



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.12.23

(21) Номер заявки
201400625

(22) Дата подачи заявки
2012.11.21

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

(54) АНТИТЕЛО ПРОТИВ PD-L1 (ВАРИАНТЫ), КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ЭТО АНТИТЕЛО, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **61/563,903**

(32) **2011.11.28**

(33) **US**

(43) **2014.11.28**

(86) **PCT/EP2012/004822**

(87) **WO 2013/079174 2013.06.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Настри Орасио Г., Иффленд Кристел (US), Лежер Оливье (FR), Ань Ци, Картрайт Марк, Маккенна Шон Д., Суд Ванита Д., Хао Ган (US)

(74) Представитель:
Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В., Веселицкий М.Б., Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(56) EP-A1-1537878
NOMI TAKEO ET AL.: "Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 13, no. 7, 1 April 2007 (2007-04-01), pages 2151-2157, XP002533527, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2746, page 2155, left-hand column, paragraph 1, figure 3B, page 2155, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1
WO-A1-2010077634
WO-A2-2007005874
SOPHIE R. SIERRO ET AL.: "Combination of lentivector immunization and low-dose chemotherapy or PD-1/PD-L1 blocking primes self-reactive T cells and induces anti-tumor immunity", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 41, no. 8, 1 August 2011 (2011-08-01), pages 2217-2228, XP055053701, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/eji.201041235, abstract, figure 7
HOLT L. J. ET AL.: "Domain antibodies: proteins for therapy", TRENDS IN BIOTECHNOLOGY,

ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 484-490, XP004467495, ISSN: 0167-7799, DOI: 10.1016/J.TIBTECH.2003.08.007, abstract

OKUDAIRA: "Blockade of B7-H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model", INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 35, no. 4, 1 September 2009 (2009-09-01), XP055052567, ISSN: 1019-6439, DOI: 10.3892/ijo_00000387, abstract, page 742, right-hand column, paragraph 3

M. V. GOLDBERG ET AL.: "Role of PD-1 and its ligand, B7-H1, in early fate decisions of CD8 T cells", BLOOD, vol. 110, no. 1, 1 July 2007 (2007-07-01), pages 186-192, XP055053809, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2006-12-062422, abstract, page 191, left-hand column

DONG HAIDONG ET AL.: "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 8, no. 8, 24 June 2002 (2002-06-24), pages 793-800, XP002397368, ISSN: 1078-8956, abstract, page 795, left-hand column, paragraph 2, page 795, right-hand column, paragraph 2 figures 3, 5

L. ZHANG ET AL.: "PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model", BLOOD, vol. 114, no. 8, 20 August 2009 (2009-08-20), pages 1545-1552, XP055053821, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2009-03-206672, abstract, page 1549, right-hand column, paragraph 3 - page 1550, left-hand column
WO-A2-2008083174

IWAI YOSHIKO ET AL.: "Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 99, no. 19, 17 September 2002 (2002-09-17), pages 12293-12297, XP002398159, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.19246109, abstract, page 12295, right-hand column, paragraph 1

BLANK CHRISTIAN ET AL.: "Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, JOHN WILEY & SONS, INC, NEW YORK, NY; US, vol. 119, no. 2, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 317-327, XP002557386, ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/IJC.21775, abstract

-
- (57) Изобретение касается антител против PD-L1 или их антигенсвязывающих фрагментов, композиций, содержащих эти антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, и их применения для усиления функции Т-клеток для повышающей регуляции клеточно-опосредованных иммунных реакций и для лечения связанных с дисфункцией Т-клеток нарушений, таких как резистентность опухоли к атаке иммунной системы, для лечения рака.

036814 B1

036814 B1

Область изобретения

Настоящая заявка касается антител против PD-L1 или их антигенсвязывающих фрагментов, их композиций и применения для усиления функции Т-клеток для повышающей регуляции клеточно-опосредованных иммунных реакций и для лечения связанных с дисфункцией Т-клеток нарушений, например, резистентности опухоли к атаке иммунной системы и для лечения рака.

Уровень техники

Развитие и активация лимфоцитов

Двумя основными типами лимфоцитов у человека являются Т-тип (тимоциты) и В-тип (костномозговые). Эти клетки образуются из гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге и эмбриональной печени, которые коммитированы на лимфоидный путь развития. Потомство этих стволовых клеток различными путями созревает до В-или Т-лимфоцитов. Развитие В-лимфоцитов человека происходит исключительно в костном мозге. Т-клетки, с другой стороны, развиваются из незрелых предшественников, которые покидают костный мозг и перемещаются через кровоток в тимус, где они размножаются и дифференцируются в зрелые Т-лимфоциты.

Зрелые лимфоциты, источником которых является тимус или костный мозг, пребывают в неактивном или "покоящемся" состоянии, т. е., они являются митотически неактивными. Когда они рассредоточиваются в кровотоке, эти "необученные" или "девственные" лимфоциты перемещаются в различные вторичные или периферические лимфоидные органы, такие, как селезенка, лимфатические узлы или миндалины. Для большинства девственных лимфоцитов характерна короткая продолжительность жизни, и они погибают за несколько дней после того, как покидают костный мозг или тимус. Однако если такая клетка получает сигналы, указывающие на присутствие антигена, она может активироваться и претерпевать последовательные циклы деления клеток. Некоторые клетки из полученного в результате потомства затем возвращаются в покоящееся состояние и становятся лимфоцитами памяти - В- и Т-клетками, которые по сути примированы для следующей встречи со стимулирующим аллергеном. Другим потомством активированных девственных лимфоцитов являются эффекторские клетки, живущие лишь несколько дней, но выполняющие определенные виды защитной активности.

Активация лимфоцитов представляет собой упорядоченную последовательность событий, которую проходит покоящийся лимфоцит после стимуляции к делению и производству потомства, из которого некоторые клетки становятся эффекторскими клетками. Полный ответ включает как индукцию пролиферации клеток (митогенез), так и проявление иммунологических функций. Лимфоциты активируются, когда специфические лиганды связываются с рецепторами на их поверхностях. Лиганды отличаются от Т-клеток и В-клеток, однако конечные внутриклеточные физиологические механизмы сходны.

Сами же некоторые инородные антигены могут вызывать активацию лимфоцитов, в частности, большие полимерные антигены, сшивающие поверхностные иммуноглобулины на В-клетках или другие гликопротеины на Т-клетках. Однако большинство антигенов не являются полимерными, и даже прямое связывание с В-клетками в больших количествах не обеспечивает активации. Эти более распространенные антигены активируют В-клетки, когда они стимулируются совместно с активированными поблизости хелперными Т-лимфоцитами. Такая стимуляция может происходить от лимфокинов, секретируемых Т-клеткой, однако наиболее эффективно она передается путем прямого контакта В-клетки с поверхностными белками Т-клеток, взаимодействующими с определенными поверхностными рецепторами В-клеток для создания вторичного сигнала.

Т-клетки

Т-лимфоциты не экспрессируют иммуноглобулины, однако, обнаруживают присутствие инородных веществ при помощи поверхностных белков, называемых рецепторами Т-клеток (TCR). Эти рецепторы распознают антигены либо через прямой контакт, либо воздействуя на активность других иммунных клеток. Вместе с макрофагами Т-клетки являются основным типом клеток, вовлеченных в клеточно-опосредованный иммунитет.

В отличие от В-клеток Т-клетки могут обнаруживать инородные вещества только в конкретных условиях. В частности, Т-лимфоциты распознают инородный белок, только если он расщепляется на малые пептиды, которые затем выявляются на поверхности второй клетки-хозяина, называемой антигенпрезентирующей клеткой (АРС). Многие типы клеток-хозяев могут представлять антигены в некоторых условиях, однако определенные типы более специфично адаптированы для этого и являются особенно важными для регулирования активности Т-клеток, включая макрофаги и другие В-клетки. Представление антигена частично зависит от определенных белков, называемых белками главного комплекса гистосовместимости (МНС), на поверхности представляющих клеток. Таким образом, для стимуляции клеточно-опосредованного иммунитета инородные пептиды должны быть представлены Т-клеткам в комбинации с пептидами МНС, и эта комбинация должна распознаваться рецептором Т-клеток.

Существует две значительных субпопуляции Т-клеток: цитотоксичные Т-лимфоциты (Т_с-клетки или CTL) и хелперные Т-клетки (Т_н), которые ориентировочно идентифицируются по экспрессии на клеточной поверхности маркера CD8 и CD4. Т_с-клетки важны для защиты от вирусов и способны уничтожать вирусы непосредственно путем распознавания некоторых экспрессируемых на поверхности клеток вирусных пептидов. Т_н-клетки способствуют пролиферации, созреванию и иммунологической функции

других типов клеток, например, секреции лимфокинов для регулирования активности В-клеток, макрофагов и цитотоксичных Т-клеток. И девственные Т-лимфоциты, и Т-лимфоциты памяти обычно остаются в покоем состоянии, и в этом состоянии они не демонстрируют значительной хелперной или цитотоксичной активности. В активированном состоянии эти клетки претерпевают несколько циклов митотического деления для образования дочерних клеток. Некоторые из этих дочерних клеток возвращаются в покоем состояние как клетки памяти, а другие становятся эффекторными клетками, активно проявляющими хелперную или цитотоксичную активность. Эти дочерние клетки подобны их родительским клеткам: CD4⁺ клетки могут образовывать только CD4⁺ потомство, а CD8⁺ клетки дают только CD8⁺ потомство. Эффекторные Т-клетки экспрессируют маркеры поверхности клеток, которые не экспрессируются на покоем Т-клетках, такие как CD25, CD28, CD29, CD40L, рецепторы трансферрина и белки МНС II класса. При устранении активирующих стимулов цитотоксичная или хелперная активность постепенно снижается в течение нескольких дней, поскольку эффекторные клетки либо отмирают, либо возвращаются в покоем состояние.

Подобно активации В-клеток, реакция Т-лимфоцитов на большинство антигенов также требует двух типов одновременных стимулов. Первым является антиген, который, будучи соответствующим образом экспонированным белками МНС на антигенпрезентирующей клетке, может распознаваться и связываться рецепторами Т-клеток. Поскольку этот комплекс антиген-МНС не посылает сигнал внутрь клетки, он обычно бывает недостаточным для того, чтобы привести к активации Т-клетки. Полная активация, такая, как та, что происходит с хелперными Т-клетками, требует коstimуляции другими специфическими лигандами, называемыми коstimуляторами, которые экспрессируются на поверхности антигенпрезентирующей клетки. С другой стороны, активация цитотоксичной Т-клетки обычно требует IL-2 - цитокина, секретируемого активированными хелперными Т-клетками.

