вариантам осуществления согласно настоящему изобретению одна антигенсвязывающая специфичность иммуноглобулина является специфической в отношении эпитопа в пределах аминокислотных остатков 19-239 PD-L1 (SEQ ID NO: 351) или его фрагмента, и другая специфичность иммуноглобулина является специфической в отношении второго целевого антигена. Второй целевой антиген может находиться на той же клетке, что и PD-L1 или на другой клетке. Согласно одному варианту осуществления вторая целевая клетка находится на иммунной клетке, отличной от Т-клетки, такой как В-клетка, антигенпрезентирующая клетка, моноцит, макрофаг или дендритная клетка. Согласно определенным вариантам осуществления второй целевой антиген может присутствовать на опухолевой клетке или на инфицированной вирусом клетке.

Согласно другому аспекту согласно настоящему изобретению предусмотрены мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие первую антигенсвязывающую специфичность, которая связывается с PD-L1, и вторую антигенсвязывающую специфичность, которая специфически связывается с целевым антигеном на опухолевой клетке. Согласно различным вариантам осуществления опухоль-специфический антиген представляет собой один из следующего: CA9, CA125, ассоциированный с меланомой антиген (MAGE), карциноэмбриональный антиген (CEA), виментин, tumor-M2-PK, простатический специфический антиген (PSA), MART-1 или CA19-9. Неограничивающие примеры других специфических ассоциированных с опухолью антигенов включают в себя, например, AFP, ALK, белки BAGE, β -катенин, bcr-abl, BRCA1, BORIS, карбоангидраза IX, каспаза-8, CCR5, CD19, CD20, CD30, CD40, CDK4, CTLA4, циклин-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, белки GAGE (например, GAGE-1, -2), GD2, GD3, GloboH, глипикан-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, белки MAGE (например, MAGE-1, -2, -3, -4, -6 и -12), HLA-A2, MART-1, мезотелин, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16 (CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ES01, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA (FOLH1), белки RAGE, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, сурвивин, TAG-72, TGF- β , TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, тирозиназа и уроплакин-3. Согласно другим вариантам осуществления вторая антигенсвязывающая специфичность связывается с опухолевым антигеном, который присутствует на опухолевых клетках, специфическим без ограничения в отношении почечноклеточной карциномы, злокачественной опухоли предстательной железы, злокачественной опухоли толстой и прямой кишки, меланомы, злокачественной опухоли молочной железы, злокачественной опухоли почки, злокачественной опухоли яичника и злокачественной опухоли поджелудочной железы. Антитела согласно настоящему изобретению согласно настоящему аспекту могут ингибировать активность PD-L1.

Согласно другому аспекту согласно настоящему изобретению предусмотрены мультиспецифиче-

ские антигенсвязывающие молекулы или их антигенсвязывающие фрагменты, причем вторая антигенсвязывающая специфичность связывается с антигеном, специфическим в отношении инфицированной вирусом клетки. Согласно определенным вариантам осуществления вторая антигенсвязывающая специфичность связывается с антигеном, специфическим в отношении клетки, инфицированной вирусом, выбранным из группы, состоящей из HIV, HBV, HCV, HPV, LCMV и SIV.

Согласно другому аспекту согласно настоящему изобретению предусмотрены мультиспецифические антигенсвязывающие молекулы или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие первую антигенсвязывающую специфичность, которая связывается с PD-L1, и вторую антигенсвязывающую специфичность, которая связывается с T-клеточным соингибитором, таким как PD-1, LAG-3, TIM3, B7-1, CTLA-4, BTLA, CD-28, 2B4, LY108, TIGIT, LAIR1, ICOS и CD160.

Любая из мультиспецифических антигенсвязывающих молекул или их вариантов может быть сконструирована с использованием стандартных техник молекулярной биологии (например, технология рекомбинантной ДНК и экспрессии белка), которые будут хорошо известны специалисту в настоящей области техники.

Согласно определенным вариантам осуществления специфические к PD-L1 антитела создают в биспецифическом формате ("биспецифические"), в котором переменные области, связывающиеся с отдельными доменами PD-L1, соединены вместе для обеспечения двухдоменной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Надлежащим образом разработанные биспецифичности могут усиливать общую ингибирующую PD-L1 эффективность посредством увеличения как специфичности, так и avidности связывания. Переменные области со специфичностью в отношении отдельных доменов (например, сегменты N-концевого домена), или которые могут связываться с различными областями в пределах одного домена, образуют пару на структурном каркасе, что обеспечивает связывание каждой области одновременно с отдельными эпитопами, или с различными областями в пределах одного домена. В одном примере биспецифичности переменные области тяжелой цепи (V_H) из связывающего со специфичностью в отношении одного домена рекомбинируют с переменными областями легкой цепи (V_L) из серии связывающих со специфичностью в отношении второго домена для идентификации некогатных партнеров V_L , которые могут быть спаренными с исходной V_H без разрушения исходной специфичности в отношении этой V_H . Вследствие этого, один сегмент V_L (например, V_{L1}) можно комбинировать с двумя различными доменами V_H (например, V_{H1} и V_{H2}) для создания биспецифических молекул, состоящих из двух связывающих "плечей" (V_{H1} - V_{L1} и V_{H2} - V_{L1}). Использование одного сегмента V_L снижает сложность системы и тем самым упрощает и увеличивает эффективность процессов клонирования, экспрессии и очистки, используемых для создания биспецифических молекул (см., например, USSN13/022759 и US2010/0331527).

Альтернативно, антитела, которые связываются больше чем с одним доменом и второй мишенью, такие как без ограничения, например, второе отличающееся антитело к PD-L1, можно получить в биспецифическом формате с использованием техник, описанных в настоящем документе, или других техник, известных специалистам в настоящей области техники. Переменные области антитела, связывающиеся с отдельными областями, могут быть соединены вместе с переменными областями, которые связываются с релевантными сайтами, например, на внеклеточном домене PD-L1, для обеспечения двухантигенной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Должным образом разработанные биспецифичности указанной природы выполняют двойную функцию. Переменные области со специфичностью в отношении внеклеточного домена комбинируют с переменной областью со специфичностью за пределами внеклеточного домена, и они образуют пару на структурном каркасе, что обеспечивает возможность связывания каждой переменной области с отдельными антигенами.

Иллюстративный биспецифический формат антител, который можно использовать в контексте настоящего изобретения, предусматривает применение первого домена C_{H3} иммуноглобулина (Ig) и второго домена C_{H3} Ig, причем первый и второй домены C_{H3} Ig отличаются друг от друга по меньшей мере на одну аминокислоту, и при этом по меньшей мере различие на одну аминокислоту снижает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, у которого отсутствует различие в аминокислотах. Согласно одному варианту осуществления первый домен C_{H3} Ig связывает белок А, и второй домен C_{H3} Ig содержит мутацию, которая снижает или аннулирует связывание белка А, такую как модификация H95R (согласно нумерации экзонов IMGT; H435R согласно нумерации EU). Второй C_{H3} может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). Дополнительные модификации, которые могут встречаться в пределах второго C_{H3} , включают в себя: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае антител IgG4. Варианты биспецифического формата антител, описанного выше, предусмотрены в пределах объема настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения включают в себя без ограничения, например, биспецифические форматы на основе

scFv или диатело, слияния IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрама, выступы-во-впадины, общая легкая цепь (например, общая легкая цепь с выступами-во-впадины и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, лейциновая молния, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и Mab² биспецифические форматы (см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11 и ссылки, процитированные в ней, для обзора описанных выше форматов). Биспецифические антитела также можно сконструировать с использованием конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, например, причем не встречающиеся в природе аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью используют для создания сайт-специфических конъюгатов антитела с олигонуклеотидами, которые затем подвергаются самосборке в мультимерные комплексы с определенным составом, валентностью и геометрией. (См., например, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Терапевтическое введение и составы

Согласно настоящему изобретению предусмотрены терапевтические композиции, содержащие антитела к PD-L1 или их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению. Терапевтические композиции согласно настоящему изобретению будут вводить с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые включают в составы для обеспечения улучшенной транспортировки, доставки, переносимости и подобного. Множество соответствующих составов можно найти в фармакологическом справочнике, известном всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают в себя, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) инертные носители (такие как LIPOFECTINTM), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсионные карбовоски (полиэтиленгликоли различных молекулярных масс), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовоск. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Доза антитела может варьировать в зависимости от возраста и размера субъекта, которому ее вводят, подлежащего лечению заболевания, состояний, пути введения и подобного. Если антитело согласно настоящему изобретению используют для лечения заболевания или нарушения у взрослого пациента или для профилактики такого заболевания, предпочтительно вводить антитело согласно настоящему изобретению в норме в дозе, составляющей приблизительно 0,1 - приблизительно 100 мг/кг массы тела, более предпочтительно приблизительно 5 - приблизительно 80, приблизительно 10 - приблизительно 60, или приблизительно 20 - приблизительно 50 мг/кг массы тела. В зависимости от тяжести состояния можно отрегулировать частоту и длительность лечения. Согласно определенным вариантам осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению можно вводить в виде начальной дозы, составляющей по меньшей мере приблизительно 0,1 мг - приблизительно 800 мг, приблизительно 1 - приблизительно 500 мг, приблизительно 5 - приблизительно 300 мг или приблизительно 10 - приблизительно 200 мг, до приблизительно 100 мг, или до приблизительно 50 мг. Согласно определенным вариантам осуществления после начальной дозы может следовать введение второй или множества последующих доз антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в количестве, которое может быть приблизительно таким же или меньше чем количество начальной дозы, причем последующие дозы вводят с интервалом, составляющим по меньшей мере 1 день - 3 дня; по меньшей мере одна неделя, по меньшей мере 2 недели; по меньшей мере 3 недели; по меньшей мере 4 недели; по меньшей мере 5 недель; по меньшей мере 6 недель; по меньшей мере 7 недель; по меньшей мере 8 недель; по меньшей мере 9 недель; по меньшей мере 10 недель; по меньшей мере 12 недель или по меньшей мере 14 недель.

Известны различные системы доставки и их можно использовать для введения фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432). Способы введения включают в себя без ограничения интрадермальный, трансдермальный, внутримышечный, интраперитонеальный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например, с помощью инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизистые оболочки (например, слизистую оболочку ротовой полости, прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может являться системным или местным. Фармацевтическая композиция может быть доставлена в инертном носителе, в частности в липосоме (см., например, Langer (1990) Science 249:1527-1533).

Применение наночастиц для доставки антител согласно настоящему изобретению также предусмотрено в настоящем документе. Конъюгированные с антителом наночастицы можно использовать как для терапевтических, так и для диагностических применений. Конъюгированные с антителом наночастицы и способы получения и применения описаны подробно в Arruebo, M., et al. 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" в J. Nanomat. Vol. 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389), включенной в настоящий документ посредством ссылки. Наночастицы можно разрабатывать и конъюгировать с антителами, содержащимися в фармацевтических композициях для нацеленного воздействия на опухолевые клетки или клетки аутоиммунной ткани или инфицированные виру-

сом клетки. Наночастицы для доставки лекарственных средств также описаны, например, в патенте США №№ 8257740 или 8246995, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе контролируемого высвобождения. Согласно одному варианту осуществления можно использовать насос. Согласно другому варианту осуществления можно использовать полимерные материалы. Согласно еще одному варианту осуществления система контролируемого высвобождения может быть помещена вблизи места действия композиции, таким образом, требуя только части системной дозы.

Инъекционные препараты могут включать в себя лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрисуставных, интракраниальных, интраперитонеальных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Указанные инъекционные препараты можно получить с помощью способов, являющихся общеизвестными. Например, инъекционные препараты можно получить, например, путем растворения, суспендирования или эмульгирования описанного выше антигена или его соли, в стерильной водной среде или масляной среде, традиционно используемой для инъекций. В качестве водной среды инъекций можно назвать, например, физиологический солевой раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства и т.д., которые можно использовать в комбинации с подходящим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), полиатомный спирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (аддукт полиоксиэтилена (50 ммоль) и гидрогенизованного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в комбинации с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. полученную таким образом инъекцию предпочтительно заполняют в соответствующую ампулу.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, в отношении подкожной доставки шприц-ручка легко находит применения в доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Такой шприц-ручка может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом шприце-ручке, как правило, используется заменяемый картридж, который содержит фармацевтическую композицию. Как только вводится вся фармацевтическая композиция в картридже и картридж оказывается пустым, пустой картридж можно легко удалить и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручку можно использовать повторно. В одноразовом шприце-ручке нет сменного картриджа. Напротив, одноразовый шприц-ручка поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. Как только в резервуаре заканчивается фармацевтическая композиция, все устройство выбрасывается.

Различные многоразовые шприцы-ручки и автоинжекторы находят свое применение в подкожной доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Примеры включают в себя без каких-либо ограничений AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бургдорф, Швейцария), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Франклин-Лейкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия), чтобы назвать лишь несколько. Примеры одноразовых шприцев-ручек, находящих свое применение в подкожной доставке фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, включают в себя без каких-либо ограничений шприц-ручку SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Таузанд-Оакс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штуттгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ Pen (Abbott Labs, Эббот-Парк, Иллинойс), чтобы назвать лишь несколько.

Преимущественно, фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, получают в виде лекарственных форм в разовой дозе, подобранной так, чтобы соответствовать дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в разовой дозе включают в себя, например, таблетки, драже, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося антигена, как правило, составляет приблизительно 5 - приблизительно 500 мг на лекарственную форму в разовой дозе; особенно в форме инъекции, предпочтительно, чтобы антиген содержался в дозе, составляющей приблизительно 5 - приблизительно 100 мг и приблизительно 10 - приблизительно 250 мг для других лекарственных форм.