Путь PD-1

Важные отрицательный коstimулирующий сигнал, регулирующий активацию Т-клеток, обеспечивается рецептором запрограммированной гибели-1 (PD-1) (CD279) и его партнерами по связыванию с лигандом PD-L1 (B7-H1, CD274) и PD-L2 (B7-DC, CD273). Отрицательная регулирующая роль PD-1 была обнаружена при помощи нокаутов PD-1 (*Pdcd1*^{-/-}), которые склонны к аутоиммунитету. Nishimura et al, *Immunity* 11: 141-51 (1999); Nishimura et al., *Science* 291: 319-22 (2001). PD-1 связан с CD28 и CTLA-4, но в нем отсутствует ближний к мембране цистеин, обеспечивающий возможность гомодимеризации. Цитоплазматический домен PD-1 содержит иммунорецепторный тирозинсвязывающий ингибирующий мотив (ITIM, V/IxYxxL/V). PD-1 связывается только с PD-L1 и PD-L2. Freeman et al., *J. Exp. Med.* 192: 1-9 (2000); Dong et al., *Nature Med.* 5: 1365-1369 (1999); Latchman et al, *Nature Immunol* 2: 261-268 (2001); Tseng et al., *J. Exp. Med.* 193: 839-846 (2001).

PD-1 может экспрессироваться на Т-клетках, В-клетках, природных киллерных Т-клетках, активированных моноцитах и дендритных клетках (DC). PD-1 экспрессируется активированными, не нестимулированными человеческими Т-клетками CD4⁺ и CD8⁺, В-клетками и миелоидными клетками. В этом состоит отличие от более ограниченной экспрессии CD28 и CTLA-4. Nishimura et al, *Int. Immunol.* 8: 773-80 (1996); Boettler et al., *J. Virol.* 80: 3532-40 (2006). Существует как минимум 4 варианта PD-1, которые были клонированы из активированных человеческих Т-клеток, включая транскрипты, в которых отсутствуют (i) экзон 2, (ii) экзон 3, (iii) экзоны 2 и 3 или (iv) экзоны с 2 по 4. Nielsen et al., *Cell. Immunol.* 235: 109 - 16 (2005). За исключением PD-1 Δ ex3, все варианты экспрессируются в такой же мере, как и PD-1 полной длины в покоем мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC). Экспрессия всех вариантов в значительной мере индуцируется после активации человеческих Т-клеток антителами против CD3 и против CD28. В вариантах PD-1 Δ ex3 отсутствует трансмембранный домен и они подобны растворимому CTLA-4, играющему важную роль в аутоиммунитете. Ueda et al., *Nature* 423: 506-11 (2003). Этим вариантом богата синовиальная жидкость и сыворотка пациентов с ревматоидным артритом. Wan et al., *J. Immunol.* 177: 8844-50 (2006). Два лиганда PD-1 отличаются по характеру экспрессии. PD-L1 конститутивно экспрессируется на мышечных Т- и В-клетках, DC, макрофагах, мезенхимальных стволовых клетках и мастоцитах костного мозга. Yamazaki et al., *J. Immunol.* 169: 5538-45 (2002). PD-L1 экспрессируется на многих различных негемопоэтических клетках (например, клетках роговицы, легких, сосудистого эпителия, непаренхиматозных клетках печени, мезенхимальных стволовых клетках, панкреатических островках, плацентарных синцитиотрофобластах, кератиноцитах и т. п.) [Keir et al, *Annu. Rev. Immunol.* 26: 677 -704 (2008)] и подвергается повышенной регуляции на многих типах клеток после активации. Интерфероны IFN как типа I, так и типа II вызывают повышение PD-L1. Eppihimer et al., *Microcirculation* 9: 133 - 45 (2002); Schreiner et al., *J. Neuroimmunol* 155: 172-82 (2004). Экспрессия PD-L1 в линиях клеток снижается при ингибировании MyD88, TRAF6 и MEK. Liu et al., *Blood* 110: 296-304 (2007). JAK2 также участвует в индукции PD-L1. Lee et al., *FEBS Lett.* 580: 755-62 (2006); Liu et al., *Blood* 110: 296-304 (2007). Потеря или ингибирование гомолога фосфатазы и тензина (PTEN), клеточной фосфатазы, которая модифицирует фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K) и сигнал Akt, повышала посттранскрипционную экспрессию PD-L1 при раке. Parsa et al., *Nat. Med.* 13: 84-88 (2007).

Экспрессия PD-L2 более ограничена по сравнению с PD-L1. PD-L2 индуцибельно экспрессируется

на DC, макрофагах и мастоцитах костного мозга. PD-L2 также экспрессируется приблизительно на половине, а то и двух третях покоящихся брюшинных B1-клетках, но не на традиционных B2 B-клетках. Zhong et al., *Eur. J. Immunol.* 37: 2405-10 (2007). PD-L2+ B1 клетки связывают фосфатидилхолин и могут быть важны для природного иммунного ответа на бактериальные антигены. Индукция PD-L2 со стороны IFN- γ частично зависит от NF-KB. Liang et al., *Eur. J. Immunol.* 33: 2706-16 (2003). PD-L2 также может индуцироваться на моноцитах и макрофагах GM-CF, IL-4 и IFN- γ . Yamazaki et al., *J. Immunol.* 169: 5538-45 (2002); Loke et al., *PNAS* 100: 5336-41 (2003).

Сигнал PD-1, как правило, больше влияет на выработку цитокина, чем на пролиферацию клеток, со значительным влиянием на выработку IFN- γ , TNF- α и IL-2. Опосредованный PD-1 ингибиторный сигнал также зависит от силы сигнала TCR, причем большее ингибирование обеспечивается при более низких уровнях стимуляции TCR. Это снижение может быть преодолено путем костимуляции через CD28 [Freeman et al., *J. Exp. Med.* 192: 1027-34 (2000)] или присутствия IL-2 [Carter et al., *Eur. J. Immunol.* 32: 634-43 (2002)].

Появляется все больше свидетельств того, что сигнал через PD-L1 и PD-L2 может быть двунаправленным. То есть, помимо модификации сигнала TCR или BCR, сигнал также может доставляться обратно к клеткам, экспрессирующим PD-L1 и PD-L2. Хотя обработка дендритных клеток природным человеческим антителом против PD-L2, выделенным из организма пациента с макроглобулинемией Вальденстрема, не обнаружила повышающей регуляции MHC II или костимулирующих молекул B7, такие клетки вырабатывали большее количество провоспалительных цитокинов, в частности, TNF- α и IL-6, и стимулировали пролиферацию Т-клеток. Nguyen et al., *J. Exp. Med.* 196: 1393-98 (2002). Лечение мышей этих антителом также (1) повышало сопротивление пересаженной меланоме b16 и быстро индуцировало опухолеспецифические CTL. Radhakrishnan et al., *J. Immunol.* 170: 1830-38 (2003); Radhakrishnan et al., *Cancer Res.* 64: 4965-72 (2004); Heckman et al., *Eur. J. Immunol.* 37: 1827-35 (2007); (2) блокировало развитие воспалительной болезни дыхательных путей в мышинной модели аллергической астмы. Radhakrishnan et al., *J. Immunol.* 173: 1360-65 (2004); Radhakrishnan et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* UJy. 668-74 (2005).

Еще одно свидетельство обратного сигнала в дендритные клетки ("DC") было получено по результатам исследований костномозговых DC, культивированных с растворимым PD-1 (домен PD-1 EC, слитый с константной областью Ig - "s-PD-1"). Kuipers et al., *Eur. J. Immunol.* 36: 2472-82 (2006). Этот sPD-1 ингибировал активацию DC и повышал выработку IL-10 обратимым способом благодаря введению антитела против PD-1. Кроме того, некоторые исследования выявили рецептор для PD-L1 или PD-L2, независимый от PD-1. B7.1 уже был определен как партнер по связыванию для PD-L1. Butte et al., *Immunity* 27: 111-22 (2007). Исследования химического сшивания показывают, что PD-L1 и B7.1 могут взаимодействовать через их IgV-подобные домены. Взаимодействие B7.1 :PD-L1 может вызывать ингибиторный сигнал в Т-клетках. Сшивание PD-L1 на CD4+ Т-клетках при помощи B7.1 или сшивание B7.1 на CD4+ Т-клетках при помощи PD-L1 обеспечивает ингибиторный сигнал. Т-клетки с отсутствующими CD28 и CTLA-4 демонстрируют сниженную пролиферацию и выработку цитокинов при стимулировании шариками, покрытыми антителом против CD3 плюс B7.1. В Т-клетках с отсутствием всех рецепторов для B7.1 (т.е., CD28, CTLA-4 и PD-L1) ингибирование пролиферации Т-клеток и выработки цитокинов шариками, покрытыми антителом против CD3 плюс B7.1, прекращалось. Это указывает на то, что B7.1 специфично действует через PD-L1 на Т-клетку в отсутствие CD28 и CTLA-4. Подобным образом Т-клетки с отсутствующим PD-1 демонстрировали сниженную пролиферацию и выработку цитокинов при стимулировании в присутствии шариков, покрытых антителом против CD3 плюс PD-L1, демонстрируя ингибирующее воздействие сшивания PD-L1 на B7.1 на Т-клетки. При отсутствии в Т-клетках всех известных рецепторов для PD-L1 (т.е., при отсутствии PD-1 и B7.1) ослабление пролиферации Т-клеток шариками, покрытыми антителом против CD3 плюс PD-L1, прекращается. Таким образом, PD-L1 может оказывать ингибиторное воздействие на Т-клетки через B7.1 или PD-1.

Прямое взаимодействие между B7.1 и PD-L1 указывает на то, что нынешнее понимание костимуляции является неполным и подчеркивает значение для экспрессии этих молекул на Т-клетках. Исследования PD-L1^{-/-} Т-клеток показывают, что PD-L1 на Т-клетках может снижать выработку цитокинов Т-клеткой. Latchman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 10691-96 (2004). Поскольку и PD-L1, и B7.1 экспрессируются на Т-клетках, В-клетках, DC и макрофагах, существует потенциал для направленного взаимодействия между B7.1 и PD-L1 на этих типах клеток. Кроме того, PD-L1 на негемопоэтических клетках может взаимодействовать с B7.1, а также PD-1 на Т-клетках, что вызывает вопрос: участвует ли PD-L1 в их регуляции. Одним из возможных объяснений ингибиторного влияния взаимодействия B7.1: PD-L1 является то, что PD-L1 Т-клеток может улавливать или изолировать APC B7.1 от взаимодействия с CD28.

В результате антагонизм сигнала через PD-L1, включающий блокирование взаимодействия PD-L1 с PD-1, B7.1, или и с тем, и с другим, таким образом, не давая PD-L1 отправить отрицательный костимулирующий сигнал на Т-клетки и другие антиген-представляющие клетки, возможно, повышает иммунитет в ответ на инфекцию (например, острую или хроническую) и резистентность опухоли к иммунной системе. Кроме того, антитела против PD-L1 согласно настоящему изобретению могут комбинироваться

с антагонистами других компонентов сигнала PD-1 : PD-L1, например, антагониста антител против PD-1 и против PD-L2.

В частности, ингибирование сигнала PD-L1 было предложено в качестве средства повышения резистентности Т-клетки для лечения рака и к инфекциям, включая как острые, так и хронические (например, устойчивые) инфекции.

Ингибиторы, блокирующие взаимодействие PD-L1 : PD-1, известны, помимо прочих источников, из документов WO 2001014557, WO 2002086083, WO 2007005874, WO 2010036959, WO 2010077634 и WO 2011066389. Однако, поскольку оптимальное терапевтическое средство, направленное на мишень на этом пути, еще ожидает выхода на рынок, в области медицины существует значительный неудовлетворенный спрос.