Терапевтические применения антигенов

Антиген согласно настоящему изобретению являются применимыми для лечения, профилактики и/или облегчения заболевания или нарушения или состояния, такого как злокачественная опухоль, аутоиммунное заболевание или вирусная инфекция и/или для облегчения по меньшей мере одного симптома, связанного с таким заболеванием, нарушением или состоянием. Согласно некоторым вариантам осуществ-

ствления согласно настоящему изобретению описанные в настоящем документе антитела являются применимыми для лечения субъектов, страдающих от первичной или рецидивирующей злокачественной опухоли, включая в себя, например, следующее: почечноклеточная карцинома, злокачественная опухоль предстательной железы, злокачественная опухоль яичника, злокачественная опухоль почки, злокачественная опухоль толстой и прямой кишки, злокачественная опухоль желудка, злокачественная опухоль молочной железы, злокачественная опухоль головы и шеи, немелкоклеточный рак легкого, злокачественная опухоль мозга, множественная миелома и меланома. Антитела можно использовать для лечения симптомов на ранней стадии или на поздней стадии злокачественной опухоли. Согласно одному варианту осуществления антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению можно использовать для лечения метастазирующей злокачественной опухоли. Антитела являются применимыми в снижении или ингибировании или сжатия роста опухоли как солидных опухолей, так и злокачественных опухолей крови. Согласно определенным вариантам осуществления антитела можно использовать для профилактики рецидива опухоли. Согласно определенным вариантам осуществления лечение с помощью антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению может приводить больше чем к 50% регрессии, больше чем 60% регрессии, больше чем 70% регрессии, больше чем 80% регрессии или больше чем 90% регрессии опухоли у субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления антитела можно использовать для увеличения выживаемости субъекта, страдающего от злокачественной опухоли.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению являются применимыми для лечения субъектов, страдающих от хронической вирусной инфекции. Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению являются применимыми в снижении вирусных титров у хозяина и/или восстановлении истощенных Т-клеток. Согласно одному варианту осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению можно вводить в терапевтической дозе пациенту с инфекцией вирусом иммунодефицита человека (HIV) или вирусом папилломы человека (HPV) или вирусом гепатита В/С (HBV/HCV). Согласно родственному варианту осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению можно использовать для лечения инфекции вирусом иммунодефицита обезьян (SIV) у субъекта-обезьяны, такого как яванский макак. Согласно другому варианту осуществления антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению можно использовать для лечения хронической вирусной инфекции вирусом лимфоцитарного хориоменингита (LCMV).

Согласно определенным вариантам осуществления блокирующее антитело согласно настоящему изобретению можно вводить в терапевтически эффективном количестве субъекту, страдающему от злокачественной опухоли или вирусной инфекции.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела согласно настоящему изобретению являются применимыми для лечения аутоиммунного заболевания, включая в себя без ограничения следующее: гнездная алопеция, аутоиммунный гепатит, глютеновая энтеропатия, диффузный токсический зоб, синдром Гийена-Барре, аутоиммунный тиреоидит, гемолитическая анемия, воспалительное заболевание кишечника, воспалительные миопатии, рассеянный склероз, первичный билиарный цирроз, псориаз, ревматоидный артрит, склеродермия, синдром Шегрена, системная красная волчанка, витилиго, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунная крапивница, аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура, болезнь Крона, сахарный диабет I типа, эозинофильный фасциит, эозинофильный энтерогастрит, синдром Гудпасчера, тяжелая миастения, псориатический артрит, ревматическая атака, неспецифический язвенный колит, васкулит и гранулематоз Вегенера. Согласно определенным вариантам осуществления активирующее антитело согласно настоящему изобретению можно использовать для лечения субъекта, страдающего от аутоиммунного заболевания.

Один или несколько антител согласно настоящему изобретению можно вводить для облегчения или предотвращения или снижения тяжести одного или нескольких симптомов или состояний заболевания или нарушения.

Кроме того, в настоящем документе предусмотрено применение одного или нескольких антител согласно настоящему изобретению профилактически пациентам, характеризующимся риском развития заболевания или нарушения, такого как злокачественная опухоль и хроническая вирусная инфекция.

Согласно дополнительному варианту осуществления настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению используют для получения фармацевтической композиции для лечения пациентов, страдающих от злокачественной опухоли, аутоиммунного заболевания или вирусной инфекции. Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения антитела согласно настоящему изобретению используют в качестве вспомогательной терапии с любым другим средством или любой другой терапией, известной специалистам в настоящей области техники, применимой для лечения злокачественной опухоли, аутоиммунного заболевания или вирусной инфекции.

Виды комбинированной терапии

Виды комбинированной терапии могут включать в себя антитело к PD-L1 согласно настоящему изобретению и любое дополнительное терапевтическое средство, которая можно успешно комбинировать с антителом согласно настоящему изобретению, или с биологически активным фрагментом антитела

согласно настоящему изобретению.

Антитела согласно настоящему изобретению можно комбинировать синергетически с одним или несколькими противораковыми лекарственными средствами или терапией, используемой для лечения злокачественной опухоли, включая в себя, например, следующее: почечноклеточная карцинома, злокачественная опухоль яичника, злокачественная опухоль предстательной железы, злокачественная опухоль толстой и прямой кишки, немелкоклеточный рак легкого и меланома. В настоящем документе предусмотрено применение антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению в комбинации с иммуностимулирующими и/или иммунозаместительными видами терапии для ингибирования роста опухоли и/или усиления выживаемости пациентов со злокачественной опухолью. Иммуностимулирующие виды терапии включают в себя прямые иммуностимулирующие виды терапии для усиления иммунной активности клетки либо путем "ослабления тормоза" в отношении подвергнутых супрессии иммунных клеток, либо "нажатием на газ" для активации иммунного ответа. Примеры включают в себя нацеленное воздействие на другие ключевые рецепторы, вакцинацию и адьюванты. Иммунозаместительные модальности могут увеличивать антигенность опухоли путем стимуляции гибели иммуногенных клеток, воспаления или характеризоваться другими непрямыми эффектами, которые стимулируют противоопухолевый иммунный ответ. Примеры включают в себя лучевую терапию, химиотерапию, ангиогенные средства и операцию.

Согласно различным вариантам осуществления одно или несколько антител согласно настоящему изобретению можно использовать в комбинации со следующим: второе антитело к PD-L1, антитело к PD-1 (например, ниволумаб), ингибитор LAG-3, ингибитор CTLA-4 (например, ипилиумаб), ингибитор TIM3, ингибитор BTLA, ингибитор TIGIT, ингибитор CD47, антагонист другого Т-клеточного соингибитора или лиганда (например, антитело к CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 или VISTA), ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагонист фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) [например, "белок-ловушка для VEGF, или VEGF-Трап", такой как афлиберцепт или другой ингибирующий VEGF белок слияния, представленный в патенте США № 7087411, или антитело к VEGF или его антигенсвязывающий фрагмент (например, бевацизумаб или ранибизумаб) или низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)], ингибитор Ang2 (например, несвакумаб), ингибитор трансформирующего фактора роста бета (TGFP), ингибитор рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (например, эрлотиниб, цетуксимаб), агонист к костимулирующему рецептору (например, агонист к индуцированному глюкокортикоидом родственному TNFR белку), антитело к опухоль-специфическому антигену (например, CA9, CA125, ассоциированный с меланомой антиген 3 (MAGE3), карциноэмбриональный антиген (CEA), виментин, tumor-M2-PK, простатический специфический антиген (PSA), муцин-1, MART-1 и CA19-9), вакцина (например, бацилла Кальметта-Герена, противораковая вакцина), адьювант для увеличения презентации антигена (например, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), биспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело CD3×CD20, биспецифическое антитело PSMA×CD3), цитотоксин, химиотерапевтическое средство (например, дакарбазин, темозоломид, циклофосфамид, доцетаксел, доксорубин, даунорубин, цисплатин, карбоплатин, гемцитабин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел и винкристин), циклофосфамид, лучевая терапия, ингибитор IL-6R (например, сарилумаб), ингибитор IL-4R (например, дупилумаб), ингибитор IL-10, цитокин, такой как IL-2, IL-7, IL-21 и IL-15, конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC) (например, анти-CD19-DM4 ADC и анти-DS6-DM4 ADC), противовоспалительное лекарственное средство (например, кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные лекарственные средства), пищевые добавки, такие как антиоксиданты или любая паллиативная помощь для лечения злокачественной опухоли. Согласно определенным вариантам осуществления антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению можно использовать в комбинации с противораковыми вакцинами, включая в себя вакцины на основе дендритных клеток, онколитические вирусы, вакцины на основе опухолевых клеток и т.д. для усиления противоопухолевого ответа. Примеры противораковых вакцин, которые можно использовать в комбинации с антителами к PD-L1 согласно настоящему изобретению, включают в себя вакцину MAGE3 для меланомы и злокачественной опухоли мочевого пузыря, вакцину MUC1 для злокачественной опухоли молочной железы, EGFRv3 (например, Rindoperimut) для злокачественной опухоли мозга (включая в себя мультиформную глиобластому) или ALVAC-CEA (для CEA+ злокачественных опухолей). Согласно определенным вариантам осуществления антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению можно использовать в комбинации с пищевой добавкой, такой как антиоксиданты, или любой паллиативной помощью для лечения злокачественной опухоли.

Согласно определенным вариантам осуществления антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению можно вводить в комбинации с лучевой терапией в способах для получения длительных стойких противоопухолевых ответов и/или усиления выживаемости пациентов со злокачественной опухолью. Согласно определенным вариантам осуществления антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению можно вводить до, одновременно или после введения лучевой терапии пациенту со злокачественной опухолью. Например, лучевую терапию можно вводить за одну или несколько доз на опухолевые поражения с последующим введением одной или нескольких доз антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению.

бретению. Согласно определенным вариантам осуществления лучевую терапию можно вводить местно на опухолевое поражение для усиления местной иммуногенности опухоли пациента (адьювантное облучение) и/или для уничтожения опухолевых клеток (разрушающее облучение) с последующим системным введением антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению. Например, интракраниальное облучение можно вводить пациенту со злокачественной опухолью мозга (например, мультиформной глиобластомой) наряду с системным введением антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению. Согласно определенным вариантам осуществления антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению можно вводить в комбинации с лучевой терапией и химиотерапевтическим средством (например, темозоломидом) или антагонистом VEGF (например, афлиберцептом).

Антитела или их фрагменты согласно настоящему изобретению можно вводить в комбинации с одним или несколькими противовирусными лекарственными средствами, известными в настоящей области техники, включая в себя без ограничения зидовудин, ламивудин, абакавир, рибавирин, лопинавир, эфавиренз, кобицистат, тенофовир, рилпивириин и кортикостероиды. Согласно определенным вариантам осуществления антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению можно вводить в комбинации с ингибитором LAG3, ингибитором CTLA-4, ингибитором PD-1 или любым антагонистом другого Т-клеточного соингибитора для лечения хронической вирусной инфекции.

Антитела и их фрагменты согласно настоящему изобретению можно использовать в комбинации с любым лекарственным средством или терапией, известными в настоящей области техники (например, кортикостероиды и другие иммунодепрессанты) для лечения аутоиммунного заболевания или нарушения, включая в себя без ограничения следующее: гнездная алопеция, аутоиммунный гепатит, глютенная энтеропатия, диффузный токсический зоб, синдром Гийена-Барре, аутоиммунный тиреоидит, гемолитическая анемия, воспалительное заболевание кишечника, воспалительные миопатии, рассеянный склероз, первичный билиарный цирроз, псориаз, ревматоидный артрит, склеродермия, синдром Шегрена, системная красная волчанка, витилиго, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунная крапивница, аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура, болезнь Крона, сахарный диабет I типа, эозинофильный фасцит, эозинофильный энтерогастрит, синдром Гудпасчера, тяжелая миастения, псориазический артрит, ревматическая атака, неспецифический язвенный колит, васкулит и гранулематоз Вегенера.

Дополнительный(е) терапевтически активный(е) компонент(ы) можно вводить до, одновременно или после введения антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению. Для целей настоящего раскрытия такие режимы введения рассматриваются как введение антитела к PD-L1 "в комбинации со" вторым терапевтически активным компонентом.

Дополнительный(е) терапевтически активный(е) компонент(ы) можно вводить субъекту перед введением антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению. Например, первый компонент может рассматриваться как введенный "перед" второго компонента, если первый компонент вводят за 1 неделю, за 72, за 60 ч, за 48, за 36, за 24, за 12, за 6, за 5, за 4, за 3, за 2, за 1 ч, за 30, за 15, за 10, за 5 или меньше чем 1 мин до введения второго компонента. Согласно другим вариантам осуществления дополнительный(е) терапевтически активный(е) компонент(ы) можно вводить субъекту после введения антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению. Например, первый компонент может рассматриваться как введенный "после" второго компонента, если первый компонент вводят через 1 мин после, через 5 мин после, через 10 мин после, через 15 мин после, через 30 мин после, через 1 ч после, через 2 ч после, через 3 ч после, через 4 ч после, через 5 ч после, через 6 ч после, через 12 ч после, через 24 ч после, через 36 ч после, через 48 ч после, через 60 ч после, через 72 ч после введения второго компонента. Согласно другим вариантам осуществления дополнительный(е) терапевтически активный(е) компонент(ы) можно вводить субъекту одновременно с введением антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению. "Одновременное" введение для целей настоящего изобретения включает в себя, например, введение антитела к PD-L1 и дополнительного терапевтически активного компонента субъекту в единой лекарственной форме (например, составленные совместно) или в отдельных лекарственных формах, введенных субъекту с интервалом в пределах приблизительно 30 мин или меньше друг от друга. При введении в отдельных лекарственных формах каждая лекарственная форма может быть введена посредством одного и того же пути (например, как антитело к PD-L1, так и дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить внутривенно, подкожно и т.д.); альтернативно, каждую лекарственную форму можно вводить различным путем (например, антитело к PD-L1 можно вводить внутривенно, а дополнительный терапевтически активный компонент можно вводить подкожно). В любом случае введение компонентов в единой лекарственной форме, в отдельных лекарственных формах одинаковым путем или в отдельных лекарственных формах различными путями рассматриваются как "одновременное введение" для целей настоящего раскрытия. Для целей настоящего раскрытия введение антитела к PD-L1 "перед", "одновременно" или "после" (согласно терминам, определенным в настоящем документе выше) введения дополнительного терапевтически активного компонента считается введением антитела к PD-L1 "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом).

Согласно настоящему изобретению предусмотрены фармацевтические композиции, в которых антитело к PD-L1 согласно настоящему изобретению совместно составлено с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в другом месте в настоящем до-

кументе, с использованием разнообразных комбинаций дозировок.

Согласно иллюстративным вариантам осуществления, в которых антитело к PD-L1 согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с антагонистом VEGF (например, белком-ловушкой для VEGF, таким как афлиберцепт), включая в себя введение совместные составы, содержащих антитело к PD-L1 и антагонист VEGF, отдельные компоненты можно вводить субъекту и/или совместно составлять с использованием разнообразных комбинаций дозировок. Например, антитело к PD-L1 можно вводить субъекту и/или может содержать в совместном составе в количестве, выбранном из группы, состоящей из 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 и 10,0 мг; и антагонист VEGF (например, белок-ловушку для VEGF, такую как афлиберцепт) можно вводить субъекту и/или он может содержаться в совместном составе в количестве, выбранном из группы, состоящей из 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 и 3,0 мг. Комбинации/совместные составы можно вводить субъекту согласно любому из режимов введения, раскрытых в другом месте в настоящем документе, включая в себя, например, дважды в неделю, один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в месяц, один раз в 2 месяца, один раз в 3 месяца, один раз в 4 месяца, один раз в 5 месяцев, один раз в 6 месяцев и т.д.

Режимы введения

Согласно определенным вариантам осуществления согласно настоящему изобретению многократные дозы антитела к PD-L1 (или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к PD-L1 и любого из дополнительных терапевтически активных средств, упомянутых в настоящем документе) можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы согласно настоящему аспекту настоящего изобретения содержат последовательное введение субъекту многократных доз антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению. Используемый в настоящем документе термин "последовательное введение" означает, что каждую дозу антитела к PD-L1 вводят субъекту в разное время, например, в разные дни, отделенные заранее определенным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Согласно настоящему изобретению предусмотрены способы, которые предусматривают последовательное введение пациенту одной начальной дозы антитела к PD-L1 с последующей одной или несколькими вторичными дозами антитела к PD-L1 и необязательно с последующей одной или несколькими третичными дозами антитела к PD-L1. Антитело к PD-L1 можно вводить в дозе, составляющей 0,1 мг/кг -приблизительно 100 мг/кг.

Термины "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению. Таким образом, "начальная доза" представляет собой дозу, которую вводят в начале режима лечения (она также называется "исходная доза"; "вторичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичные и третичные дозы могут все содержать одинаковое количество антитела к PD-L1, но, как правило, могут отличаться друг от друга в отношении частоты введения. Тем не менее, согласно определенным вариантам осуществления количество антитела к PD-L1, содержащееся в начальной, вторичных и/или третичных дозах, варьирует друг от друга (например, повышаясь или понижаясь при необходимости) в течение курса лечения. Согласно определенным вариантам осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) дозы вводят в начале режима лечения в качестве "насыщающих доз" с последующим введением последующих доз, которые вводят менее часто (например, "поддерживающие дозы").

Согласно определенным иллюстративным вариантам осуществления настоящего изобретения каждую вторичную и/или третичную дозу вводят через 1-26 (например, 1, 1^{1/2}, 2, 2^{1/2}, 3, 3^{1/2}, 4, 4^{1/2}, 5, 5^{1/2}, 6, 6^{1/2}, 7, 7^{1/2}, 8, 8^{1/2}, 9, 9^{1/2}, 10, 10^{1/2}, 11, 11^{1/2}, 12, 12^{1/2}, 13, 13^{1/2}, 14, 14^{1/2}, 15, 15^{1/2}, 16, 16^{1/2}, 17, 17^{1/2}, 18, 18^{1/2}, 19, 19^{1/2}, 20, 20^{1/2}, 21, 21^{1/2}, 22, 22^{1/2}, 23, 23^{1/2}, 24, 24^{1/2}, 25, 25^{1/2}, 26, 26^{1/2} или больше) недель после предыдущей дозы. Используемая в настоящем документе фраза "предыдущая доза" означает в последовательности многократных введений дозу антитела к PD-L1, которую вводят пациенту перед введением каждой последующей дозы в последовательности без каких-либо промежуточных доз.

Способы согласно настоящему аспекту настоящего изобретения могут предусматривать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антитела к PD-L1. Например, согласно определенным вариантам осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше) вторичных доз вводят пациенту. Аналогично, согласно определенным вариантам осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше) третичных доз вводят пациенту.

Согласно вариантам осуществления, предусматривающим многократные вторичные дозы, каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2 недели или 1-2 месяца после предыдущей дозы. Аналогично, Согласно вариантам осуществления, предусматривающим многократные третичные дозы, каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 2-12 недель после предыдущей дозы. Согласно опреде-

ленным вариантам осуществления настоящего изобретения частота, с которой вторичную и/или третичную дозы вводят пациенту, может варьировать в течение курса определенного режима лечения. Частоту введения в течение курса лечения также может откорректировать лечащий врач в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического экспериментирования.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены режимы введения, в которых 2-6 насыщающие дозы вводят пациенту с первой частотой (например, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, один раз в два месяца и т.д.), с последующим введением двух или более поддерживающих доз пациенту с меньшей частотой. Например, согласно настоящему аспекту настоящего изобретения если насыщающие дозы вводят с частотой, составляющей, например, один раз в месяц (например, две, три, четыре или больше насыщающих дозы, вводимых раз в месяц), затем поддерживающие дозы можно вводить пациенту один раз в пять недель, один раз в шесть недель, один раз в семь недель, один раз в восемь недель, один раз в десять недель, один раз в двенадцать недель и т.д.).

Диагностические применения антител

Антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению можно использовать для обнаружения и/или измерения PD-L1 в образце, например, для диагностических целей. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотрено применение одного или нескольких антител согласно настоящему изобретению в анализах для обнаружения заболевания или нарушения, такого как злокачественная опухоль, аутоиммунное заболевание или хроническая вирусная инфекция. Иллюстративные диагностические анализы для PD-L1 могут предусматривать, например, приведение в контакт образца, полученного от пациента, с антителом к PD-L1 согласно настоящему изобретению, причем антитело к PD-L1 мечено с помощью обнаруживаемой метки или репортерной молекулы или используется в качестве лиганда захвата для селективного выделения PD-L1 из образцов пациента. Альтернативно, немеченое антитело к PD-L1 можно использовать в диагностических применениях в комбинации с вторичным антителом, которое само по себе мечено обнаруживаемой меткой. Обнаруживаемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоактивный изотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I ; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или такой фермент, как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Специфические иллюстративные анализы, которые можно использовать для обнаружения или измерения PD-L1 в образце, включают в себя твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), радиоиммуноанализа (RIA) и сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах PD-L1 согласно настоящему изобретению, включают в себя любую образец ткани или жидкости, получаемый от пациента, который содержит обнаруживаемые количества либо белка PD-L1, либо его фрагментов, при нормальных или патологических состояниях. Как правило, уровни PD-L1 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не пораженного злокачественной опухолью или аутоиммунным заболеванием), будут измеряться, чтобы изначально установить исходное, или стандартное, содержание PD-L1. Это исходное содержание PD-L1 затем можно сравнить с содержаниями PD-L1, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов, у которых подозревают связанное со злокачественной опухолью состояние или симптомы, связанные с таким состоянием.

Антитела, специфические в отношении PD-L1, могут не содержать никаких дополнительных меток или фрагментов, или они могут содержать N-концевую или C-концевую метку или фрагмент. Согласно одному варианту осуществления метка или фрагмент представляют собой биотин. В анализе связывания расположение метки (если она присутствует) может определять ориентацию пептида относительно поверхности, с которой связан пептид. Например, если поверхность покрыта авидином, пептид, содержащий N-концевой биотин, будет ориентироваться так, чтобы C-концевая часть пептида была удалена от поверхности.

Аспекты согласно настоящему изобретению связаны с применением раскрытых антител в качестве маркеров для определения прогноза злокачественной опухоли или аутоиммунного нарушения у пациентов. Антитела согласно настоящему изобретению можно использовать в диагностических анализах для оценки прогноза злокачественной опухоли у пациента и для прогнозирования выживаемости.

Примеры

Следующие примеры предложены для того, чтобы обеспечить специалистов в данной области полным раскрытием и описанием того, как создавать и применять способы и композиции согласно настоящему изобретению, и не ограничены объемом того, что авторы изобретения относят к своему изобретению. Были сделаны попытки обеспечить точность в отношении использованных чисел (например, количества, температура и т.д.), но следует принимать в расчет некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой массовые части, молекулярная масса означает среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет приблизительно 25°C и давление является атмосферным или близким атмосферному.

Пример 1. Получение антител человека к PD-L1

Антитела человека к PD-L1 получали с использованием фрагмента PD-L1, который находится в диапазоне приблизительно 19-239 аминокислот SEQ ID NO: 351 (регистрационный номер Genbank

NP_054862,1). Иммуноген вводили напрямую, с адъювантом, чтобы стимулировать иммунный ответ, мыши VELOCIMMUNE®, содержащей ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой и каппа-легкой цепи иммуноглобулина человека. Иммунный ответ антитела подвергали мониторингу с помощью PD-L1-специфического иммуноанализа. Если достигался требуемый иммунный ответ, сленциты собирали и проводили их слияние с клетками миеломы мыши, чтобы сохранить их жизнеспособность и образовать гибридные клеточные линии. Гибридные клеточные линии подвергали скринингу и селекции для идентификации клеточных линий, которые производят PD-L1-специфические антитела. С использованием указанной техники и иммуногена, описанного выше, получают некоторые химерные антитела к PD-L1 (т.е. антитела, обладающие вариабельными доменами человека и константными доменами мыши); иллюстративные антитела, полученные таким образом, обозначали как H2M8306N, H2M8307N, H2M8309N, H2M8310N, H2M8312N, H2M8314N, H2M8316N, H2M8317N, H2M8321N, H2M8323N, H2M8718N, H2M8718N2 и H2M8719N.

Антитела к PD-L1 также выделяли напрямую из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в заявке на выдачу патента США № 2007/0280945A1, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки. С использованием указанного способа получали некоторые полностью человеческие антитела к PD-L1 (т.е. антитела, обладающие вариабельными доменами человека и константными доменами человека); иллюстративные антитела, полученные таким образом, обозначали как H1N9323P, H1N9327P, H1N9329P, H1N9336P, H1N9344P2, H1N9345P2, H1N9351P2, H1N9354P2, H1N9364P2, H1N9373P2, H1N9382P2, H1N9387P2 и H1N9396P2.

Биологические свойства иллюстративных антител, полученных согласно способам настоящего примера, описаны подробно в примерах, изложенных ниже.

Пример 2. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи

В табл. 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепи и CDR выбранных антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты представлены в табл. 2.

Таблица 1. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H2M8306N	2	4	6	8	10	12	14	16
H2M8307N	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M8309N	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M8310N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M8312N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M8314N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M8316N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M8317N	114	116	118	120	122	124	126	128
H2M8321N	130	132	134	136	138	140	142	144
H2M8323N	146	148	150	152	154	156	158	160
H2M8718N	162	164	166	168	170	172	174	176
H2M8718N2	178	180	182	184	170	172	174	176
H2M8719N	186	188	190	192	194	196	198	200
H1N9323P	202	204	206	208	210	212	214	216
H1N9327P	218	220	222	224	226	228	230	232
H1N9329P	234	236	238	240	242	244	246	248
H1N9336P	250	252	254	256	258	260	262	264
H1N9344P2	266	268	270	272	274	276	278	280
H1N9345P2	282	284	286	288	274	276	278	280
H1N9351P2	290	292	294	296	274	276	278	280
H1N9354P2	298	300	302	304	274	276	278	280
H1N9364P2	306	308	310	312	274	276	278	280
H1N9373P2	314	316	318	320	274	276	278	280
H1N9382P2	322	324	326	328	274	276	278	280
H1N9387P2	330	332	334	336	274	276	278	280
H1N9396P2	338	340	342	344	274	276	278	280

Таблица 2. Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты

Обозначение	SEQ ID NO:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
антитела								
H2M8306N	1	3	5	7	9	11	13	15
H2M8307N	17	19	21	23	25	27	29	31
H2M8309N	33	35	37	39	41	43	45	47
H2M8310N	49	51	53	55	57	59	61	63
H2M8312N	65	67	69	71	73	75	77	79
H2M8314N	81	83	85	87	89	91	93	95
H2M8316N	97	99	101	103	105	107	109	111
H2M8317N	113	115	117	119	121	123	125	127
H2M8321N	129	131	133	135	137	139	141	143
H2M8323N	145	147	149	151	153	155	157	159
H2M8718N	161	163	165	167	169	171	173	175
H2M8718N2	177	179	181	183	169	171	173	175
H2M8719N	185	187	189	191	193	195	197	199
H1H9323P	201	203	205	207	209	211	213	215
H1H9327P	217	219	221	223	225	227	229	231
H1H9329P	233	235	237	239	241	243	245	247
H1H9336P	249	251	253	255	257	259	261	263
H1H9344P2	265	267	269	271	273	275	277	279
H1H9345P2	281	283	285	287	273	275	277	279
H1H9351P2	289	291	293	295	273	275	277	279
H1H9354P2	297	299	301	303	273	275	277	279
H1H9364P2	305	307	309	311	273	275	277	279
H1H9373P2	313	315	317	319	273	275	277	279
H1H9382P2	321	323	325	327	273	275	277	279
H1H9387P2	329	331	333	335	273	275	277	279
H1H9396P2	337	339	341	343	273	275	277	279

Антитела, как правило, в настоящем документе обозначены согласно следующей номенклатуре: приставка Fc (например, "H1H", "H2M", "H2aM" и т.д.) с последующим числовым идентификатором (например, "8306", "9323" и т.д., как показано в табл. 1), с последующим суффиксом "P", "N", "P2" или "N2". Таким образом, согласно указанной номенклатуре антитело в настоящем документе может быть обозначено, например, как "H2M8306N", "H1H9344P2" и т.д. Приставки H1H, H2M и H2aM на обозначениях антител, используемых в настоящем документе, указывают на конкретный изотип области Fc антитела. Например, антитело "H1H" содержит Fc IgG1 человека, антитело "H1M" содержит Fc IgG1 мыши и антитело "H2M" или "H2aM" содержит Fc IgG2 мыши, (все вариабельные области являются полностью человеческими, что обозначено первой 'H' в обозначении антитела). Как понятно специалисту в настоящей области техники, антитело, характеризующееся конкретным изотипом Fc, можно превратить в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с Fc IgG1 мыши можно превратить с антитело с IgG4 человека и т.д.), но в любом случае вариабельные домены (включая в себя CDR) - которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в табл. 1 - будут оставаться одинаковыми, и свойства связывания с антигеном, как предполагают, являются идентичными или, по существу, сходными независимо от природы домена Fc.