Описание изобретения

Целью настоящего изобретения является обеспечение антител против PD-L1, и композиции, содержащие такие антитела, и их применении для усиления функции Т-клеток для повышающей регуляции клеточно-опосредованных иммунных реакций и для лечения связанных с дисфункцией Т-клеток нарушений. Неожиданно было обнаружено, что антитела против PD-L1 согласно настоящему изобретению, обладающие антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичностью (ADCC), непосредственно воздействуют на включающие PD-L1 опухолевые клетки, вызывая их лизис без проявлений всякой значительной токсичности. Кроме того, эти антитела не только блокируют взаимодействие между человеческим PD-L1 и человеческим PD-1, но и взаимодействие между соответствующими белками мыши и яванского макака.

В одном варианте воплощения изобретение относится к выделенному антителу против PD-L1 или его антигенсвязывающему фрагменту, включающему последовательность вариабельной области тяжелой цепи и легкой цепи, причем:

(а) тяжелая цепь включает HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, причем также (i) последовательность HVR-H1 представляет собой $X_1YX_2MX_3$ (SEQ ID NO: 1); (ii) последовательность HVR-H2 представляет собой $SIYPSGGX_4TFYADX_5VKG$ (SEQ ID NO: 2); (iii) последовательность HVR-H3 представляет собой $IKLGTVTTVX_6Y$, и (SEQ ID NO: 3);

(b) легкая цепь включает HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, причем также (iv) последовательность HVR-L1 представляет собой $TGTX_7X_8DVGX_9YNYVS$ (SEQ ID NO: 8); (v) последовательность HVR-L2 представляет собой $X_{10}VX_{11}X_{12}RPS$ (SEQ ID NO: 9); (vi) последовательность HVR-L3 представляет собой $SSX_{13}TX_{14}X_{15}X_{16}X_{17}RV$ (SEQ ID NO: 10);

причем также

X_1 представляет собой M, I или S;

X_2 представляет собой L, M или I;

X_3 представляет собой F или M;

X_4 представляет собой I;

X_5 представляет собой S или T;

X_6 представляет собой D;

X_7 представляет собой S;

X_8 представляет собой S;

X_9 представляет собой A или G;

X_{10} представляет собой D;

X_{11} представляет собой S;

X_{12} представляет собой N;

X_{13} представляет собой Y;

X_{14} представляет собой S;

X_{15} представляет собой S;

X_{16} представляет собой S;

X_{17} представляет собой T.

В предпочтительном варианте это антитело или его фрагмент отличается тем, что X_1 представляет собой S; X_2 представляет собой I; X_3 представляет собой M; X_5 представляет собой T; X_9 представляет собой G.

В наиболее предпочтительном варианте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент характеризуется тем что:

(а) каркасные последовательности вариабельных областей тяжелой цепи являются следующими:

(i) HC-FR1 представляет собой EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 4);

(ii) HC-FR2 представляет собой WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO: 5);

(iii) HC-FR3 представляет собой RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 6);

(iv) HC-FR4 представляет собой WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 7) и

(b) каркасные последовательности вариабельных областей легкой цепи являются следующими:

(i) LC-FR1 представляет собой QSALTQPASVSGSPQSITISC (SEQ ID NO: 11); (ii) LC-FR2 представляет собой WYQQHPGKAPKLMY (SEQ ID NO: 12); (iii) LC-FR3 представляет собой GVSNNRFSG-

SKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC (SEQ ID NO: 13);

(iv) LC-FR4 представляет собой FGTGTKVTVL (SEQ ID NO: 14).

Фрагмент вышеуказанных антител может также включать C_L , C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} домены.

В предпочтительном варианте это антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также могут включать человеческую или мышиную константную область, причем константная область представляет собой IgG1.

Другим объектом данного изобретения является антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее/включающий последовательность вариабельной области тяжелой цепи и последовательность вариабельной области легкой цепи, где:

а) тяжелая цепь включает последовательность: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDN

NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTVDY WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 24) и

б) легкая цепь включает последовательность: QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVG-GYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCS-SYTSSSTRVFGTGTGKVTVL (SEQ ID NO: 25).

Наконец третьим объектом данного изобретения является антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающее/включающий последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 32, и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 33. Описанные в заявке антитела или его антигенсвязывающие фрагменты способны блокировать взаимодействие между PD-L1 человека, мыши или яванского макака и соответствующими рецепторами PD-L1 человека, мыши или яванского макака.

Еще одним объектом данного изобретения является композиция для лечения рака или снижения резистентности опухоли к атаке иммунной системой, которая включает указанные антитела против PD-L1 или их антигенсвязывающие фрагменты и как минимум один фармацевтически приемлемый носитель.

Изобретение относится к применению этих антител против PD-L1 и их антигенсвязывающих фрагментов, которые вызывают антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC), для лечения рака, а также для снижения резистентности опухоли к атаке иммунной системой.

В одном из вариантов осуществления изобретения применяется комбинация описанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с дополнительным терапевтическим средством или вакциной, выбранным/выбранными из группы, состоящей из гемцитабина, циклофосфида, комбинации 5-фторурацила и оксалиплатина или Stimavax.

Эта комбинация предпочтительно представляет собой жидкую композицию, где фармацевтически приемлемые носители представляют собой 10 mM ацетат, 5,1% (мас./об.) маннит, 1,4 mM метионин, 0,05% (мас./об.) Tween 20.

Рак, который может лечиться с помощью вышеописанных антител, может относиться к группе, включающей: рак молочной железы, легких, толстой кишки, яичника, меланому, рак мочевого пузыря, почек, печени, слюнной железы, желудка, глиомы, рак щитовидной железы, вилочковой железы, эпителия, головы и шеи, желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы.

Равноценно с вышеупомянутым способом усиления функции Т-клеток, лечения связанного с Т-клетками дисфункционального нарушения или лечения рака антитела против PD-L1 или композиции, как описано выше и далее, могут использоваться для производства медикамента для усиления функции Т-клеток, лечения связанного с Т-клетками дисфункционального нарушения или лечения рака

Определения

"Дисфункция" в контексте иммунной дисфункции означает состояние снижения иммунной реакции на антигенную стимуляцию. Термин включает общие элементы истощения и/или анергии, при которых может происходить распознавание антигена, однако вызываемая иммунная реакция неэффективна для контроля над инфекцией или ростом опухоли.

"Усиление функции Т-клеток" означает индукцию, вызывание или стимулирование устойчивой или усиленной биологической функции Т-клетки или восстановление или реактивацию истощенных или неактивных Т-клеток. Примерами усиления функции Т-клеток являются: повышенная секреция интерферона из $CD8^+$ Т-клеток, повышенная пролиферация, повышенная реакция на антиген (например, элиминация вируса или патогена) относительно показателей до вмешательства. Уровень усиления может составлять как минимум 50%, в альтернативном варианте - 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200%. Способ измерения этого усиления известен специалистам в данной области.

"Связанное с дисфункцией Т-клеток нарушение" представляет собой нарушение или состояние Т-клеток, характеризующееся сниженной реакцией на антигенную стимуляцию. Связанным с Т-клетками дисфункциональным нарушением может быть нарушение, конкретно связанное с неприемлемо повышенным сигналом через PD-1. В другом варианте связанным с дисфункцией Т-клеток нарушением является нарушение, при котором Т-клетки являются анергическими или обладают сниженной способностью к секретированию цитокинов, пролиферации или цитолитической активности. В конкретном аспекте снижение реакции приводит к неэффективности контроля над патогеном или опухолью, экспрессирующей иммуноген. Примерами связанных с дисфункцией Т-клеток нарушений, характеризующихся дис-

функцией Т-клеток, могут быть неразрешенная острая инфекция, хроническая инфекция и резистентность опухоли.

"Резистентность опухоли" означает процесс, при котором опухоли уклоняются от иммунного распознавания и элиминации. Таким образом, как терапевтическое понятие, резистентность опухоли поддается "лечению", когда такое уклонение ослабляется, и опухоли распознаются и атакуются иммунной системой. Примерами распознавания опухолей являются связывание опухоли, уменьшение размеров опухоли и элиминация опухоли.

Термин "вакцина" в контексте данного описания включает любой непатогенный иммуноген, который, будучи инокулированным в организм-хозяин, вызывает защитный иммунитет против конкретного патогена. Вакцины могут приобретать различные формы. Вакцины могут быть целыми организмами, имеющими общие антигены с патогеном, но сами не являются патогенными (например, коровья оспа). Вакцины также могут быть приготовлены из убитых (например, вакцина против полиомиелита Salk) или ослабленных (с потерей способности к вызыванию болезни - например, вакцина против полиомиелита Sabin). Вакцины также могут приготавливаться из очищенных макромолекул, выделенных из патогенного организма. Например, токсидные вакцины (например, столбняка и дифтерии), содержащие неактивную форму растворимого бактериального токсина и обеспечивающие в результате выработку антител против токсина, но не иммунитет к интактной бактерии. Субъединичные вакцины (например, гепатит В) содержат только один иммуногенный белок, выделенный из нужного патогена. Гаптенные конъюгатные вакцины присоединяют некоторые углеводные или полипептидные эпитопы, выделенные из нужного патогена, к иммуногенным носителям, таким, как столбнячный токсин. Эти методики предусматривают главным образом применение эпитопов, таких, как гаптены, для индукции выработки антитела, которые затем распознают один эпитоп в природном патогене. Однако для максимальной эффективности такие вакцины должны включать В- и Т-клеточные эпитопы, и должны выбираться Т-клеточные эпитопы для гарантии возможности их распознавания, презентации и реакции на них со стороны иммунных систем организмов-хозяев. В ДНК-вакцинах используется способность клеток-хозяев к захвату и экспрессии ДНК, кодирующей патогенные белки, которую вводят внутримышечно. Реакция хозяина на иммуногены может усиливаться при введении в форме смеси с адъювантами. Иммунные адъюванты функционируют одним или несколькими из следующих способов: (1) продления удерживания иммуногена, (2) увеличения эффективного размера иммуногена (и, следовательно, активации фагоцитоза и презентации макрофагам), (3) стимуляции притока макрофагов других иммунных клеток к месту инъекции или (4) активации местной выработки цитокинов и других видов иммунологической активности. Примерами адъювантов могут быть: полный адъювант Фрейнда (CFA), соли алюминия и белки на основе микобактерий, такие, как мурамилди- или трипептиды.

Термин "антитело" включает моноклональные антитела (включая антитела полной длины, включающие Fc-область иммуноглобулина), композиции антител с полиэпитопной специфичностью, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, диатела и одноцепочечные молекулы, а также фрагменты антител (например, Fab, F(ab')₂, и Fv). Термин "иммуноглобулин" (Ig) в данном описании применяется взаимозаменяемо с термином "антитело". Основной 4-цепочечной единицей антитела является гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Антитело IgM состоит из 5 основных гетеротетрамерных единиц вместе с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и содержит 10 антигенсвязывающих участков, в то время, как антитела IgA включают 2-5 основных 4-цепочечных единиц, которые могут полимеризоваться для образования поливалентных совокупностей в комбинации с J-цепью. В случае IgGs 4-цепочечная единица, как правило, составляет около 150 000 Дальтон. Каждая L-цепь связывается с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время, как две H-цепи связываются между собой одним или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изотипа H-цепи. Каждая H-или L-цепь также имеет расположенные с равными интервалами межцепочечные дисульфидные мостики. Каждая H-цепь на N-конце имеет вариабельный домен (V_H) с последующими тремя константными доменами (C_H) для каждой из α- и γ-цепей и четырьмя C_H доменами для μ- и ε-изотипов. Каждая L-цепь на N-конце имеет вариабельный домен (V_L) с последующим константным доменом на другом конце. V_L выравнивается с V_H, и C_L выравнивается с первым константным доменом тяжелой цепи (C_{H1}). Предполагается, что конкретные аминокислотные остатки образуют поверхность контакта между вариабельными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. Образование пары V_H и V_L формирует один антигенсвязывающий участок. Структура и свойства разных классов антител представлены, например, в публикации Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, стр. 71 и глава 6. L-цепь любых видов позвоночных может быть отнесена к одному из двух четко отличающихся типов, называемых каппа и лямбда, на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (CH) иммуноглобулины могут быть отнесены к различным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющих тяжелые цепи, обозначаемые как α, δ, ε, γ и μ соответственно. Классы γ и α далее подразделяются на подклассы на

основе относительно небольших различий в последовательности СН и функции; например, у человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3, IgG4, IgA1 и IgK1.

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое идентифицировано, отделено и/или извлечено из компонента среды, где оно вырабатывается (например, природное или рекомбинантное). Предпочтительно выделенный полипептид не ассоциируется ни с какими другими компонентами из среды, где он вырабатывается. Загрязняющие компоненты среды, где он продуцируется, такие как компоненты, полученные из рекомбинантных трансфицированных клеток, представляют собой материалы, которые препятствуют применению антитела для исследования, диагностики или лечения, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах полипептид очищают: (1) до более, чем 95% по массе антитела, как определяют, например, способом Лоури, в некоторых вариантах - до более, чем 99% по массе; (1) до степени, достаточной для получения как минимум 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с применением секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности при помощи SDS-PAGE в невосстановительных или восстановительных условиях с использованием кумасси синего или, предпочтительно, окрашивания серебром. Выделенное антитело включает антитело в рекомбинантных клетках *in situ*, поскольку отсутствует как минимум один компонент условий естественного окружения антитела. Однако, как правило, выделенный полипептид или антитело получают с применением как минимум одного этапа очистки.

"Вариабельная область" или "вариабельный домен" антитела относится к аминоконцевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи могут называться "VH" и "VL", соответственно. Эти домены, как правило, являются наиболее вариабельными частями антитела (относительно других антител того же класса) и содержат антигенсвязывающие участки.

Термин "вариабельный" означает, что последовательности определенных сегментов вариабельных доменов значительно отличаются среди антител. V-домен опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела к его конкретному антигену. Однако вариабельность не является равномерной на протяжении всего участка вариабельных доменов. Вместо этого она сконцентрирована в трех сегментах, называемых гипервариабельными областями (HVR) в вариабельных доменах, как легкой цепи, так и тяжелой цепи. Более высококонсервативные участки вариабельных доменов называют каркасными областями (FR). Каждый из вариабельных доменов нативных тяжелых и легких цепей включает четыре FR, главным образом принимающих конфигурацию бета-слоев, соединенных тремя HVR, которые формируют петли, объединяющие структуру бета-слоев и в некоторых случаях формирующие ее часть. HVR в каждой цепи расположены вместе в непосредственной близости от FR-областей и, совместно с HVR другой цепи, участвуют в формировании антигенсвязывающего участка антител (см. Kabat et al., *Sequences of Immunological Interest*, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Константные домены не вовлечены непосредственно в связывание антитела с антигеном, но они проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антителозависимой клеточной цитотоксичности.

Термин "моноклональное антитело" в контексте данного описания относится к антителу из совокупности по сути гомогенных антител, т.е., отдельные антитела, составляющие совокупность, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризаций, амидирования), которые могут быть представлены в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, и они направлены против одного антигенного участка. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые, как правило, включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело в препарате моноклонального антитела направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к их специфичности, моноклональные антитела являются преимущественными в том, что они синтезированы из своей гибридомной культуры, не содержащей других иммуноглобулинов. Определение "моноклональный" указывает на характер антитела как полученного из по сути гомогенной совокупности антител, и не подразумевает того, что антитело должно быть получено каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, предназначенные для применения согласно настоящему изобретению, можно получать множеством способов, включая, например, способ гибридом (например, Kohler and Milstein., *Nature*, 256: 495-97 (1975); Hongo et al., *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)), способы рекомбинантных ДНК (см., например, Патент США № 4816567), технологии фагового дисплея (см., например, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004) и Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004) и технологии продуцирования антитела человека или антител, подобных антителам человека, у животных, которые имеют части локусов или генов иммуноглобулинов человека, кодирующие последовательности иммуноглобулинов, или все эти локусы или гены (см., например, документы WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7: 33 (1993); Патенты США №№ 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425 и 5661016; Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) и Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

"Фрагмент антитела" включает часть интактного антитела, предпочтительно антигенсвязывающую и/или вариабельную область интактного антитела. Примерами фрагментов антител могут быть фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела (см. Патент США 564170, Пример 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8NO: 1057-1062 [1995]); одноцепочечные молекулы антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Расщепление антител папаином образует два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых "Fab" фрагментами, и остаточный "Fc" фрагмент, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Fab-фрагмент состоит из целой L-цепи вместе с доменом вариабельной области H-цепи (V_H) и первым константным доменом одной тяжелой цепи (C_{H1}). Каждый Fab-фрагмент является одновалентным в отношении связывания антигена, т.е. он обладает одним антигенсвязывающим участком. Обработка антитела пепсином приводит к одному крупному F(ab')₂ фрагменту, который приблизительно соответствует двум связанным дисульфидом Fab-фрагментам, имеющим различную антигенсвязывающую активность, и, кроме того, способен к перекрестному связыванию антигена. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов наличием нескольких дополнительных остатков на карбокси-конце C_{H1} домена, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH является обозначением для Fab', в котором остаток(ки) цистеина константных доменов обладает свободной тиольной группой. F(ab')₂-фрагменты антител изначально были получены в качестве пар Fab'-фрагментов, которые обладают шарнирными цистеинами между ними. Также известно другое химическое связывание фрагментов антител.

Fc-фрагмент включает карбокси-концевые части обеих H-цепей, удерживаемые вместе дисульфидными. Эффекторные функции антител определяются последовательностями Fc-участка, который также является частью, распознаваемой Fc-рецепторами (FcR), встречающимися на определенных типах клеток.

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный антигенраспознающий и антигенсвязывающий сайт. Этот фрагмент состоит из димера доменов, состоящих из одной вариабельной области тяжелой цепи и одной вариабельной области легкой цепи, связанных прочной нековалентной связью. Сворачивание этих двух доменов образует шесть гипервариабельных петель (3 петли в каждой из H- и L-цепи), которые предоставляют аминокислотные остатки для связывания антигена и обеспечивают специфичность связывания антигена антителом. Однако даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три области HVR, специфичных к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем целый участок связывания.

"Одноцепочечные Fv", также сокращенно указываемые как "sFv" или "scFv", представляют собой фрагменты антител, которые включают V_H и V_L-домены антитела, соединенные в единую полипептидную цепь. Предпочтительно полипептид sFv также включает полипептидный линкер между V_H и V_L доменами, что позволяет sFv формировать нужную структуру для связывания антигена. Для обзора sFv см. Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). "Функциональные фрагменты" антител согласно изобретению включают часть интактного антитела, как правило, включающую антигенсвязывающую или вариабельную область интактного антитела или F-область антитела, которая сохраняет способность связывания FcR или обладает модифицированной способностью связывания FcR. Примеры фрагментов антитела включают линейное антитело, одноцепочечное антитело молекул и полиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антитела.

Термин "диатела" относится к небольшим фрагментам антител, которые получают путем построения sFv фрагментов (см. предыдущий абзац) с короткими линкерами (приблизительно 5-10 остатков) между V_H и V_L доменами, так, чтобы достигалось образование пар V-доменов между цепями, а не внутри цепей, с образованием, таким образом, двухвалентного фрагмента, т.е., фрагмента, имеющего два антигенсвязывающих сайта. Биспецифические антитела-димеры представляют собой гетеродимеры двух "пересекающихся" sFv-фрагментов, в которых V_H- и V_L-домены двух антител присутствуют на различных полипептидных цепях. Антитела-димеры более подробно описаны, например, в документах EP 404097; WO 93/11161; Hollinger et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993).

Термин "нанотела" относится к однодоменным антителам, являющимся фрагментами антител, которые состоят из одного мономерного вариабельного домена антитела. Подобно целому антителу, они способны селективно связываться со специфическим антигеном. Обладая молекулярной массой всего 12-15 кДа, однодоменные антитела являются намного меньшими, чем обычные антитела (150-160 кДа). Первые однодоменные антитела были получены путем инженерии из тяжелоцепочечных антител, обнаруженных у верблюдовых. Gibbs, W. Wayt (August 2005). "Nanobodies". *Scientific American Magazine*.

Моноклональные антитела согласно настоящему документу конкретно включают "химерные" анти-

тела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как оставшаяся часть цепи(ей) является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они проявляют требуемую биологическую активность (Патент США № 4816567; Morrison et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). В контексте данного описания термин "гуманизированное антитело" применяется для обозначения субпопуляции "химерных антител".

"Гуманизированные" формы отличных от человеческих (например, мышиных) антител являются химерными антителами, содержащими минимальную последовательность, полученную из отличного от человеческого иммуноглобулина. В одном варианте гуманизированное антитело является человеческим иммуноглобулином (реципиентным антителом), в котором остатки из HVR реципиента заменены остатками HVR отличного от человека вида (донорное антитело), такого как мышь, крыса, кролик или отличный от человека примат, имеющими требуемую специфичность, аффинность и потенциал. В некоторых случаях каркасные ("FR") остатки человеческого иммуноглобулина заменяют соответствующими отличными от человеческих остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут включать остатки, которые не встречаются ни в реципиентном антителе, ни в донорном антителе. Эти модификации могут быть проведены для дополнительного улучшения характеристик антитела, таких как аффинность связывания. В целом гуманизированное антитело должно включать по сути все из как минимум одного, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по сути все из гипервариабельных петель соответствуют гипервариабельным петлям последовательности отличного от человеческого иммуноглобулина, и все или по сути все из областей FR представляют собой области последовательности человеческого иммуноглобулина, хотя FR-области могут включать замещения одного или нескольких остатков FR, которые улучшают характеристики антитела, такие как аффинность связывания, изомеризация, иммуногенность и т.д. Количество этих аминокислотных замен в FR, как правило, составляет не более 6 в H-цепи, и не более 3 в L-цепи. Гуманизированное антитело необязательно также включает как минимум часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, константной области иммуноглобулина человека. Для более подробного ознакомления см., например, Jones et al, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-329 (1988) и Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992). См. также, например, Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995); Hurler and Gross, Curr. Opin. Biotech. 5: 428-433 (1994) и патенты США №№ 6982321 и 7087409.