Пример 3. Связывание антитела с PD-L1, определяемое с помощью поверхностного плазмонного резонанса

Константы скорости ассоциации и диссоциации связывания (k_a и k_d , соответственно), равновесные константы диссоциации и диссоциационные периоды полувыведения (K_D и $t^{1/2}$, соответственно) связывания антигена с очищенными моноклональными антителами к PD-L1 определяли с использованием биосенсорного анализа с использованием поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени на приборе Biacore 4000. Сенсорную поверхность Biacore дериватизировали либо с помощью поликлонального антитела кролика к антителу мыши (GE, № BR-1008-38), либо с помощью моноклонального антитела мыши к Fc человека (GE, № BR-1008-39) для захвата приблизительно 200-300 ЕО (единиц ответа) моноклональных антител к PD-L1, экспрессированных или с Fc мыши, или с Fc человека, соответственно. Реагенты PD-L1, исследуемые в отношении связывания с антителами к PD-L1, включали в себя рекомбинантный PD-L1 человека (аминокислоты 19-239 регистрационного номера NP_054862.1), экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (hPD-L1-MMH; SEQ ID: 345), рекомбинантный PD-L1 яванского макака, экспрессированный с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (MfPD-L1-MMH; SEQ ID: 346), рекомбинантный PD-L1 человека (аминокислоты 19-239 регистрационного номера NP_054862.1), экспрессированный или с С-концевой меткой Fc IgG1 человека (hPD-L1-hFc; SEQ ID: 347), или с С-концевой меткой Fc IgG2a мыши (hPD-L1-mFc; SEQ ID: 348), и рекомбинантный PD-L1 яванского макака, экспрессированный с С-концевой меткой Fc IgG2a мыши (MfPD-L1-mFc; SEQ ID: 353). Различные концентрации реагентов PD-L1 вводили поверх поверхности с захваченными моноклональными антителами к PD-L1 с объемной скоростью потока, составляющей 30 мкл/мин. Связывание реагентов PD-L1 с захваченными моноклональными антителами подвергали мониторингу в течение 3-4 мин, в то время как диссоциацию антитела, связанного реагентами PD-L1, подвергали мониторингу в течение 10 мин в подвижном буфере HBST (0,01 М HEPES pH 7,4,

0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества tween-20). Эксперименты проводили или при 25°C, или 37°C. Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем обработки и аппроксимации данных к 1:1 модели связывания с использованием программного обеспечения для аппроксимации кривой Scrubber 2.0с. Равновесные константы диссоциации связывания (K_D) и диссоциационные периоды полувыведения ($t_{1/2}$) затем рассчитывали из кинетических констант скоростей как: K_D (М) = k_d/k_a и $t_{1/2}$ (мин) = $[\ln 2 / (60 * k_d)]$. Кинетические параметры связывания для различных моноклональных антител к PD-L1, связывающихся с различными реагентами PD-L1 при 25°C и 37°C, представлены в табл. 3-8.

Таблица 3. Кинетические параметры связывания моноклональных антител к PD-L1, связывающихся с hPD-L1-ММН при 25°C

Связывание с мономером hPD-L1-ММН при 25°C				
Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM8306N	1,44E+05	1,00E-02	6,96E-08	1,2
H2aM8307N	3,27E+04	1,47E-04	4,50E-09	79
H2aM8309N	6,42E+05	1,04E-02	1,63E-08	1,1
H2aM8310N	8,86E+04	3,10E-04	3,50E-09	37
H2aM8312N	7,59E+04	7,22E-04	9,51E-09	16
H2aM8314N	9,25E+05	5,17E-05	5,58E-11	224
H2aM8316N	9,57E+05	1,12E-03	1,17E-09	10
H2aM8317N	9,40E+04	3,95E-02	4,21E-07	0,3
H2aM8321N	1,03E+05	3,59E-03	3,49E-08	3,2
H2aM8323N	9,37E+05	2,23E-04	2,38E-10	52
H2aM8718N	9,27E+05	8,01E-05	8,63E-11	144
H2aM8719N	8,64E+04	2,26E-03	2,62E-08	5,1
H1H9323P	5,51E+04	1,88E-02	3,41E-07	0,6
H1H9327P	4,19E+05	2,59E-04	6,19E-10	45
H1H9329P	1,77E+06	1,34E-01	7,58E-08	0,1
H1H9336P	7,92E+05	3,90E-04	4,92E-10	30
H1H9345P2	9,02E+04	1,49E-02	1,65E-07	0,8
H1H9351P2	4,56E+05	8,96E-04	1,96E-09	13
H1H9354P2	4,76E+04	3,83E-04	8,04E-09	30
H1H9364P2	9,32E+05	2,99E-04	3,21E-10	39
H1H9373P2	2,65E+06	2,91E-04	1,10E-10	40
H1H9382P2	7,90E+04	4,79E-03	6,06E-08	2,4
H1H9387P2	2,64E+06	5,82E-02	2,21E-08	0,2
H1H9396P2	1,72E+05	2,18E-03	1,27E-08	5,3

Таблица 4. Кинетические параметры связывания моноклональных антител к PD-L1, связывающихся с hPD-L1-ММН при 37°C

Связывание с мономером hPD-L1-ММН при 37°C				
Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM8306N	1,80E+05	3,10E-02	1,72E-07	0,4
H2aM8307N	5,35E+04	8,79E-04	1,64E-08	13
H2aM8309N	1,06E+06	3,14E-02	2,97E-08	0,4
H2aM8310N	1,32E+05	1,28E-03	9,70E-09	9,0
H2aM8312N	8,89E+04	4,03E-03	4,53E-08	2,9
H2aM8314N	1,07E+06	1,50E-04	1,40E-10	77
H2aM8316N	1,01E+06	5,30E-03	5,24E-09	2,2
H2aM8317N	9,03E+04	5,85E-02	6,47E-07	0,2
H2aM8321N	1,01E+05	9,29E-03	9,16E-08	1,2
H2aM8323N	1,38E+06	6,84E-04	4,97E-10	17
H2aM8718N	1,08E+06	1,55E-04	1,44E-10	74
H2aM8719N	1,50E+05	5,76E-03	3,84E-08	2,0
H1H9323P	1,21E+05	4,25E-02	3,52E-07	0,3
H1H9327P	5,21E+05	4,29E-04	8,24E-10	27
H1H9329P	2,82E+06	3,29E-01	1,17E-07	0,04
H1H9336P	1,07E+06	7,88E-04	7,33E-10	15
H1H9345P2	1,72E+05	3,40E-02	1,97E-07	0,3
H1H9351P2	6,82E+05	1,68E-03	2,47E-09	6,9
H1H9354P2	7,39E+04	1,14E-03	1,54E-08	10
H1H9364P2	1,35E+06	5,63E-04	4,17E-10	21
H1H9373P2	3,09E+06	5,58E-04	1,80E-10	21
H1H9382P2	9,97E+04	1,07E-02	1,07E-07	1,1
H1H9387P2	3,49E+06	1,37E-01	3,91E-08	0,08
H1H9396P2	3,44E+05	1,13E-02	3,30E-08	1,0

Таблица 5. Кинетические параметры связывания моноклональных антител к PD-L1, связывающихся с димером PD-L1 человека при 25°C

Связывание с димером PD-L1 человека при 25°C				
Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM8306N	7,39E+05	3,09E-04	4,18E-10	37
H2aM8307N	1,89E+04	2,89E-05	1,54E-09	399
H2aM8309N	3,36E+06	1,44E-04	4,29E-11	80
H2aM8310N	3,13E+05	5,71E-05	1,83E-10	202
H2aM8312N	2,47E+05	1,02E-04	4,13E-10	113
H2aM8314N	3,16E+06	1,35E-05	4,26E-12	859
H2aM8316N	3,08E+06	1,44E-04	4,68E-11	80
H2aM8317N	3,59E+05	4,50E-04	1,25E-09	26
H2aM8321N	8,13E+05	2,87E-04	3,53E-10	40
H2aM8323N	2,91E+06	2,05E-05	7,04E-12	565
H2aM8718N	3,20E+06	1,62E-05	5,06E-12	713
H2aM8719N	3,42E+05	2,62E-04	7,67E-10	44
H1H9323P	2,24E+05	1,69E-04	7,54E-10	68
H1H9327P	4,66E+05	7,87E-05	1,69E-10	147
H1H9329P	2,97E+06	7,68E-04	2,59E-10	15
H1H9336P	1,38E+06	1,09E-04	7,86E-11	106
H1H9345P2	5,00E+05	2,37E-04	4,74E-10	49
H1H9351P2	9,16E+05	1,53E-04	1,67E-10	76
H1H9354P2	1,68E+05	1,16E-04	6,89E-10	100
H1H9364P2	2,42E+06	1,06E-04	4,37E-11	109
H1H9373P2	4,08E+06	1,06E-04	2,60E-11	109
H1H9382P2	2,23E+05	1,48E-04	6,63E-10	78
H1H9387P2	5,07E+06	2,17E-04	4,27E-11	53
H1H9396P2	7,76E+05	1,90E-04	2,45E-10	61

Таблица 6. Кинетические параметры связывания моноклональных антител к PD-L1, связывающихся с димером PD-L1 человека при 37°C

Связывание с димером PD-L1 человека при 37°C				
Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM8306N	9,97E+05	4,16E-04	4,17E-10	28
H2aM8307N	4,41E+04	2,21E-04	5,00E-09	52
H2aM8309N	4,41E+06	1,66E-04	3,76E-11	70
H2aM8310N	4,81E+05	1,24E-04	2,58E-10	93
H2aM8312N	3,57E+05	2,61E-04	7,32E-10	44
H2aM8314N	3,89E+06	2,30E-05	5,91E-12	503
H2aM8316N	4,06E+06	2,37E-04	5,85E-11	49
H2aM8317N	4,81E+05	6,57E-04	1,36E-09	18
H2aM8321N	9,46E+05	2,69E-04	2,85E-10	43
H2aM8323N	4,32E+06	1,21E-04	2,80E-11	96
H2aM8718N	3,72E+06	1,98E-05	5,32E-12	584
H2aM8719N	4,37E+05	2,91E-04	6,66E-10	40
H1H9323P	5,19E+05	2,03E-04	3,91E-10	57
H1H9327P	6,83E+05	1,36E-04	2,00E-10	85
H1H9329P	3,87E+06	2,67E-03	6,89E-10	4,3
H1H9336P	2,75E+06	8,31E-05	3,02E-11	139
H1H9345P2	6,82E+05	2,03E-04	2,97E-10	57
H1H9351P2	1,25E+06	1,46E-04	1,17E-10	79
H1H9354P2	4,56E+05	1,45E-04	3,17E-10	80
H1H9364P2	3,34E+06	6,96E-05	2,08E-11	166
H1H9373P2	5,12E+06	8,97E-05	1,75E-11	129
H1H9382P2	4,92E+05	1,37E-04	2,78E-10	84
H1H9387P2	6,12E+06	3,92E-04	6,39E-11	29
H1H9396P2	1,09E+06	2,58E-04	2,37E-10	45

Таблица 7. Кинетические параметры связывания моноклональных антител к PD-L1, связывающихся с MfPD-L1-ММН при 25°C

Связывание с мономером MfPD-L1-ММН при 25°C				
Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM8306N	1,65E+05	7,88E-03	4,77E-08	1,5
H2aM8307N	2,61E+04	1,07E-03	4,09E-08	11
H2aM8309N	8,70E+05	1,30E-02	1,49E-08	0,9
H2aM8310N	1,03E+05	3,06E-04	2,97E-09	38
H2aM8312N	7,09E+04	5,97E-04	8,42E-09	19
H2aM8314N	9,66E+05	7,00E-05	7,24E-11	165
H2aM8316N	9,71E+05	1,64E-03	1,69E-09	7,0
H2aM8317N	1,06E+05	2,38E-02	2,26E-07	0,5
H2aM8321N	1,34E+05	4,02E-03	2,99E-08	2,9
H2aM8323N	5,47E+05	8,68E-03	1,59E-08	1,3
H2aM8718N	9,04E+05	6,64E-05	7,35E-11	174
H2aM8719N	8,17E+04	2,68E-03	3,28E-08	4,3
H1H9323P	8,22E+04	2,40E-02	2,92E-07	0,5
H1H9327P	3,59E+05	3,33E-04	9,28E-10	35
H1H9329P	1,76E+06	1,35E-01	7,69E-08	0,09
H1H9336P	6,79E+05	5,94E-04	8,76E-10	19
H1H9345P2	1,10E+05	8,50E-03	7,73E-08	1,4
H1H9351P2	3,49E+05	1,11E-03	3,19E-09	10
H1H9354P2	4,60E+04	3,05E-04	6,64E-09	38
H1H9364P2	7,57E+05	3,12E-04	4,12E-10	37
H1H9373P2	2,21E+06	2,82E-04	1,27E-10	41
H1H9382P2	8,22E+04	1,29E-02	1,57E-07	0,9
H1H9387P2	2,37E+06	6,04E-02	2,55E-08	0,2
H1H9396P2	2,06E+05	2,52E-03	1,22E-08	4,6

Таблица 8. Кинетические параметры связывания моноклональных антител к PD-L1, связывающихся с MfPD-L1-ММН при 37°C