"Человеческое антитело" представляет собой антитело, включающее аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности антитела, вырабатываемого человеком и/или полученного с использованием любого из способов получения антител человека, как описано в настоящем документе. Это определение человеческого антитела специально исключает гуманизированное антитело, включающее отличные от человеческих антигенсвязывающие остатки. Человеческие антитела могут быть получены с использованием различных способов, известных в данной области, включая библиотеки фагового дисплея. Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581 (1991). Также для получения моноклональных антител человека доступны способы, описанные в Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol. 147(1): 86-95 (1991). Также см. van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368 - 74 (2001). Человеческие антитела можно получать введением антигена трансгенному животному, которое модифицировано для продукции таких антител в ответ на иммунизацию антигеном, и эндогенные локусы которых заблокированы, например, иммунизированных ксеномышей (см., например, патенты США №№ 6075181 и 6150584, касающиеся технологии XENOMOUSE™). См. также, например, публикацию Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557-3562 (2006), касающуюся человеческих антител, полученных с применением технологии В-клеточных гибридом человека.

Термин "гипервариабельная область", "HVR" или "HV" в контексте этого описания относится к областям переменного домена антитела, которые обладают гипервариабельными последовательностями и/или образуют структурно определенные петли. Как правило, антитела включают шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). В нативных антителах H3 и L3 проявляют наибольшее многообразие из шести HVR, и, в частности, считается, что H3 играет уникальную роль в обеспечении специфичности антител. См., например, Xu et al. Immunity 13: 37-45 (2000); Johnson and Wu in Methods in Molecular Biology 248: 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). Действительно, природные антитела верблюдовых, состоящие только из тяжелой цепи, являются функциональными и стабильными в отсутствие легкой цепи. См., например, Hamers-Casterman et al., Nature 363: 446 - 448 (1993); Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3: 733-736 (1996).

В настоящем документе используется и охватывается ряд определений HVR. Определяющие комплементарности области (CDR) по Kabat основаны на вариабельности последовательности и используются наиболее широко (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed.

Служба общественного здравоохранения, Национальные институты здравоохранения, Bethesda,

MD. (1991)). В то же время Chothia ссылается на расположение структурных петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)). Области HVR AbM представляют компромисс между HVR Kabat и структурными петлями Chothia, и они используются программой для моделирования антител Oxford Molecular's AbM.

"Контактные" HVR основываются на анализе доступных комплексных кристаллических структур. Остатки из каждой из этих HVR указаны ниже.

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

Области HVR могут включать "удлиненные HVR" следующим образом: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 или 89-96 (L3) в VL и 26-35 (H1), 50-65 или 49-65 (H2) и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3) в VH. Остатки переменных доменов пронумерованы согласно Kabat et al., как указано выше, для каждого из этих определений.

Выражения "нумерация остатков переменных доменов по Kabat" или "нумерация аминокислотных позиций по Kabat" и их варианты относятся к системе нумерации, используемой для переменных доменов тяжелой цепи или переменных доменов легкой цепи из собрания антител в Kabat et al., как указано выше. Согласно этой системе нумерации действительная линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению FR или HVR переменного домена, или вставке в них. Например, переменный домен тяжелой цепи может включать вставку одной аминокислоты (остаток 52a согласно Kabat) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.п. согласно Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Kabat может определяться для данного антитела путем выравнивания в областях гомологии последовательности антитела со "стандартной" пронумерованной по Kabat последовательностью.

"Каркасные" или "FR" остатки представляют собой остатки переменного домена, отличные от остатков HVR, как определяется в данном документе. "Консенсусного каркаса человека" или "акцепторный человеческий каркас" является каркасом, представляющим наиболее часто встречающиеся аминокислотные остатки при выборе последовательностей каркасной области VL или VH иммуноглобулина человека. Как правило, выбор последовательностей VL или VH иммуноглобулина человека проводят из подгруппы последовательностей переменных доменов. Как правило, подгруппа последовательностей представляет собой подгруппу согласно Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Служба общественного здравоохранения, Национальные институты здравоохранения, Bethesda, MD (1991). Примеры включены для VL, подгруппа может быть подгруппой каппа I, каппа II, каппа III или каппа IV, согласно Kabat et al., как указано выше. Кроме того, для VH подгруппа может быть подгруппой I, подгруппой II или подгруппой III согласно Kabat et al., как указано выше. В альтернативном варианте человеческий консенсусный каркас может быть получен из вышеупомянутых последовательностей, в которых конкретные остатки, такие как человеческий каркасный остаток, выбраны на основе гомологии с донорным каркасом путем выравнивания донорной каркасной последовательности с собранием различных человеческих каркасных последовательностей. Акцепторный человеческий каркас, "полученный из" каркаса иммуноглобулина человека или консенсусного каркаса человека, может включать такую же его аминокислотную последовательность, или же может содержать существующие изменения аминокислотных последовательностей. В некоторых вариантах количество существующих аминокислотных изменений составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее.

"Модификация аминокислот" в указанном положении, например, Fc-области, относится к замене или делеции указанного остатка или вставке как минимум одного аминокислотного остатка рядом с указанным остатком. Вставка "рядом" с указанным остатком означает вставку пределах одного или двух остатков от него. Вставка может быть N-концевой или C-концевой относительно указанного остатка. Предпочтительной модификацией аминокислот согласно настоящему документу является замещение.

Антитело "с созреванием аффинности" представляет собой антитело с одним или несколькими изменениями в одной или нескольких его HVR, которые приводят к повышению аффинности антитела к

антигену по сравнению с исходным антителом, которое не обладает этим изменением(ями). Антитело с созревaniem аффинности может обладать наномолярной или даже пикомолярной аффинностью к антигену-мишени. Антитела с созреванием аффинности получают способами, известными специалистам в данной области. Например, Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992) описывают созревание аффинности "перетасовкой" VH- и VL-доменов. Случайный мутагенез остатков HVR и/или каркасной области описан, например, в следующих публикациях: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169: 147-155 (1995); YáXon et al. *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7): 3310-9 (1995) и Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992).

В контексте данного описания термин "специфично связывается с" или "является специфичным к" относится к измеримому и воспроизводимому взаимодействию, такому, как связывание между мишенью и антителом, которое является определяющим для присутствия мишени в присутствии гетерогенной совокупности молекул, включая биологические молекулы. Например, антитело, которое специфично связывается с мишенью (которая может быть эпитопом), является антителом, которое связывается с этой мишенью с большей аффинностью, авидностью, быстрее и/или на более длительное время, чем связывается с другими мишенями. В одном из вариантов степень связывания антитела с несвязанной мишенью может составлять менее, чем приблизительно 10% связывания антитела с мишенью, согласно измерению, например, при помощи радиоиммуноанализа (RIA). В некоторых вариантах антитело, которое специфично связывается с мишенью, имеет константу диссоциации (K_D) $< 1 \times 10^{-6} \text{M}$, $< 1 \times 10^{-7} \text{M}$, $< 1 \times 10^{-8} \text{M}$, $< 1 \times 10^{-9} \text{M}$ или $< 1 \times 10^{-10} \text{M}$. Иногда антитело специфично связывается с эпитопом на белке, который является консервативным среди белков разных типов. Специфическое связывание может также включать, хотя и не обязательно, исключительное связывание.

"Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность" или ADCC относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig, связанный с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, естественных киллерных (NK) клетках, нейтрофилах и макрофагах), позволяет этим цитотоксическим эффекторным клеткам связываться специфично с обладающей антигеном клеткой-мишенью и впоследствии уничтожать клетку-мишень посредством цитотоксинов. Антитела "вооружают" цитотоксические клетки, и они необходимы для уничтожения клетки-мишени посредством этого механизма. Основные клетки для осуществления ADCC, NK-клетки, экспрессируют только Fc γ RIII, в то время, как моноциты экспрессируют Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII. Экспрессия FcR на кроветворных клетках представлена в табл. 3 на странице 464 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Для оценки активности представляющей интерес молекулы в отношении ADCC можно проводить анализ ADCC *in vitro*, такой как анализ, описанный в патентах США №№ 5500362 или 5821337. Пригодные для таких анализов эффекторные клетки включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные киллерные (NK) клетки. В альтернативном или дополнительном варианте активность представляющей интерес молекулы в отношении ADCC можно оценивать *in vivo*, например, в модели на животных, такой как описана в публикации Clynes et al., *PNAS USA* 95: 652-656 (1998). Если в настоящем документе нет иных указаний, нумерация остатков в тяжелой цепи иммуноглобулина представляет собой нумерацию согласно индексу EU по Kabat et al., как указано выше. "Индекс EU по Kabat" относится к нумерации остатков антитела EU IgG1 человека. При многих видах рака опухолевые клетки экспрессируют высокий уровень PD-L1 на их поверхности. После связывания с PD-L1 на опухолевых клетках и связывания кристаллической (Fc) части их фрагмента с Fc-гамма-рецепторами (FCGR) на лейкоцитах антитела против PD-L1 с потенциалом ADCC могут вызывать ADCC, которая может приводить к гибели этих опухолевых клеток.

Термин "Fc-область" в данном описании применяется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-областей. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, Fc-область тяжелой цепи IgG человека определяется как участок от аминокислотного остатка в положении Cys226, или от Pro230 до его C-конца. C-концевой лизин (остаток 447 согласно системе нумерации EU) Fc-области можно быть удален, например, в ходе продукции или очистки антитела, или посредством рекомбинантной инженерии нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно композиция интактных антител может содержать совокупности антител, где все остатки K447 удалены, совокупности антител, где остатки K447 не удалены, и совокупности антител, имеющие смесь антител с остатком K447 и без него. Пригодные Fc-области с нативной последовательностью для применения в антителах включают IgG1, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 и IgG4 человека. "Fc-рецептор" или "FcR" относится к рецептору, который связывается с Fc-областью антитела. Предпочтительным FcR является FcR человека с нативной последовательностью. Кроме того, предпочтительным FcR является FcR, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII, в том числе аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов, рецепторы Fc γ RII включают Fc γ RIIA ("активирующий рецептор") и Fc γ RIIB ("ингибирующий рецептор"), которые обладают сходными аминокислотными последовательностями, отличающимися, главным образом, своими цитоплазматическими доменами. Активирующий рецептор Fc γ RIIA в своем цитоплазматическом до-

мене содержит иммунорецепторный тирозинсвязывающий активирующий мотив (ITAM). Ингибирующий рецептор FcγRIIB в своем цитоплазматическом домене содержит иммунорецепторный тирозинсвязывающий ингибирующий мотив (ITIM) (см. M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). FcR рассмотрены в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Термин "FcR" в контексте данного описания охватывает и другие FcR, включая те, которые будут выявлены в будущем.