Связывание с мономером MfPD-L1-ММН при 37°C				
Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H2aM8306N	2,74E+05	3,68E-02	1,34E-07	0,3
H2aM8307N	1,87E+05	1,43E-03	7,63E-09	8,1
H2aM8309N	1,07E+06	2,81E-02	2,63E-08	0,4
H2aM8310N	4,71E+05	1,07E-03	2,27E-09	11
H2aM8312N	1,01E+05	3,32E-03	3,27E-08	3,5
H2aM8314N	1,07E+06	1,52E-04	1,42E-10	76
H2aM8316N	1,02E+06	5,38E-03	5,27E-09	2,1
H2aM8317N	2,66E+05	4,76E-02	1,79E-07	0,2
H2aM8321N	1,59E+05	8,16E-03	5,11E-08	1,4
H2aM8323N	9,56E+05	2,82E-02	2,95E-08	0,4
H2aM8718N	1,10E+06	1,46E-04	1,33E-10	79
H2aM8719N	1,35E+05	6,99E-03	5,19E-08	1,7
H1H9323P	1,25E+05	4,99E-02	3,98E-07	0,2
H1H9327P	4,77E+05	5,34E-04	1,12E-09	22
H1H9329P	2,66E+06	3,64E-01	1,37E-07	0,03
H1H9336P	9,09E+05	1,25E-03	1,38E-09	9,2
H1H9345P2	1,64E+05	1,97E-02	1,21E-07	0,6
H1H9351P2	5,60E+05	2,01E-03	3,59E-09	5,8
H1H9354P2	8,59E+04	8,44E-04	9,82E-09	14
H1H9364P2	1,12E+06	6,33E-04	5,66E-10	18
H1H9373P2	2,81E+06	5,69E-04	2,03E-10	20
H1H9382P2	1,30E+05	2,45E-02	1,89E-07	0,5
H1H9387P2	3,20E+06	1,57E-01	4,89E-08	0,07
H1H9396P2	3,94E+05	1,20E-02	3,05E-08	1,0

Таблица 9. Кинетические параметры связывания моноклональных антител к PD-L1, связывающихся с PD-L1-mFc обезьяны при 25°C

Связывание с MfPD-L1-mFc при 25°C				
Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H1H8314N	2,58E+06	6,77E-05	2,63E-11	171
H1H8316N	2,71E+06	5,23E-05	1,93E-11	221
H1H8323N	2,67E+06	6,16E-05	2,31E-11	188
H1H9351P2	7,81E+05	7,19E-05	9,22E-11	161
H1H9364P2	1,32E+06	7,75E-05	5,87E-11	149
H1H9373P2	2,85E+06	4,96E-05	1,74E-11	233
H1H9387P2	3,55E+06	1,61E-04	4,52E-11	72
H1H9351P2	8,64E+05	7,80E-05	9,03E-11	148
H1H9364P2	1,25E+06	5,80E-05	4,62E-11	199
H1H9373P2	3,27E+06	6,55E-05	2,00E-11	176
H1H9387P2	2,90E+06	2,12E-04	7,30E-11	55
H1H9323P	2,80E+05	1,45E-04	5,19E-10	79
H1H9327P	3,48E+05	1,02E-04	2,94E-10	113
H1H9329P	1,74E+06	6,72E-04	3,86E-10	17
H1H9336P	9,90E+05	6,16E-05	6,22E-11	188
H1H9344P2	3,50E+05	1,38E-04	3,93E-10	84
H1H9345P2	2,96E+05	1,51E-04	5,12E-10	76
H1H9354P2	2,05E+05	9,14E-05	4,47E-10	126
H1H9382P2	2,13E+05	1,33E-04	6,26E-10	87
H1H9396P2	8,37E+05	1,88E-04	2,25E-10	61

Таблица 10. Кинетические параметры связывания моноклональных антител к PD-L1, связывающихся с PD-L1-mFc обезьяны при 37°C

Связывание с MfPD-L1-mFc при 37°C				
Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	$t_{1/2}$ (мин)
H1H8314N	2,89E+06	9,60E-05	3,33E-11	120
H1H8316N	2,96E+06	6,16E-05	2,08E-11	187
H1H8323N	2,99E+06	1,35E-04	4,51E-11	86
H1H9351P2	1,06E+06	9,46E-05	8,91E-11	122
H1H9364P2	2,36E+06	1,11E-04	4,71E-11	104
H1H9373P2	3,15E+06	8,59E-05	2,73E-11	134
H1H9387P2	3,41E+06	4,74E-04	1,39E-10	24
H1H9351P2	1,61E+06	1,04E-04	6,47E-11	111
H1H9364P2	2,41E+06	6,76E-05	2,80E-11	171
H1H9373P2	3,86E+06	1,23E-04	3,19E-11	94
H1H9387P2	2,90E+06	4,65E-04	1,61E-10	25
H1H9323P	3,84E+05	2,44E-04	6,36E-10	47
H1H9327P	7,64E+05	2,94E-04	3,85E-10	39
H1H9329P	2,18E+06	1,54E-03	7,08E-10	8
H1H9336P	1,86E+06	4,60E-05	2,47E-11	251
H1H9344P2	9,05E+05	2,17E-04	2,40E-10	53
H1H9345P2	8,61E+05	2,92E-04	3,39E-10	40
H1H9354P2	2,72E+05	2,03E-04	7,46E-10	57
H1H9382P2	2,84E+05	2,35E-04	8,25E-10	49
H1H9396P2	1,57E+06	5,02E-04	3,19E-10	23

Как показано в табл. 3, при 25°C все 25 антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению связывались с hPD-L1-ММН со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 55,8 пМ до 421 нМ. Как показано в табл. 4, при 37°C все 25 антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению связывались с hPD-L1-ММН со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 140 пМ до 647 нМ. Как показано в табл. 5, при 25°C все 25 антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению связывались с димером hPD-L1 со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 4,26 пМ до 1,54 нМ. Как показано в табл. 6, при 37°C все 25 антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению связывались с димером hPD-L1 со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 5,32 пМ до 5,0 нМ. Как показано в табл. 7, при 25°C все 25 антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению связывались с MfPD-L1-ММН со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 72,4 пМ до 292 нМ. Как показано в табл. 8, при 37°C все 25 антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению связывались с MfPD-L1-ММН со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 133 пМ до 398 нМ. Как показано в табл. 9, при 25°C все 20 исследованных антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению связывались с MfPD-L1-mFc со значениями K_D , находящимися в диапазоне от

17,4 до 626 пМ. Как показано в табл. 10, при 37°C все 20 исследованных антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению связывались с MfPD-L1-mFc со значениями K_D , находящимися в диапазоне от 20,8 до 825 пМ.

Пример 4. Блокирование связывания PD-L1 с PD-1, определяемое с помощью ELISA

Способность моноклональных антител к PD-L1 блокировать связывание PD-L1 человека с его партнерами по связыванию, рецепторами PD-1 человека и B7-1 человека, измеряли с использованием двух форматов конкурентного сэндвич-ELISA.

Димерный белок PD-1 человека, состоящего из части внеклеточного домена (аминокислоты 25-170 регистрационного номера NP_005009.2 с заменой C93S), который был экспрессирован с С-концевой меткой hFc (hPD-1-hFc; SEQ ID: 350), и димерный белок B7-1 человека, состоящего из части внеклеточного домена, экспрессированного с С-концевой меткой hFc и гексагистидиновыми метками (hB7-1-hFc-6His; R&D Systems, № 140-B1) отдельно наносили в концентрации 2 мкг/мл на 96-луночный микротитрационный планшет в буфере PBS в течение ночи при 4°C. Сайты неспецифического связывания впоследствии блокировали с использованием 0,5% (мас./об.) раствора BSA в PBS. Постоянное количество, составляющее 0,5 или 8,0 нМ димерного белка hPD-L1, состоящего из части внеклеточного домена PD-L1 человека, который экспрессировали с С-концевой меткой mFc (hPD-L1-mFc; SEQ ID: 348), титровали отдельно с концентрациями к антител PD-1 и антител изотипного контроля, находящихся в диапазоне 0-210 нМ в серийном разведении. Указанные комплексы антитело-белок затем инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (RT). Комплексы с постоянным количеством, составляющим 0,5 нМ hPD-L1-mFc, впоследствии переносили в микротитрационные планшеты, покрытые hPD-1-hFc, и комплексы с постоянным количеством, составляющим 8 нМ hPD-L1-mFc, переносили на покрытые hB7-1-hFc-6His планшеты. Комплексы оставляли связываться с покрытыми планшетами в течение 1 ч при RT. Через 1 ч инкубации лунки отмывали и связанный с планшетом hPD-L1-mFc обнаруживали с помощью поликлонального антитела к mFc, конъюгированного с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch, № по кат. 115-035-164). Образцы обрабатывали с помощью раствора TMB (BD Biosciences, № по кат. 51-2606KC и 51-2607KC) для получения колориметрической реакции и нейтрализовали с помощью 1 М серной кислоты перед измерением поглощения при 450 нм на планшете-ридере Victor X5. В анализе данных использовали сигмоидальную модель зависимости от дозы в программном обеспечении Prism™. Рассчитанное значение IC_{50} , определяемое как концентрация антитела, необходимая для блокирования 50% PD-L1-mFc, связывающегося с hPD-1-hFc или hB7-1-hFc-6His, использовали как показатель блокирующего действия. Максимальные блокирующие значения представляли способность антител блокировать связывание hPD-L1-mFc относительно фонового значения. Поглощение, измеренное при постоянном количестве hPD-L1 на кривой зависимости от дозы, определяли как 0% блокирование, и поглощение без добавленного hPD-L1 определяли как 100% блокирование. Значения поглощения лунок, содержащих самую высокую концентрацию каждого антитела, использовали для определения процента блокирования при максимальной исследуемой концентрации антитела. Антитела с максимальным процентом блокады, составляющим ниже 25%, рассматривали как не являющиеся блокаторами и их значения IC_{50} не отражены в табл. 11. Антитела с максимальным процентом блокады, составляющим ниже -25%, рассматривали как не являющиеся блокаторами /усилителями.

Таблица 11. Определяемое с помощью ELISA блокирование связывания hPD-L1-mFc с hPD-1-hFc и hB7-1-hFc-6His антителами к PD-L1

Антитело	Самая высокая концентрация антитела (нМ), исследуемая на покрытии hPD-1-hFc	Блокирование связывания 0,5 нМ hPD-L1-mFc с hPD-1-hFc, IC_{50} (М)	Блокирование связывания 0,5 нМ hPD-L1-mFc с hPD-1-hFc, % максимального блокирования	Самая высокая концентрация антитела (нМ), исследуемая на покрытии hB7-1-hFc-6His	Блокирование связывания 8 нМ hPD-L1-mFc с hPD-1-hFc, IC_{50} (М)	Блокирование связывания 8 нМ hPD-L1-mFc с hB7-1-hFc-6His, % максимального блокирования
H2aM8306N	50	<2,5E-10 (*)	99	150	<4,0E-09 (*)	93
H2aM8307N	50	IC	29	150	NBI/усилитель	-44
H2aM8309N	50	<2,5E-10 (*)	98	150	<4,0E-09 (*)	98
H2aM831	50	3,9E-10	76	150	<4,0E-09	98

0N					(*)	
H2aM831 2N	50	NBI	23	150	<4,0E-09 (*)	98
H2aM831 4N	50	<2,5E-10 (*)	93	150	<4,0E-09 (*)	97
H2aM831 6N	50	<2,5E-10 (*)	96	150	<4,0E-09 (*)	98
H2aM831 7N	50	NBI	-11	150	NBI/ усилитель	-166
H2aM832 1N	50	NBI	10	150	NBI/ усилитель	-124
H2aM832 3N	50	<2,5E-10 (*)	100	150	<4,0E-09 (*)	99
H2aM871 8N	50	<2,5E-10 (*)	97	150	1,0E-08	57
H2aM871 9N	50	7,7E-10	95	150	NBI/ усилитель	-50
H1H9323 P	50	<2,5E-10 (*)	43	210	NBI/ усилитель	-25
H1H9327 P	50	NBI/усилите ль	-28	210	IC	41
H1H9329 P	50	<2,5E-10 (*)	100	210	4,9E-09	100
H1H9336 P	50	<2,5E-10 (*)	100	210	4,4E-09	99
H1H9344 P2	50	NBI	15	210	NBI/ усилитель	-51
H1H9345 P2	50	<2,5E-10 (*)	26	210	NBI/ усилитель	-34
H1H9351 P2	50	<2,5E-10 (*)	100	210	4,4E-09	100
H1H9354 P2	50	5,3E-10	34	210	NBI	-13
H1H9364 P2	50	<2,5E-10 (*)	100	210	4,1E-09	101
H1H9373 P2	50	<2,5E-10 (*)	100	210	4,6E-09	101
H1H9382 P2	50	<2,5E-10 (*)	39	210	NBI/усили тель	-30
H1H9387 P2	50	<2,5E-10 (*)	100	210	<4,0E-09	100
					(*)	
H1H9396 P2	50	<2,5E-10 (*)	59	210	NBI	8
Изотип контроль – человека IgG1	50	NBI	-11	210	NBI	-3
Изотип контроль – мышь IgG2a	50	NBI	5	210	NBI	-3

(*) - ниже теоретической нижней границы анализа; теоретическая нижняя граница анализа составляет 2,5E-10 М для покрытия с помощью hPD-1-hFc и 4,0E-09 М для покрытия с помощью hB7-1-hFc-6His; NBI - не является блокатором; IC - неинформативный

Как показано в табл. 11, 19 из 25 антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению блокировали связывание 0,5 нМ hPD-L1-mFc с hPD-1-hFc со значениями IC₅₀, находящимися в диапазоне от меньше чем 250 пМ до 770 пМ с максимальной процентной блокадой, находящейся в диапазоне от 26 до 100%. 4 из 25 исследованных антител к PD-L1 охарактеризовали как не являющиеся блокаторами связывания hPD-L1-mFc с hPD-1-hFc, тогда как одно исследованное антитело (H1H9327P) охарактеризовали как не являющееся блокатором/усилителем связывания hPD-L1-mFc с hPD-1-hFc. Одно антитело (H2aM8307N) продемонстрировало слабое блокирование связывания hPD-L1-mFc с hPD-1-hFc с максимальной процентной блокадой, составляющей 29%; тем не менее, для этого образца нельзя было определить значение IC₅₀.

Кроме того, 14 из 25 антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению блокировали связывание 8 нМ hPD-L1-mFc с hB7-1-hFc-6His со значениями IC₅₀, находящимися в диапазоне от <4 до 10 нМ с мак-

симальной процентной блокадой, находящейся в диапазоне от 57 до 101%. Два из 25 исследованных антител к PD-L1 охарактеризовали как не являющиеся блокаторами связывания hPD-L1-mFc с hB7-1-hFc-6His, тогда как 8 исследованных антител охарактеризовали как не являющиеся блокаторами/усилители связывания hPD-L1-mFc с hB7-1-hFc-6His. Одно антитело (H1H9327P) продемонстрировало слабое блокирование связывания hPD-L1-mFc с hB7-1-hFc-6His с максимальной процентной блокадой, составляющей 41%; тем не менее, для этого образца нельзя было определить значение IC₅₀.

Пример 5. Блокирование связывания PD-L1 с PD-1, определяемое с помощью биосенсорного анализа и с помощью поверхностного плазмонного резонанса

Ингибирование связывания PD-L1 человека с PD-1 человека различными моноклональными антителами к PD-L1 исследовали или с использованием анализа биослойной интерферометрии в режиме реального времени на биосенсорном приборе Octet Red96 (Fortebio Inc.), или с использованием биосенсорного анализа на основе поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени на приборе Biacore 3000.

Исследования ингибирования в отношении моноклональных антител к PD-L1, экспрессированных с Fc мыши, проводили на приборе Octet Red96. Вначале, 100 нМ рекомбинантного PD-L1 человека, экспрессированного с С-концевой меткой Fc IgG2a мыши (hPD-L1-mFc; SEQ ID: 348), инкубировали с 500 нМ каждого моноклонального антитела к PD-L1 в течение по меньшей мере 1 ч перед проведением анализа ингибирования. Приблизительно 0,8- 2 нМ рекомбинантного PD-1 человека, экспрессированного с С-концевой меткой Fc IgG1 человека (hPD-1-hFc; SEQ ID: 350), захватывали с использованием биосенсоров захвата к IgG Fc человека. Биосенсоры Octet, захваченные hPD-1-hFc, впоследствии погружали в лунки, содержащие смесь hPD-L1-mFc и различных моноклональных антител к PD-L1. Весь эксперимент проводили при 25°C в буфер Octet HBST (0,01 М HEPES pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20, 0,1 мг/мл BSA) при встряхивании планшета со скоростью, составляющей 1000 об/мин. Биосенсоры отмывали в буфере Octet HBST между каждой стадией эксперимента. Ответ связывания в режиме реального времени подвергали мониторингу в течение эксперимента и регистрировали ответ связывания в конце каждой стадии. Связывание hPD-L1-mFc с захваченным hPD-1-hFc сравнивали в присутствии и при отсутствии различных моноклональных антител к PD-L1 и использовали для определения блокирующего поведения исследованных антител, как показано в табл. 12.

Таблица 12. Ингибирование связывания PD-1 человека с PD-L1 человека различными моноклональными антителами к PD-L1, экспрессированными с Fc мыши, проведенное на приборе Octet Red96

Моноклональное антитело к PD-L1	Количество захваченного hPD-1-hFc (нМ)	Связывание смеси 100 нМ hPD-L1-mFc и 500 нМ моноклонального антитела к PD-L1 (нМ)	% блокирования
Без антитела	1,05	0,31	0
H2aM8306N	0,98	0,02	94
H2aM8307N	1,01	0,46	-48
H2aM8309N	0,89	0,02	94
H2aM8310N	0,95	0,13	58
H2aM8312N	1,06	0,52	-68
H2aM8314N	0,99	0,02	94
H2aM8316N	1,06	0,01	97
H2aM8317N	0,92	0,58	-87
H2aM8321N	1,04	0,60	-94
H2aM8323N	1,00	0,02	94
H2aM8718N	1,08	0,01	97
H2aM8719N	0,93	0,11	65
Антитело - изотипный контроль	1,10	0,35	-13

Как показано в табл. 12, 8 из 12 антител к PD-L1, исследованных на приборе Octet Red96, продемонстрировали блокирование связывания hPD-L1-mFc с hPD-1-hFc, находящееся в диапазоне от 58 до 97%. 4 исследованных антитела к PD-L1 продемонстрировали способность усиливать связывание hPD-L1-mFc с hPD-1-hFc.

Далее исследования ингибирования в отношении моноклональных антител к PD-L1, экспрессированных с Fc человека, проводили на приборе Biacore 3000. Вначале 100 нМ рекомбинантного PD-L1 человека, экспрессированного с С-концевой меткой Fc IgG1 человека (hPD-L1-hFc; SEQ ID: 350), инкубировали с 500 нМ каждого моноклонального антитела к PD-L1 в течение по меньшей мере 1 ч перед проведением анализа ингибирования. Сенсорную поверхность CM5 Biacore вначале дериватизировали с помощью специфического в отношении IgG2a мыши поликлонального антитела (Southern Biotech, № по кат. 1080-01) с использованием стандартной химии EDC-NHS. Затем проводили захват приблизительно 230 УЕ рекомбинантного PD-1 человека, экспрессированного с С-концевой меткой Fc IgG2a мыши (hPD-

1-mFc; SEQ ID: 348) и затем вводили инъекцию 100 нМ hPD-L1-hFc в присутствии и при отсутствии различных моноклональных антител к PD-L1 при объемной скорости потока, составляющей 25 мкл/мин, в течение 2 мин. Весь эксперимент проводили при 25°C в подвижном буфере HBST (0,01 М HEPES pH7,4, 0,15M NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% объем/объем поверхностно-активного вещества P20). Ответы связывания в режиме реального времени подвергали мониторингу в течение всего эксперимента и регистрировали ответ связывания в конце каждой стадии. Связывание hPD-L1-hFc с захваченным hPD-1-mFc сравнивали в присутствии и при отсутствии различных моноклональных антител к PD-L1 и использовали для определения блокирующего поведения исследованных антител, как показано в табл. 13.

Таблица 13. Ингибирование связывания PD-1 человека с PD-L1 человека различными моноклональными антителами к PD-L1, экспрессированными с Fc человека, проводимое на приборе Biotec 3000

Моноклональное антитело к PD-L1	Количество захваченного hPD-1-mFc (ЕО)	Связывание смеси 100 нМ hPD-L1-hFc и 500 нМ моноклонального антитела к PD-L1 (нМ)	% блокирования
Нет mAb	222	56	0
H1N9323P	224	262	-368
H1N9327P	226	172	-207
H1N9329P	227	2	97
H1N9336P	227	9	84
H1N9345P2	229	292	-422
H1N9351P2	227	6	90
H1N9354P2	229	296	-428
H1N9364P2	228	8	86
H1N9373P2	227	6	89
H1N9382P2	228	307	-448
H1N9387P2	228	5	91
H1N9396P2	228	164	-193
Антитело - изотипный контроль	228	56	0

Как показано в табл. 13, 6 из 12 антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению, исследованных на приборе Biotec 3000, продемонстрировали блокирование связывания hPD-L1-hFc с hPD-1-mFc, находящееся в диапазоне от 84 до 97%. 6 исследованных антител к PD-L1 продемонстрировали способность усиливать связывание hPD-L1-hFc с hPD-1-mFc.

Пример 6. Перекрестная конкуренция Octet между антителами к PD-L1

Конкуренция за связывание между моноклональными антителами к PD-L1 определяли с использованием анализа биослойной интерферометрии без использования метки в режиме реального времени на биосенсоре Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). Весь эксперимент проводили при 25°C в буфере Octet HBST (0,01 М HEPES pH7,4, 0,15M NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% объем/объем поверхностно-активного вещества P20, 0,1 мг/мл BSA) при встряхивания планшета со скоростью, составляющей 1000 об/мин. Для оценки того, способны ли 2 антитела конкурировать друг с другом за связывание со своими соответствующими эпитопами на рекомбинантном PD-L1 человека, экспрессированном с С-концевой тус-тус-гексагистидиновой меткой (hPD-L1-MMH; SEQ ID: 345), приблизительно ~0,3 нМ hPD-L1-MMH вначале захватывали на покрытых антителом к Penta-His Octet наконечниках биосенсора (ForteBio Inc, № по кат. 18-5079) путем погружения наконечников в течение 5 мин в лунку, содержащую 20 мкг/мл раствор hPD-L1-MMH. Наконечники биосенсора с захваченным антигеном затем насыщали первым моноклональным антителом к PD-L1 (которое далее называется mAb-1) путем погружения в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствор mAb-1, в течение 5 мин. Наконечники биосенсора затем погружали в лунки, содержащие 50 мкг/мл раствор второго моноклонального антитела к PD-L1 (которое далее называется mAb-2). Наконечники биосенсора отмывали в буфере Octet HBST между каждой стадией эксперимента. Ответ связывания в режиме реального времени подвергали мониторингу в течение всего эксперимента и регистрировали ответ связывания в конце каждой стадии, как показано на фиг. 1. Сравнивали ответ связывания mAb-2 с hPD-L1-MMH, предварительно образовавшего комплекс с mAb-1 и определяли конкурентное/неконкурентное поведение различных моноклональных антител к PD-L1.

При экспериментальных условиях, используемых в этом примере, (a) H2aM8309N, H1N9329P, H1N9336P, H2aM8314N, H2aM8316N, H2aM8718N, H1N9387P2, H1N9351P2, H1N9364P2, H1N9373P2 и H2aM8306N перекрестно конкурировали друг с другом; (b) H2aM8310N, H2aM8321N и H2aM8312N перекрестно конкурировали друг с другом; (c) H1N9396P2, H2aM8317N, H2aM8321N, H1N9323P, H1N9382P2, H1N9344P2, H1N9345P2 и H1N9354P2 перекрестно конкурировали друг с другом и (d) H1N9327P и H2aM8307N перекрестно конкурировали друг с другом. В одном случае конкуренцию наблюдали в одной ориентации, но не в противоположной: т.е. H2aM8307N при нанесении первым конкурировал с H2aM8309N, H1N9329P, H1N9336P, H2aM8314N, H2aM8316N, H2aM8718N, H1N9387P2,

H1H9351P2, H1H9364P2, H1H9373P2 и H2aM8306N; тем не менее, в противоположной ориентации, нанесенные вначале H2aM8309N, H1H9329P, H1H9336P, H2aM8314N, H2aM8316N, H2aM8718N, H1H9387P2, H1H9351P2, H1H9364P2, H1H9373P2 и H2aM8306N не конкурировали с H2aM8307N.

Пример 7. Связывание антитела с клетками, избыточно экспрессирующими PD-L1

Связывание антител к PD-L1 с клеточной линией мезонефроса человека (HEK293; ATCC, № CRL-1573), стабильно трансфектированной полноразмерным PD-L1 человека (аминокислоты 1-290 регистрационного номера NP_054862.1) (HEK293/hPD-L1), определяли с помощью FACS.

Для анализа прикрепленные клетки открепляли с использованием не содержащего ферменты буфера для диссоциации с полной средой. Клетки центрифугировали и ресуспендировали в концентрации, составляющей $2,8 \times 10^6$ клеток/мл в холодном PBS, содержащем 2% FBS. Родительские клетки HEK293 и клетки HEK293/hPD-L1 затем инкубировали в течение 15-30 мин на льду с 100 нМ каждого антитела к PD-L1 или антитела - изотипного контроля. Несвязанные антитела удаляли путем отмывки с помощью D-PBS, содержащего 2% FBS, и затем клетки инкубировали с конъюгированным с фикоэритрином вторичным фрагментом Fc γ , специфически распознающим или Fc человека (Jackson ImmunoResearch, № по кат. 109-116-170), или Fc мыши (Jackson ImmunoResearch, № по кат. 115-115-164) в течение 15-30 мин на льду. Клетки отмывали с помощью D-PBS, содержащего 2% FBS, для удаления несвязанного вторичного детектирующего реагента и измерения флуоресценции проводили с использованием проточного цитометра HyperCyte (IntelliCyt, Inc.). Данные анализировали с использованием программного обеспечения HyperCyte.

Таблица 14. Определенное с помощью FACS связывание антител к PD-L1 клетками HEK293/hPD-L1 и родительскими клетками HEK293

Антитело	FACS на родительских клетках HEK293 [MFI]	FACS на клетках HEK293/hPD-L1 [MFI]	Соотношение HEK293/hPD-L1 к родительским клеткам HEK293
H1H9323P	1909	154992	81
H1H9327P	2120	317592	150
H1H9329P	1504	282088	188
H1H9336P	2263	379009	168
H1H9344P2	1691	200976	119
H1H9345P2	1885	228406	121
H1H9351P2	1685	289523	172
H1H9354P2	2204	275839	125
H1H9364P2	2066	323663	157
H1H9373P2	2151	333236	155
H1H9382P2	1473	205563	140
H1H9387P2	1232	323793	263
H1H9396P2	2340	227961	97
H2aM8306N	1286	316485	246
H2aM8307N	1382	73976	54
H2aM8309N	1160	192678	166
H2aM8310N	1357	14918	11
H2aM8312N	1380	158331	115
H2aM8314N	2053	194832	95
H2aM8316N	1601	172104	108
H2aM8317N	1270	67600	53
H2aM8321N	1322	112495	85
H2aM8323N	2250	163497	73
H2aM8718N	2225	194341	87
H2aM8719N	1272	133399	105
Изотипный контроль IgG мыши	1273	1115	0,9
Изотипный контроль IgG1 человека	1179	1099	0,9
Изотипный контроль IgG4 человека	1991	1839	0,9

Как показано в табл. 14, все 25 антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению показали сильное связывание с клетками HEK293/hPD-L1 по сравнению со связыванием на родительской линии HEK293.

Пример 8. Блокирование индуцированной PD-L1 Т-клеточной отрицательной регуляции в люциферном репортерном анализе в отношении Т-клеток/APC

Т-клеточная активация достигается путем стимуляции Т-клеточных рецепторов (TcR), которые распознают специфические пептиды, презентированные белками главного комплекса гистосовместимости I или II класса на антигенпрезентирующих клетках (APC). Активированные TcR в свою очередь инициируют каскад сигнальных событий, которые можно подвергнуть мониторингу с помощью репортерных генов, управляемых транскрипционными факторами, такими как белок-активатор 1 (AP-1), ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) или энхансер ядерного фактора каппа-легкой цепи активированных В-клеток (NFkB). Ответ Т-клеток модулировали посредством вовлечения корецепторов, экспрессированных либо конститутивно, либо индуцибельно на Т-клетках. Один такой рецептор представляет со-

бой белок программированной клеточной смерти 1 (PD-1), отрицательный регулятор Т-клеточной активности. PD-1 взаимодействует со своим лигандом, PD-L1, который экспрессируется на клетках-мишенях, включая в себя APC или злокачественные клетки, и это взаимодействие приводит к доставке ингибирующих сигналов путем рекрутинга фосфатаз в сигналосому TcR, приводя к подавлению положительной сигнализации.