Термин "Fc-рецептор" или "FcR" также включает неонатальный рецептор, FcRn, который отвечает за перенос материнских IgG плоду. Guyer et al., *J. Immunol.* 117: 587 (1976) and Kim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994). Способы определения связывания с FcRn известны (см., например, Ghetie and Ward, *Immunol. Today* 18(12): 592-8 (1997); Ghetie et al., *Nature Biotechnology* 15(7): 637-40 (1997); Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279(8): 6213-6 (2004); документ WO 2004/92219 (Hinton et al.). Связывание с FcRn *in vivo* и время полужизни в сыворотке высокоаффинных связывающих полипептидов

FcRn человека можно анализировать, например, у трансгенных мышей или в трансфицированных клеточных линиях человека, экспрессирующих FcRn человека, или у приматов, которым вводят полипептиды, имеющие вариант Fc-области. В документе WO 2004/42072 (Presta) описаны варианты антитела, которые повышают или снижают связывание с FcR. Также см., например, Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

"Эффекторные клетки" представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют один или несколько FcR и выполняют эффекторные функции. В одном аспекте эффекторные клетки экспрессируют как минимум FcγRIII и выполняют эффекторную функцию ADCC. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют ADCC, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), естественные киллерные (NK) клетки, моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы. Эффекторные клетки можно выделять из природного источника, например крови. Эффекторные клетки, как правило, представляют собой лимфоциты, связанные с эффекторной фазой, и функционируют для выработки цитокинов (хелперных Т-клеток), уничтожения клеток, инфицированных патогенами (цитотоксичных Т-клеток) или секретирования антител (дифференцированных В-клеток).

"Аффинность связывания", главным образом, относится к силе всех суммарных нековалентных взаимодействий между одним участком связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигена). Если не указывается иного, в контексте данного описания "аффинность связывания", "связываться с" или "связывается с" относится к свойственной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1 : 1 между участниками связывающейся пары (например, фрагментом антитела Fab и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y может быть представлена, главным образом, с помощью константы диссоциации (K_D). Аффинность можно определять обычными способами, известными в данной области, включая способы, описанные в настоящем документе. Низкоаффинные антитела, как правило, связывают антиген медленно и имеют тенденцию легко диссоциировать, а высокоаффинные антитела, как правило, связывают антиген быстрее и имеют тенденцию оставаться в связанном состоянии дольше. В данной области известно множество способов определения аффинности связывания, любые из которых можно использовать для целей настоящего изобретения. Конкретные иллюстративные и типовые варианты определения аффинности связывания описаны ниже.

" K_D " или "значение K_D " измеряют с помощью анализа связывания меченного радиоактивной меткой антигена (RIA), который осуществляют с Fab-вариантом антитела и молекулой антигена, как описано для представленного ниже анализа для измерения аффинности связывания в растворе Fabs для антигена путем уравнивания Fab минимальной концентрацией (125 I)-меченного антигена в присутствии титрованных серий немеченого антигена с последующим захватом связанного антигена с помощью покрытого антителом против Fab планшета (Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol* 293: 865-881). Для создания условий для анализа на микротитровальные планшеты (Dynex) на сутки наносят 5 мкг/мл улавливающего антитела против Fab (Cappel Labs) в 50 mM карбоната натрия (pH 9,6), а затем блокируют 2% (мас./об.) альбумин сыворотки крупного рогатого скота в PBS в течение двух-пяти часов при комнатной температуре (приблизительно 23°C). В планшете без адсорбента (Nunc #269620) 100 пМ или 26 пМ [125 I]-антигена смешивают с серийными разведениями представляющего интерес Fab (в соответствии с оценкой антитела против VEGF, Fab-12, как описано в Presta et al., *Cancer Res.* 57: 4593 - 4599 (1997)). Затем представляющий интерес Fab инкубируют в течение ночи; однако инкубацию можно продолжать в течение более длительного периода (например, приблизительно 65 ч), чтобы обеспечить достижение равновесия. После этого смеси переносят в улавливающий планшет для инкубации при комнатной температуре в течение одного часа. Затем раствор удаляют и планшет промывают восемь раз 0,1% Tween-20 в PBS. После высыхания планшетов добавляют 150 мкл/лунка сцинтилляционной жидкости (Micro Scint-20; Packard) и планшеты подвергают подсчету на гамма-счетчике Topcount (Packard) в течение десяти минут. Концентрации каждого Fab, которые дают меньше или равно 20% максимального связывания, выбирают для применения в конкурентных анализах связывания. Согласно другому варианту K_d определяют с использованием анализов поверхностного плазмонного резонанса с использованием инструмента BIACORE®-2000 или BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C с чипами с иммобилизованным анти-

геном CM5 при ~10 единиц ответа (RU). В кратком изложении, биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, BIAcore Inc.) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) согласно инструкциям поставщика. Антиген разбавляют 10 mM ацетатом натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед инъекцией со скоростью потока 5 мкл/мин для достижения приблизительно 10 единиц ответа (RU) связанного белка. После инъекции антигена инъецируют 1M этаноламин для блокирования не вступивших в реакцию групп. Для определения кинетики двукратные серийные разведения Fab (от 0,78 до 500 нМ) инъецируют в PBS с 0,05% раствором поверхностно-активного вещества TWEEN 20™ (PBST) при 25°C при скорости потока приблизительно 25 мкл/мин. Показатели скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) вычисляют с использованием простой модели связывания Ленгмюра "один к одному" (BIAcore® Evaluation Software version 3.2) посредством одновременной подгонки сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (K_D) вычисляют как отношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999). Если константа ассоциации превышает $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, согласно анализу поверхностного плазмонного резонанса, как указано выше, константу ассоциации можно определить с использованием способа флуоресцентного тушения, посредством которого определяют повышение или снижение интенсивности испускания флуоресценции (возбуждение = 295 нм; испускание = 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C для 20 нМ антитела против антигена (форма Fab) в PBS, pH 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, как определяют в спектрофотометре, таком как оборудованный останавливаемой струей спектрофотометр (Aviv Instruments) или спектрофотометр серии 8000 SLM-AMINCOTM (ThermoSpectronic) со встряхиваемой кюветой.

"Константа ассоциации" "коэффициент ассоциации" "скорость ассоциации" или " k_{on} " согласно настоящему изобретению также можно определить, как описано выше, с использованием системы BIACORE®-2000 или a BIACORE®- 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C с чипами с иммобилизованным антигеном при ~10 единиц ответа (RU). В кратком изложении, биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, BIAcore Inc.) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) согласно инструкциям поставщика. Антиген разбавляют 10 mM ацетата натрия, pH 4,8, до 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) перед инъекцией со скоростью потока 5 мкл/мин для достижения приблизительно 10 единиц ответа (RU) связанного белка. После инъекции антигена инъецируют 1M этаноламина для блокирования не вступивших в реакцию групп. Для измерения кинетики двукратные последовательные разведения Fab (от 0,78 нМ до 500 нМ) инъецируют в PBS с 0,05% Tween 20 (PBST) при 25°C при скорости потока приблизительно 25 мкл/мин. Показатели скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) вычисляют с использованием простой модели связывания Ленгмюра "один к одному" (BIAcore Evaluation Software version 3.2) посредством одновременной подгонки сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (K_D) вычисляют как отношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293: 865-881. Однако если константа ассоциации превышает $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, согласно анализу поверхностного плазмонного резонанса, как указано выше, то константу ассоциации предпочтительно определяют с использованием способа флуоресцентного тушения, при помощи которого измеряют повышение или снижение интенсивности испускания флуоресценции (возбуждение = 295 нм; испускание = 340 нм, полоса пропускания 16 нм) при 25°C для 20 нМ антитела против антигена (форма Fab) в PBS, pH 7,2, в присутствии возрастающих концентраций антигена, как определяют в спектрофотометре, таком как оборудованный останавливаемой струей спектрофотометр (Aviv Instruments) или спектрофотометр серии 8000 SLM-AMINCOTM (ThermoSpectronic) со встряхиваемой кюветой.

Термин "функциональный эпитоп" в контексте данного описания относится к аминокислотным остаткам антигена, которые энергетически способствуют связыванию антитела, т. е., образованию "энергетического эпитопа". Мутация любого из вносящих энергетический вклад остатков антигена до аланина разрывает связывание антитела таким образом, что относительный показатель K_D (K_D PD-L1 мутанта / K_D PD-L1 дикого типа) антитела превышает 4 (см. Пример 3 ×(b)).

Термин "конформационный эпитоп" в контексте данного описания относится к аминокислотным остаткам антигена PD-L1, которые сходятся на поверхности, когда полипептидная цепь складывается для образования нативного белка, и демонстрируют значительно сниженный показатель обмена HD из-за связывания Fab, как описывается в экспериментальном разделе. Конформационный эпитоп содержит, помимо прочего, функциональный эпитоп.

Фраза "существенно сниженный" или "существенно отличающийся" в контексте данного описания обозначает достаточно высокую степень различия между двумя числовыми значениями (как правило, одно из них ассоциировано с молекулой, а другое ассоциировано с контрольной/сравниваемой молекулой), настолько, чтобы специалист в данной области мог считать разницу между двумя значениями статистически значимой в контексте биологической характеристики, измеряемой указанными значениями (например, значениями K_D). Разница между указанными двумя значениями, составляет, например, более, чем приблизительно 10%, более чем приблизительно 20%, более чем приблизительно 30%, более чем приблизительно 40% и/или более чем приблизительно 50%, относительно значения контрольной

ной/сравниваемой молекулы.

Термин "по сути сходный" или "по сути одинаковый" в контексте данного описания обозначает достаточно высокую степень сходства между двумя числовыми значениями (например, одно из них ассоциировано с антителом по изобретению, а другое ассоциировано с эталонным/сравниваемым антителом), настолько, чтобы специалист в данной области мог считать разницу между двумя значениями небольшой или не имеющей биологической и/или статистической значимости в контексте биологической характеристики, определяемой указанными значениями (например, значениями KD). Разница между двумя указанными значениями составляет, например, менее чем приблизительно 50%, менее чем приблизительно 40%, менее чем приблизительно 30%, менее чем приблизительно 20% и/или менее чем приблизительно 10% относительно контрольного/сравниваемого значения.

"Процентную (%) идентичность аминокислотной последовательности" и "гомологию" в отношении последовательности пептида, полипептида или антитела определяют как процент аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и внесения пропусков, если необходимо, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей, и, не считая какие-либо консервативные замены частью идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процентной идентичности аминокислотных последовательностей можно проводить различными способами, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области, например, с применением общедоступных компьютерных программ, таких, как BLAST, BLAST-2 или ALIGN. Специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для проведения выравнивания, включая любые алгоритмы, требуемые для достижения максимального выравнивания на протяжении всей длины сравниваемых последовательностей.

"Блокирующее антитело или "антитело-антагонист" представляет собой антитело, которое ингибирует или снижает биологическую активность антигена, который оно связывает. Блокирующие антитела или антитела-антагонисты могут значительно или полностью ингибировать биологическую активность антигена. Антитела против PD-L1 согласно изобретению блокируют взаимодействие между PD-L1 и его рецептором PD-1 и, таким образом, сигнал через PD-1, таким образом, чтобы восстанавливалась функциональная реакция со стороны Т-клеток с дисфункционального состояния до антигенной стимуляции. "Агонистическое" или активирующее антитело представляет собой антитело, которое усиливает или инициирует сигнал со стороны антигена, с которым оно связывается. Иногда агонистические антитела вызывают или активируют сигнал без присутствия природного лиганда.

Термины "перекрестно конкурировать", "перекрестная конкуренция", "перекрестно блокировать", "перекрестно блокированный" и "перекрестное блокирование" применяются в данном описании взаимозаменяемо и означают способность антитела или его фрагмента прямо или косвенно препятствовать связыванию через аллостерическую модуляцию антител против PD-L1 согласно изобретению с PD-L1-мишенью человека. Степень способности антитела или его фрагмента к препятствованию связыванию другого антитела с мишенью и, таким образом, его способность к перекрестному блокированию или перекрестной конкуренции, может определяться путем применения анализов конкурентного связывания. В одном особенно подходящем количественном анализе перекрестной конкуренции применяют подход на основе FACS или AlphaScreen для измерения конкуренции между меченым (например, His-меченым, биотинилированным или радиоактивно меченым) антителом или его фрагментом и другим антителом или его фрагментом в отношении их связывания с мишенью. В экспериментальном разделе описывается соответствующий анализ для определения перекрестной конкуренции связываемой молекулы или ее способности к перекрестной конкуренции с антителом или его фрагментом. Как правило, к перекрестно конкурирующим антителам или их фрагментам относятся те, которые связываются с мишенью в анализе перекрестной конкуренции, таким образом, что во время анализа и в присутствии второго антитела или его фрагмента, фиксируемое смещение отдельного переменного домена иммуноглобулина или полипептида составляет до 100% (например, в конкурентном анализе на основе FACS) максимального теоретического смещения (например, смещения Холодовым (например, немеченым) антителом или его фрагментом, требующим перекрестного блокирования) испытываемым потенциально перекрестно блокирующим антителом или его фрагментом, присутствующим в данном количестве. Предпочтительно перекрестно конкурирующие антитела или их фрагменты имеют фиксируемое смещение от 10 до 100%, более предпочтительно от 50 до 100%.

"Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитела, представленные в настоящем документе, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена по меньшей мере от одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно ассоциирована в окружении, в котором она продуцирована. Предпочтительно выделенная нуклеиновая кислота не ассоциирована с компонентами, ассоциированными с окружением, где она продуцируется. Выделенные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды и антитела, находятся в форме, отличной от формы или условий, в которых она встречается в природе. Таким образом, выделенные молекулы нуклеиновых кислот отличаются от молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды и антитела, которая существует в клетках в природе.

Термин "контрольные последовательности" относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Контрольные последовательности, которые пригодны для прокариот, включают, например, промотор, необязательно последовательность оператора и участок связывания рибосом. Известно, что эукариотические клетки используют промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры. Нуклеиновая кислота является "функционально связанной", если она находится в функциональной связи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК для препоследовательности или секреторной лидерной последовательности функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в качестве белка-предшественника, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или участок связывания рибосом является функционально связанным с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, чтобы облегчить трансляцию. Как правило, "функционально связанный" означает, что связанные последовательности ДНК являются соседними, и, в случае секреторной лидерной последовательности, являются соседними и находятся в рамке считывания. Однако энхансеры не должны быть смежными. Связывание осуществляют посредством лигирования в соответствующих участках рестрикции. Если таких участков нет, используют синтетические олигонуклеотидные соединительные элементы или линкеры в соответствии с общепринятой практикой.

"Устойчивой" композицией является композиция, в которой белок сохраняет свою физическую и химическую устойчивость и целостность при хранении. В данной области доступны различные аналитические способы определения стабильности белка, и они рассмотрены в *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991) и Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993). Устойчивость можно определять при выбранной температуре в течение выбранного периода времени. Для быстрого скрининга композицию можно держать при 40°C в течение от 2 недель до 1 месяца, в течение которых измеряют устойчивость. Если композицию надлежит хранить при 2-8°C, как правило, композиция должна быть устойчивой при 30 или 40°C в течение по меньшей мере 1 месяца, и/или она должна быть устойчивой при 2-8°C в течение по меньшей мере 2 лет. Если композицию надлежит хранить при 30°C, как правило, композиция должна быть устойчивой в течение как минимум 2 лет при 30°C и/или устойчивой при 40°C в течение как минимум 6 месяцев. Например, в качестве индикатора устойчивости белка в ходе хранения можно использовать степень агрегации. Таким образом, "устойчивая" композиция может представлять собой композицию, в которой менее, чем приблизительно 10%, предпочтительно менее, чем приблизительно 5% белка присутствует в качестве агрегата. В других случаях можно определять любое повышение образования агрегатов в ходе хранения композиции.

"Восстановленная" композиция представляет собой композицию, которая была приготовлена путем растворения лиофилизированной композиции белка или антитела в разбавителе, таким образом, чтобы белок был диспергирован в нем. Восстановленная композиция пригодна для введения (например подкожного введения) пациенту, подлежащему лечению соответствующим белком, и может быть композицией, подходящей для парентерального или внутривенного введения.

"Изотоническая" композиция представляет композицию, имеющую по сути такое же осмотическое давление, что и кровь человека. Изотонические композиции, как правило, имеют осмотическое давление приблизительно от 250 до 350 мосмоль. Термином "гипотоническая" характеризуют композицию с осмотическим давлением ниже осмотического давления крови человека. Соответственно, термин "гипертоническая" характеризует композицию с осмотическим давлением выше осмотического давления крови человека. Изотоничность можно определять с использованием, например, парофазного осмометра или замораживающего осмометра. Композиции могут быть гипертоническими в результате добавления соли и/или буфера.

"Носители" в контексте данного описания включают фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, которые являются нетоксичными для клетки или млекопитающего, подвергаемых их воздействию, в используемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой водный pH-буферный раствор. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфат, цитрат, и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярные (менее, чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие, как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие, как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие, как EDTA; сахарные спирты, такие, как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICS™.

"Фармацевтически приемлемая кислота" включает неорганические и органические кислоты, которые являются нетоксичными в концентрации и форме, в которых они включены в состав. Например, к подходящим неорганическим кислотам относятся хлористоводородная, перхлорная, бромистоводород-

ная, йодистоводородная, азотная, серная, сульфоновая, сульфаниловая, фосфорная, карбоновая и т. п. К подходящим органическим кислотам относятся линейные или разветвленные алкильные, ароматические, циклические, циклоалифатические, ариалифатические, гетероциклические, насыщенные, ненасыщенные, моно-, ди- и трикарбоновые кислоты, включая, например, муравьиную, уксусную, 2-гидроксиуксусную, трифтороуксусную, фенилуксусную, триметилуксусную, t-бутилуксусную, антраниловую, пропановую, 2-гидроксипропановую, 2-оксопропановую, малоновую, циклопентанпропионовую, 3-фенилпропионовую, бутановую, бутандиоевую, бензойную, 3-(4-гидроксibenzoил)бензойную, 2-ацетоксibenзойную, аскорбиновую, коричную, лаурилсерную, стеариновую, муконовую, миндальную, янтарную, эмбоновую, фумаровую, яблочную, малеиновую, гидроксималеиновую, малоновую, молочную, лимонную, виннокаменную, гликолевую, гликоновую, глюконовую, пировиноградную, глиоксальную, щавелевую, мезиловую, янтарную, салициловую, фталевую, пальмовую, пальмеиновую, тиоциановую, метансульфоновую, этансульфоновую, 1,2-этандисульфоновую, 2-гидроксиэтансульфоновую, бензолсульфоновую, 4-хлорбензолсульфоновую, нафталин-2-сульфоновую, p-толуолсульфоновую, камфорсульфоновую, 4-метилбисцикло[2.2.2]-окт-2-ен-1-карбоновую, глюкогептоновую, 4,4'-4,4'-метиленис-3-(гидрокси-2-ен-1-карбоновую), гидроксинафтоевую.

"Фармацевтически приемлемые основания" включают неорганические и органические основания, которые являются нетоксичными в концентрации и форме, в которых они включены в состав. Например, пригодные основания включают основания, образованные образующими неорганическое основание металлами, такими как литий, натрий, калий, магний, кальций, аммоний, железо, цинк, медь, марганец, алюминий, N- метилглюкамин, морфолин, пиперидин, и органические нетоксические основания, включая первичные, вторичные и третичные амины, замещенные амины, циклические амины и основные ионообменные смолы [например, $N(R')_4^+$ (где R' независимо представляет собой H или C_{1-4} алкил, например, аммоний, Tris)], например, изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин, этаноламин, 2-диэтиламиноэтанол, триметамин, дициклогексиламин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, прокаин, гидрабамин, холин, бетаин, этилендиамин, глюкозамин, метилглюкамин, теобромин, пурины, пиперазин, пиперидин, N-этилпиперидин, полиаминовые смолы и т.п. Особенно предпочтительными органическими нетоксическими основаниями являются изопропиламин, диэтиламин, этаноламин, триметамин, дициклогексиламин, холин и кофеин. Дополнительные фармацевтически приемлемые кислоты и основания, применимые с настоящим изобретением, включают кислоты и основания, которые образованы из аминокислот, например, гистидина, глицина, фенилаланина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, лизина и аспарагина.

"Фармацевтически приемлемые" буферы и соли включают буферы и соли, образованные как из кислот-аддитивных солей, так и из основно-аддитивных солей указанных выше кислот и оснований. Конкретные буферы и/или соли включают гистидин, сукцинат и ацетат.

"Фармацевтически приемлемый сахар" представляет собой молекулу, которая, при комбинировании с представляющим интерес белком значительно препятствует или снижает химическую и/или физическую неустойчивость белка при хранении. Когда состав предназначен для лиофилизации и последующего восстановления, "фармацевтически приемлемые сахара" также могут быть известны в качестве "лиопротектора". Типичные сахара и их соответствующие сахарные спирты включают: аминокислоту, такую как моноглутамат натрия или гистидин; метиламин, такой как бетаин; лиотропную соль, такую как сульфат магния; полиол, такой как трехатомные спирты сахаров или спирты сахаров с большей молекулярной массой, например глицерин, декстран, эритрит, глицерин, арабит, ксилит, сорбит и маннит; пропиленгликоль; полиэтиленгликоль; PLURONICS® и их комбинации. Дополнительные иллюстративные лиопротекторы включают глицерин и желатин, и сахара мелибиозу, мелизитозу, рафинозу, маннотриозу и стахиозу. Примеры редуцирующих сахаров включают глюкозу, мальтозу, лактозу, мальтулозу, изомальтулозу и лактулозу. Примеры нередуцирующих сахаров включают нередуцирующие гликозиды полигидроксисоединений, выбранные из спиртов сахаров и других неразветвленных полиспиртов. Предпочтительными спиртами сахаров являются моногликозиды, особенно соединения, полученные восстановлением дисахаридов, таких как лактоза, мальтоза, лактулоза и мальтулоза. Гликозидная боковая группа может быть либо глюкозидной, либо галактозидной. Дополнительными примерами спиртов сахаров являются глюцит, мальтит, лактит и изомальтулоза. Предпочтительными фармацевтически приемлемыми сахарами являются нередуцирующие сахара трегалоза или сахароза. Фармацевтически приемлемые сахара добавляют в состав в "обеспечивающем защиту количестве" (например, перед лиофилизацией), которое означает, что белок, по существу, сохраняет его физическую и химическую стабильность и целостность при хранении (например, после восстановления и хранения).

"Разбавитель", представляющий интерес согласно настоящему изобретению, представляет собой разбавитель, который является фармацевтически приемлемым (безопасным и нетоксичным для введения человеку) и пригодным для получения жидкой композиции, такой, как композиция, разбавленная после лиофилизации. Типичные разбавители включают воду, бактериостатическую воду для инъекций (BWI), pH-буферный раствор (например, фосфатно-солевой буфер), стерильный физиологический раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. Разбавители могут включать водные растворы солей и/или буферов.