Биоанализ разрабатывали для измерения Т-клеточной сигнализации, индуцированной путем взаимодействия между APC и Т-клетками путем использования смешанной культуры, происходящей из двух клеточных линий млекопитающих: клетки Jurkat (иммortalизованная Т-клеточная линия) и клетки Raji (В-клеточная линия) (фиг. 1). Для первого компонента биоанализа, клон E6-1 клеток Jurkat (ATCC, № TIB-152) трансдуцировали с репортером Signal Lenti AP-1 Luc (Qiagen - Sabiosciences, № CLS-011L) согласно инструкциям производителя. Lentivirus кодирует ген люциферазы светлячка под контролем минимального промотора CMV, tandemных повторов TPA-индуцибельного транскрипционного чувствительного элемента (TRE) и гена устойчивости к пуromицину. Сконструированную клеточную линию Jurkat впоследствии трансдуцировали химерой PD-1, содержащей внеклеточный домен PD-1 человека (аминокислоты от 1 до 170 PD1 человека; регистрационный номер NP_005009.2) и трансмембранные и цитоплазматические домены CD300a человека (аминокислоты от 181 до 299 CD300a человека; регистрационный номер NP_009192.2). Полученная стабильная клеточная линия (Jurkat/AP1-Luc/ hPD1-hCD300a) подвергали селекции и содержали в среде, содержащей RPMI/10% FBS/ пенициллин/стрептомицин/глутамин, дополненной 500 мкг/мл G418+1 мкг/мл пуromицина.

Для второго компонента биоанализа клетки Raji (ATCC, № CCL-86) трансдуцировали ген PD-L1 человека (аминокислоты 1-290 регистрационного номера NP_054862.1), который был клонирован в лентивирусную (pLEX) векторную систему (Thermo Scientific Biosystems, № по кат. OHS4735). Положительные в отношении PD-L1 Клетки Raji (Raji/ hPD-L1) выделяли с помощью FACS с использованием антитела PD-L1 и содержали в среде, содержащей Iscove/10% FBS/пенициллин/стрептомицин/глутамин, дополненной 1 мкг/мл пуromицина.

Для стимуляции APC/Т-клеточного взаимодействия использовали биспецифическое антитело, состоящее из одного плеча Fab, которое связывается с CD3 на Т-клетках, и другого плеча связывания Fab, которое связывается с CD20 на клетки Raji (биспецифическое антитело CD3×CD20; например, как раскрыто в заявке на выдачу патента США № US 20140088295). Присутствие биспецифической молекулы в анализе приводит в результате к активации Т-клетки и APC путем соединения мостиком субъединиц CD3 на Т-клетках с CD20, эндогенно экспрессированным на клетках Raji. Было продемонстрировано, что лигирование CD3 с антителами к CD3 приводит к активации Т-клеток. В этом биоанализе антитела, блокирующие взаимодействие PD1/PD-L1, восстанавливают Т-клеточную активность путем блокирования передачи ингибирующего сигнала и впоследствии приводя к увеличенной активации AP1-Luc.

В биоанализе на основе люциферазы RPMI1640, дополненную 10% FBS и пенициллином/стрептомицином/глутамином, использовали в качестве среды для анализа для получения клеточных суспензий и разведений антител для проведения скрининга моноклональных антител к PD-L1 (mAb). В день скрининга определяли значения EC₅₀ mAb к PD-L1, в присутствии фиксированной концентрации биспецифического антитела CD3×CD20 (30 nM), а также EC₅₀ биспецифического антитела отдельно. В следующем порядке клетки и реагенты добавляли к 96-луночным планшетах с белым дном. Для определений EC₅₀ mAb к PD-L1 вначале получали фиксированную концентрацию биспецифического антитела CD3×CD20 (конечная 30 nM) и добавляли к лункам микротитрационного планшета. Затем добавляли 12-ти кратные серийные разведения mAb к PD-L1 и контроли (конечные концентрации, находящиеся в диапазоне от 1,7 nM до 100 nM; а также лунки со средой для анализа отдельно). Для определения EC₅₀ биспецифического антитела (отдельно) биспецифическое антитело в конечных концентрациях, находящихся в диапазоне от 0,17 nM до 10 nM (а также лунки со средой для анализа отдельно), добавляли к лункам микротитрационного планшета. Впоследствии получали 2,5×10⁶/мл суспензию клеток Raji/hPD-L1 и добавляли 20 мкл на лунку (конечное количество клеток на лунку составило 5×10⁴ клеток). Планшеты оставляли при комнатной температуре (15-20 минут), при этом получали суспензию 2,5×10⁶/мл Jurkat/AP1-Luc/hPD1(ecto)-hCD300a(TM-Cyto). 20 мкл суспензии Jurkat (конечное количество клеток на лунку составило 5×10⁴ клеток) добавляли в каждую лунку. Планшеты, содержащие совместную культуру, инкубировали в течение 5-6 ч при 37°C в 5% CO₂. Люциферазную активность затем обнаруживали после добавления реагента ONE-Glo™ (Promega, № по кат. E6051) и относительные световые единицы (RLU) измеряли на люцинометре Victor. Все образцы исследовали в двух параллелях.

Значения RLU для каждого подвергнутого скринингу антитела нормировали путем установки условий анализа при фиксированной (30 nM) концентрации биспецифического антитела CD3/CD20, но без антитела к PD-L1 на 100%. Это условие соответствует максимальному ответу AP1-Luc, вызванному биспецифической молекулой в присутствии ингибирующего сигнала PD-1/PD-L1. При добавлении антитела к PD-L1 ингибирующий сигнал подавляется и повышенная стимуляция показана здесь как E_{max}, процентное увеличение сигнала в присутствии самой высокой исследуемой дозы антитела (100 nM). Для сравнения эффективности исследуемого антитела к PD-L1, концентрацию антитела, при которой нормирован-

ное значение RLU достигало 125% активации, определяли из четырехпараметрического логистического уравнения по 12-точечной кривой ответа с использованием GraphPad Prism. Результаты обобщенно представлены в табл. 15.

Таблица 15. Антитело к PD-L1, блокирующее зависимость от PD-1/PD-L1 ингибирование передачу сигнала AP1-Luc

Антитело	Концентрация антагонистического анализа [M]	Е _{max} среднее антагонистического анализа [%] при 100 нМ
	антагонистического анализа [M] антитела при 125% активации	антагонистического анализа [%] при 100 нМ
H2aM8306N	3,78E-09	166,8
H2aM8307N	N/A	87,7
H2aM8309N	3,09E-10	180,9
H2aM8310N	N/A	112,8
H2aM8312N	N/A	75,6
H2aM8314N	1,44E-11	234,9
H2aM8316N	1,47E-10	177,4
H2aM8317N	N/A	109,2
H2aM8321N	N/A	116,8
H2aM8323N	2,20E-10	173,3
H2aM8718N	1,51E-10	182,0
H1H9323P	N/A	101,1
H1H9327P	N/A	77,1
H1H9329P	N/A	124,5
H1H9336P	9,81E-11	162,6
H1H9344P2	N/A	98,3
H1H9345P2	N/A	89,2
H1H9351P2	3,44E-10	154,4
H1H9354P2	N/A	89,9
H1H9364P2	7,93E-11	164,5
H1H9373P2	1,34E-10	150,2
H1H9382P2	N/A	86,5
H1H9387P2	1,86E-11	141,2
H1H9396P2	N/A	102,6
H1H8314N	6,57E-11	147,9
H1H9364P2	1,62E-10	158,1
H1H9373P2	7,07E-11	152,5
Изотипный контроль mIgG2a	N/A	80,2
Изотипный контроль hIgG1	N/A	96,8
Изотипный контроль hIgG4	N/A	87,6

N/A= не применимо, поскольку при исследуемых концентрациях указанные антитела не активировали 125%

Как показано в табл. 15, 14 из 27 исследованных антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению блокировали ингибирование PD-1/PD-L1 со значениями Е_{max}, находящимися в диапазоне от 234,9 до 138,1. 13 из 27 антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению не продемонстрировали существенной блокады взаимодействия PD1/PD-L1 при исследовании в указанном анализе. Изотипные контроли не препятствовали взаимодействию PD1/PD-L1.

Пример 9. Эффективность in vivo антител к PD-L1

Для определения эффекта выбранного числа антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению в релевантной модели in vivo, исследовании роста опухоли MC38.ova, предусматривающем подкожную инъекцию опухолевых клеток и начало в разные дни, проводили на мышах, которые являлись гомозиготными в отношении экспрессии внеклеточного домена PD-L1 человека на месте внеклеточного домена

PD-L1 мыши (мышь PD-L1 HumIn) на 75% C57/Bl6/25% 129 фон линии. Клетки MC38.Ova (мышинной аденокарциномы толстой кишки) конструировали для экспрессии куриного овальбумина для увеличения иммуногенности опухоли и для обеспечения возможности мониторинга Т-клеточные иммунные ответы хорошо охарактеризованных антигенных пептидов овальбумина. На второй стадии клетки MC38.Ova трансдуцировали лентивирусным вектором, экспрессирующим hPD-L1 под контролем промотора SFFV. Клетки MC38.Ova, положительные в отношении hPD-L1 (MC38.Ova/hPD-L1), выделяли с помощью FACS с использованием специфического в отношении hPD-L1 антитела. Обнаружили, что клетки экспрессировали низкое содержание эндогенного PD-L1 мыши.

Для первого исследования (исследование № 1) мышей равномерно распределяли согласно массе тела на 5 групп лечения или контроля (n=5-8 мышей на группу). В 0 день мышам вводили анестезию с помощью ингаляции изофурана и затем вводили подкожно инъекцию в правую паховую область 1×10^6 MC38.Ova/hPD-L1 клеток в суспензии 100 мкл DMEM. Группам лечения интраперитонеально вводили 500 мкг либо одного из трех антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению, либо одного из двух антител - изотипных контролей с несоответствующей специфичностью в дни 3, 7, 10, 14 и 17 эксперимента, тогда как одна группа мышей не получала лечение.

Во втором исследовании (исследовании №2) гуманизированных в отношении PD-L1 мышей рандомизировали на 7 групп лечения (n=5-6 мышей). В 0 день мышам подкожно имплантировали 1×10^6 клеток MC38.Ova/hPD-L1. Мышам интраперитонеально вводили REGN a-PD-L1 ab (H1N8314N или H1N9364P2 или H1N9373P2), или антитела - изотипные контроли hIgG4 mut или hIgG1 в дозах, составляющих 10 или 5 мг/кг. Группам мышей вводили антитело в дни 3, 7, 10, 14 и 17. Объемы опухолей подвергали мониторингу с помощью измерения штангенциркулем дважды в неделю в течение длительности эксперимента (21 день). Экспериментальная дозировка и протокол лечения для групп мышей показаны в табл. 16.

Таблица 16. Экспериментальная дозировка и протокол лечения для групп мышей

№ исследования	Исследованные образцы	Количество дозировки в каждый момент введения дозы	Интервал введения дозы
1	Изотипный контроль 1	500 мкг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H1N8314N	500 мкг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H1N9364P2	500 мкг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H1N9373P2	500 мкг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	Изотипный контроль 2	500 мкг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
2	Изотипный контроль 1	10 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H1N8314N	10 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H1N8314N	5 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H1N9364P2	10 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H1N9364P2	5 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H1N9373P2	10 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17
	H1N9373P2	5 мг/кг	Дни 3, 7, 10, 14, 17

Для исследований средние объемы опухоли подвергали мониторингу с помощью измерения штангенциркулем дважды в неделю в течение эксперимента (17 дней) и выживаемость в процентах регистрировали в конце эксперимента. Кроме того, число мышей без опухоли также оценивали в конце исследования. Результаты, выраженные как средний объем опухоли (мм^3)($\pm$ SD), выживаемость в процентах и число мышей без опухоли показаны в табл. 17 и 18.

Таблица 17. Средний объем опухоли, выживаемость в процентах и количества мышей без опухолей в каждой группе лечения из исследования № 1

Антитело	Объем опухоли, мм^3 среднее значение ($\pm$ SD)		Выживаемость, %		Мыши без опухоли
	Дни 10	День 17	День 10	День 17	День 17
Изотипный контроль 1	65($\pm$ 27)	148($\pm$ 109)	100%	100%	0/5 (0%)
Изотипный контроль 2	54($\pm$ 44)	80($\pm$ 63)	100%	100%	0/5 (0%)
H1N8314N	6($\pm$ 10)	2($\pm$ 5)	100%	100%	4/5 (80%)
H1N9364P2	16($\pm$ 17)	0($\pm$ 0)	100%	100%	5/5 (100%)
H1N9373P2	13($\pm$ 14)	0($\pm$ 0)	100%	100%	5/5 (100%)

Как показано в табл. 17 для исследования № 1, все три антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению являлись эффективными в стимулировании регрессии опухоли в дозировке, составляющей 500 мкг/мышь, при этом все мыши из групп лечения, которые получили два из антител, H1N9364P2 и H1N9373P2, не характеризовались наличием опухоли на 17 день. В группе лечения, которая получила одно из антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению, H1N8314N, 4 из 5 мышей не характеризовались наличием опухоли на 17 день, тогда как 0 из 5 животных не характеризовались наличием опухоли в группах изотипного контроля. Однофакторный дисперсионный анализа с апостериорным множествен-

ным критерием сравнения Даннетта выявил значимое различие в объемах опухолей между лечением с помощью антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению и антитела - изотипного контроля с р-значением <0,05.

Таблица 18. Средний объем опухоли, выживаемость в процентах и количества мышей без опухоли в каждой группе лечения из исследования № 2

Антитело	Объем опухоли, мм ³ среднее значение (SD)				Выживаемость, %				Мыши без опухоли	Мыши без опухоли
	День 10	День 10	День 21	День 21	День 10	День 10	День 21	День 21	День 21	День 21
	10 MPK	5 MPK	10 MPK	5 MPK	10 MPK	5 MPK	10 MPK	5 MPK	10 MPK	5 MPK
Изотипный контроль 1	55 (37)	N/A	534 (356)	N/A	100%	N/A	100%	N/A	0/6 (0%)	N/A
H1N8314N	14 (15)	17 (4)	19 (922)	108 (101)	100%	100%	100%	100%	3/6 (50%)	2/5 (40%)
H1N9364P2	18 (10)	23 (10)	34 (81)	231 (238)	100%	100%	100%	100%	5/6 (83%)	1/5 (20%)
H1N9373P2	10 (8)	25 (929)	7 (16)	37 (59)	100%	100%	100%	100%	5/6 (83%)	3/5 (60%)

Как показано в табл. 18, в исследовании №2, введение выбранных антител к PD-L1 приводило к ингибированию роста опухоли, стимулирующему регрессию опухоли. Все три антитела к PD-L1 являлись эффективными в дозе, составляющей 10 и 5 мг/кг и стимулировали регрессию опухоли у получивших лечение мышей зависимым от дозы образом в течение всего эксперимента, тогда как 0 из 5 животных не характеризовались наличием опухоли в контрольной группе. Однофакторный дисперсионный анализ с апостериорным множественным критерием сравнения Даннетта выявил значимое различие в объемах опухолей между лечением с помощью антител к PD-L1 и антитела - изотипного контроля с р-значением <0,05 или ниже.

Пример 10. Противоопухолевые эффекты комбинации антитела к PD-L1 и антагониста VEGF в мышинной модели раннего лечения опухоли

Модель раннего лечения опухоли разработали для исследования эффективности комбинации антитела к PD-L1 и антагониста VEGF. В указанной модели комбинированную терапию вводят вскоре после имплантации опухоли. В эксперименте также использовали антитело к PD-1 отдельно и в комбинации с антагонистом VEGF. Используемое в указанном эксперименте антитело к PD-L1 представляло собой к моноклональное антитело PD-L1 с последовательностями V_H/V_L антитела "YW24355S70" согласно заявке на выдачу патента США № US 20100203056A1 (Genentech, Inc.) с IgG2a мыши и которое являлось перекрестнореагирующим с PD-L1 мыши. Используемый в указанном эксперименте антагонист VEGF представлял собой афлиберцепт (химерная молекула на основе рецептора VEGF, также известная как "белок-ловушка для VEGF" или "VEGFR1R2-FcΔC1(a)", полное описание которого представлено в другом месте в настоящем документе). Используемое в указанном эксперименте антитело к PD-1 представляло собой клон "RPMI-14" к PD-1 мыши с IgG2b крысы (Bio X Cell, Уэст-Лебанон, Нью-Гэмпшир).

Для указанной экспериментальной модели 1,0×10⁶ опухолевых клеток Colon-26 имплантировали подкожно мышам линии BALB/c в 0 день. Начиная с 3 дня перед установлением измеряемых опухолей мышам вводили один из видов монотерапии или комбинированной терапии, или контрольную комбинацию, как изложено в табл. 19.

Таблица 19. Экспериментальная дозировка и группы лечения

Группа лечения	Первое средство	Второе средство
Контрольная комбинация	Изотипный контроль IgG2a (250 мкг, и/п (интраперитонеально))	Контроль hFc (250 мкг, п/к (подкожно))
Только белок-ловушка для VEGF	Изотипный контроль IgG2a (250 мкг, и/п)	Афлиберцепт (10 мг/кг, п/к)
Только антитело к PD-1	Антитело к PD-1 RPMI-14 (250 мкг, и/п)	hFc контроль (250 мкг, п/к)
Только антитело к PD-L1	Антитело к PD-L1 (250 мкг, и/п)	hFc контроль (250 мкг, п/к)
Белок-ловушка для VEGF + антитело к PD-1	Антитело к PD-1 RPMI-14 (250 мкг, и/п)	Афлиберцепт (10 мг/кг, п/к)
Белок-ловушка для VEGF + антитело к PD-L1	Антитело к PD-L1 (250 мкг, и/п)	Афлиберцепт (10 мг/кг, п/к)

Различные виды терапии вводили в пять различных моментов времени в течение двухнедельного периода (т.е. инъекции в 3, 6, 10, 13 и 19 день).

Животных в каждой группе терапии оценивали в отношении частоты встречаемости опухоли, объ-

ема опухоли, среднего времени выживаемости и количества не характеризующихся наличием опухоли животных на 50 день. Степень роста опухоли обобщенно представлена на фиг. 2 (кривые роста опухоли) и на фиг. 3 (объем опухоли на 28 день). Результаты также обобщенно представлены в табл. 20.

Таблица 20. Мыши без опухоли при лечении

Группа лечения	Количество животных без опухоли к 50 дню
Контрольная комбинация	0/10
Только белок-ловушка для VEGF	3/10
Только антитело к PD-1	4/10
Только антитело к PD-L1	5/10
Белок-ловушка для VEGF + антитело к PD-1	7/10
Белок-ловушка для VEGF + антитело к PD-L1	9/10

Рост опухоли существенно снижался у животных, получивших лечение с помощью комбинации ловушки VEGF и антитела к PD-L1 по сравнению с режимами лечения, предусматривающими любое терапевтическое средство отдельно (см. фиг. 2 и 3). Более того, выживаемость существенно увеличивалась в группе, получившей ловушку VEGF + антитело к PD-L1, причем 90% животных выжило по меньшей мере к 50 дню после имплантации опухоли. Напротив, для групп, получивших монотерапию с помощью антитела к PD-L1 и ловушки VEGF, выживаемость к 50 дню составила только 50 и 30% соответственно (см. фиг. 3 и табл. 20).

Настоящее изобретение не ограничено в своем объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Более того, различные модификации согласно настоящему изобретению в дополнение к описанным в настоящем документе станут очевидными специалистам в настоящей области техники из вышеизложенного описания и сопроводительных фигур. Предусмотрено, что такие модификации находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с человеческим белком-лигандом 1 программируемой смерти (PD-L1), причем выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем

- (a) HCDR1 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 84;
- (b) HCDR2 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 86;
- (c) HCDR3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 88;
- (d) LCDR1 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 92;
- (e) LCDR2 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 94 и
- (f) LCDR3 характеризуется аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 96.

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, причем выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 82; и

вариабельную область легкой цепи (LCVR), характеризующуюся аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 90.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент относится к изотипу IgG1 или IgG4.

4. Фармацевтическая композиция для ингибирования активности PD-L1, нейтрализации активности PD-L1 и/или стимуляции Т-клеточной активации, причем фармацевтическая композиция содержит выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с PD-L1, по любому из пп.1-3 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

5. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует HCVR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-3.

6. Выделенная полинуклеотидная молекула, содержащая полинуклеотидную последовательность, которая кодирует LCVR антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-3.

7. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотидные последовательности по п.5 или 6.

8. Клетка-хозяин для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-3, экспрессирующая вектор по п.7.

9. Способ получения антитела к PD-L1 или его антигенсвязывающего фрагмента, причем способ предусматривает культивирование клетки по п.8 при условиях, обеспечивающих возможность получения

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и выделения антитела или фрагмента, полученного таким образом.

10. Применение выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-3 для усиления иммунного ответа у субъекта, ингибирования Т-регуляторной (Treg) клетки у субъекта и/или усиления Т-клеточной активации у субъекта.

11. Применение фармацевтической композиции по п.4 для усиления иммунного ответа у субъекта, для ингибирования Т-регуляторной (Treg) клетки у субъекта и/или усиления Т-клеточной активации у субъекта.

12. Применение по п.10 или 11, при котором субъект характеризуется наличием опухоли.

13. Применение по п.10 или 11, при котором субъект характеризуется наличием вирусной инфекции.

14. Применение по п.13, при котором вирусная инфекция включает в себя HIV, HCV, HBV, HPV, LCMV, SIV или их комбинацию.

15. Применение выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-3 для ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки у субъекта.

16. Применение фармацевтической композиции по п.4 для ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки у субъекта.

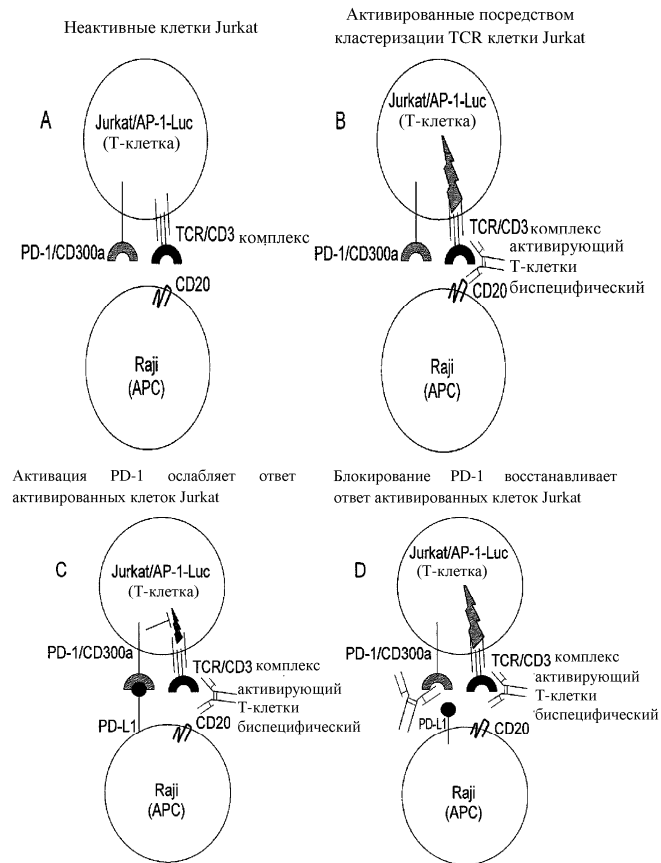
17. Применение по любому из пп.12, 15 и 16, при котором опухоль включает в себя почечноклеточную карциному, злокачественную опухоль мозга, плоскоклеточную карциному головы и шеи, злокачественную опухоль желудка, злокачественную опухоль почки, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль яичника, злокачественную опухоль предстательной железы, немелкоклеточный рак легкого, злокачественную опухоль толстой и прямой кишки, множественную миелому или меланому.

18. Способ усиления иммунного ответа у субъекта, ингибирования Т-регуляторной (Treg) клетки у субъекта, усиления Т-клеточной активации у субъекта и/или ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки у субъекта, предусматривающий введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-3 в комбинации со вторым терапевтическим средством или терапией, включающими NSAID, кортикостероид, антитело к Т-клеточному соингибитору, антитело к опухоль-специфическому антигену, антитело к антигену инфицированной вирусом клетки, антитело к PD-1, ингибитор IDO, ингибитор Ang2, ингибитор EGFR, ингибитор TGF β , пищевую добавку, такую как антиоксидант, антагонист VEGF, такой как антитело к VEGF, низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF, ингибирующий VEGF белок слияния, операцию, облучение, химиотерапевтическое средство, цитотоксическое средство, противовирусное лекарственное средство или их комбинацию.

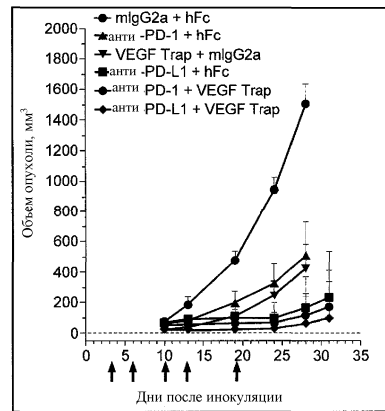
19. Способ усиления иммунного ответа у субъекта, ингибирования Т-регуляторной (Treg) клетки у субъекта, усиления Т-клеточной активации у субъекта и/или ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки у субъекта, предусматривающий введение фармацевтической композиции по п.4 в комбинации со вторым терапевтическим средством или терапией, включающими NSAID, кортикостероид, антитело к Т-клеточному соингибитору, антитело к опухоль-специфическому антигену, антитело к антигену инфицированной вирусом клетки, антитело к PD-1, ингибитор IDO, ингибитор Ang2, ингибитор EGFR, ингибитор TGF β , пищевую добавку, такую как антиоксидант, антагонист VEGF, такой как антитело к VEGF, низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF, ингибирующий VEGF белок слияния, операцию, облучение, химиотерапевтическое средство, цитотоксическое средство, противовирусное лекарственное средство или их комбинацию.

20. Способ по п.18 или 19, при котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутривенно, интрадермально, интраперитонеально, перорально, внутримышечно или интракраниально.

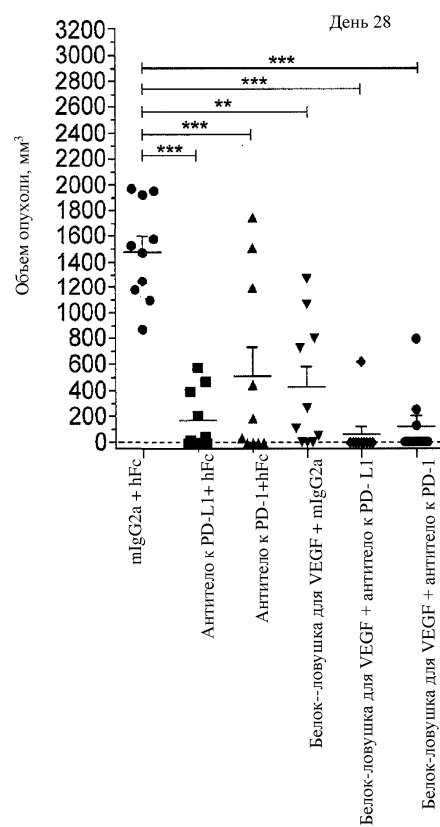
21. Способ по любому из пп.18-20, при котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическую композицию вводят в дозе, составляющей приблизительно 0,1 - приблизительно 60 мг/кг массы тела субъекта.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