"Консервант" представляет собой соединение, которое может добавляться к композициям для снижения бактериальной активности. Добавление консерванта может, например, облегчать получение композиции для многократного применения (с многократной дозой). Примеры потенциальных консервантов включают хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония (смесь хлоридов алкилбензилдиметиламмония, в которых алкильные группы представляют собой соединения с длинной цепью) и хлорид бензэтония. Другие типы консервантов включают ароматические спирты, такие как фенол, бутиловый и бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцинол, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол. Наиболее предпочтительным консервантом, представленным в настоящем документе, является бензиловый спирт.

"Лечение" относится к клиническому вмешательству, предназначенному для изменения естественного течения у субъекта или в клетке, подвергаемых лечению, и его можно проводить либо для профилактики, либо в процессе клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают профилактику возникновения или повторного возникновения заболевания, профилактику метастазов, снижение скорости прогрессирования заболевания, смягчение или облегчение болезненного состояния и ремиссию или улучшенный прогноз. В некоторых случаях антитела применяют для замедления развития заболевания или нарушения. Субъекта успешно "лечат", например, с использованием апоптотических антител против PD-L1 согласно изобретению, если смягчается один или несколько симптомов связанного с Т-клетками дисфункционального нарушения.

"Эффективное количество" относится по меньшей мере к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого или указанного эффекта, включая терапевтический или профилактический результат. Например, эффективное количество антител против PD-L1 может представлять собой по меньшей мере минимальную концентрацию, обеспечивающую ингибирование сигнала от PD-L1, либо через PD-1 на Т-клетках, либо B7.1 на других APC, или обоими путями.

"Терапевтически эффективное количество" представляет собой по меньшей мере минимальную концентрацию, требуемую для достижения поддающегося измерению улучшения или профилактики конкретного нарушения. Терапевтически эффективное количество может варьировать в соответствии с такими факторами, как болезненное состояние, возраст, пол и масса тела пациента, и способность антитела вызывать требуемый ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, в котором любые токсические или вредные эффекты антитела перевешиваются терапевтически полезными эффектами. Например, терапевтически эффективное количество антител против PD-L1 представляет собой по меньшей мере минимальную концентрацию, обеспечивающую в результате ингибирование как минимум одного симптома связанного с Т-клетками нарушения.

"Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозировках в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого профилактического результата. Например, профилактически эффективное количество антител против PD-L1 представляет собой по меньшей мере минимальную концентрацию, позволяющую предотвращать или ослаблять развитие как минимум одного симптома связанного с Т-клетками нарушения.

"Млекопитающее" с точки зрения лечения означает любое животное, классифицируемое как млекопитающее, включая человека, домашних и сельскохозяйственных животных, и животных зоопарков, спортивных животных или комнатных животных, таких как собаки, лошади, кролики, крупный рогатый скот, свиньи, хомяки, песчанки, мыши, хорьки, крысы, кошки и т.д. Предпочтительно млекопитающее является человеком.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который приготовлен в такой форме, чтобы обеспечивалась возможность эффективной биологической активности активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому должна вводиться композиция. Такие композиции являются стерильными.

"Стерильная" композиция является асептической или не содержащей каких бы то ни было живых микроорганизмов и их спор.

Термин "приблизительно" в контексте данного описания относится к обычному диапазону погрешностей для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области.

"Аутоиммунное нарушение" представляет собой заболевание или нарушение, возникающее в собственных тканях субъекта и направленное против них, или отдельный его признак или его проявление, или состояние, возникающее как его следствие. Аутоиммунные заболевания могут быть органоспецифическими заболеваниями (т.е., иммунная реакция специфично направлена против системы органов, такой как эндокринная система, гемопоэтическая система, кожа, сердечно-легочная система, желудочно-кишечная и печеночная системы, почечная система, щитовидная железа, уши, нервно-мышечная система, центральная нервная система и т.д.) или системное заболевание, которое может поражать множество систем органов (например, системная красная волчанка (SLE), ревматоидный артрит (RA), полимиозит и т.д.). Как правило, к таким заболеваниям относятся аутоиммунные ревматологические нарушения (например, такие как RA, синдром Шегрена, склеродермия, волчанка, такая как SLE и волчаночный нефрит, полимиозит-дерматомиозит, криоглобулинемия, синдром антифосфолипидных антител и псориаз).

ский артрит), аутоиммунные желудочно-кишечные и печеночные нарушения (например, такие как воспалительные заболевания кишечника (например, язвенный колит и болезнь Крона), аутоиммунный гастрит и пернициозная анемия, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит и глютенная энтеропатия), васкулит (например, такой как ANCA-отрицательный васкулит и ANCA-ассоциированный васкулит, включая васкулит Чарга-Стросса, гранулематоз Вегенера и микроскопический полиангиит), аутоиммунные неврологические нарушения (например, такие как рассеянный склероз, опсомиоклональный синдром, тяжелая миастения, оптический нейромиелит, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и аутоиммунные полиневропатии), почечные нарушения (например, такие как гломерулонефрит, синдром Гудпасчера и болезнь Бергера), аутоиммунные дерматологические нарушения (например, такие как псориаз, крапивница, уртикария, пемфигус обыкновенный, буллезный пемфигиоз и кожная красная волчанка), гематологические нарушения (например, такие как тромбоцитопеническая пурпура, тромбоцитическая тромбоцитопеническая пурпура, посттрансфузионная пурпура и аутоиммунная гемолитическая анемия), атеросклероз, увеит, аутоиммунные заболевания слуха (например, такие как болезнь внутреннего уха и потеря слуха), болезнь Бехчета, синдром Рейно, трансплантация органа и аутоиммунные эндокринные нарушения (например, такие как связанные с диабетом аутоиммунные заболевания, такие как инсулин-зависимый сахарный диабет (IDDM), болезнь Аддисона и аутоиммунное заболевание щитовидной железы (например, болезнь Грейвса и тиреоидит)). Более предпочтительно такие заболевания включают, например, РА, язвенный колит, ANCA-ассоциированный васкулит, волчанку, рассеянный склероз, синдром Шегрена, болезнь Грейвса, IDDM, пернициозную анемию, тиреоидит и гломерулонефрит.

Термин "цитотоксическое средство" в контексте данного описания относится к веществу, которое ингибирует функционирование клеток, или препятствует ему, и/или вызывает разрушение клеток. Термин включает радиоактивные изотопы (например, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} и радиоактивные изотопы Lu) и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины из бактерий, грибов, растений или животных, включая их фрагменты.

"Химиотерапевтическое средство" представляет собой химическое соединение, применяемое в лечении рака. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиоптепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфид, импросульфид и пипосульфид; азиридины, такие как бензодопа, карбоксидон, метуредопа и уредопа; этиленмины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилломеламин; ацетогинины (особенно буллатин и буллатинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекана (CPT-11 (иринотекан), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; пеметрексед; каллестатин; CC-106 (включая его синтетические аналоги на основе адозелезина, карзелезина и бизелезина); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; TLK-286; CDP323, пероральный ингибитор альфа-4-интегрина; саркодиктиин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холлофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидроксид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, иприт урацила; нитрозомочевина, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как эндиновые антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма II и калихеамицин омега II (см., например, Nicolaou et al., Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); динемидин, включая динемидин А; эсперамидин; а также хромофор на основе неокарциностатина и сходные хромопротеиновые хромофоры на основе эндиновых антибиотиков), аклаиномицины, актиномицин, аутрамицин, аза-серин, блеомицины, сактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин (включая морфолинодоксорубин, цианоморфолинодоксорубин, 2-пирролинодоксорубин, инъекцию липосом доксорубина HCl и дезоксидоксорубин), эпирубин, эзрубин, идарубин, марселломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пурамицин, квеламицин, родорубин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат, гемцитабин, тегафур, капецитабин, эпитилон и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин и иматиниб (производное 2-фениламинопиримидина), а также другие ингибиторы c-Kit; антиадренальные средства, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; средства для восполнения фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминолевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрин; эдотраксат; дефофамин; демекольцин; диазиквон; эльфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лониданин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитразин; пентостатин; фенамет;

пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангвидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); тиотепу; таксоиды, например, паклитаксел, сконструированная с альбумином композиция паклитаксела в виде наночастиц и доксетаксел; хлорамбуцил; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; оксалиплатин; лейковорин; винорелбин; новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше; а также сочетания двух или нескольких из указанных выше, такие как CHOP (сокращенное название для комбинированной терапии с применением циклофосфамида, доксорубина, винкристина и преднизолона) и FOLFOX (сокращенное название для схемы лечения с применением оксалиплатина в сочетании с 5-FU и лейковорином).

Другими терапевтическими средствами, которые могут применяться в комбинации с антителами против PD-L1 являются бисфосфонаты, такие, как клодронат, NE-58095, золедроновая кислота / золедронат, алендронат, памидронат, тилудронат или ризедронат; а также троксацитабин (нуклеозидный аналог цитозина 1,3-диоксолан); антисмысловые олигонуклеотиды, в частности те, которые ингибируют экспрессию генов в каскадах передачи сигнала, участвующих в нарушенной пролиферации клеток, например, PKC-альфа, Raf, H-Ras и рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R); вакцины, такие как вакцина Stimuvax, вакцина Theratope и вакцины для генной терапии, например, вакцина Allovectin, вакцина Leuvestin и вакцина Vaxid; ингибитор топоизомеразы 1; антиэстроген, такой как фулвестрант; ингибитор Kit, такой как иматиниб или EXEL-0862 (ингибитор тирозинкиназы); ингибитор EGFR, такой как эрлотиниб или цетуксимаб; ингибитор против VEGF, такой как бевацизумаб; аринотекан; gmRH; лапатиниб и лапатиниб дитозилат (двойной низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназ ErbB-2 и EGFR, также известный как GW572016); 17AAG (производное гелданамицина, которое представляет собой яд на основе белка теплового шока (Hsp) 90), и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанных выше.

"Stimuvax" представляет собой липосомную противораковую вакцину BLP25, предназначенную для вызывания иммунной реакции на раковые клетки, которые экспрессируют MUC1, белковый антиген, широко экспрессируемый на распространенных раковых клетках. MUC1 сверхэкспрессируется на многих раковых клетках, таких, как рак легких, рак молочной железы, рак предстательной железы и рак ободочной и прямой кишки. Считается, что Stimuvax стимулирует иммунную систему организма в распознавании и разрушении раковых клеток, экспрессирующих MUC1.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 показывает, что A09-246-2 эффективно блокирует связывание ¹²⁵I-PD-L1 с иммобилизованным PD-1-Fc. Неактивный мутант: мутант VL-A31G,D52E,R99Y A09-188-1. A09-246-2 (1): Экспрессируется в клетках HEK 293. A09-246-2 (2): Экспрессируется в клетках CHO-S, партия #1. A09-246-2 (3): Экспрессируется в клетках CHO-S, партия #2.

Фиг. 2 показывает последовательность внеклеточного домена (слитого с 6 аминокислотной гистидиновой меткой, SEQ ID NO: 29) PD-L1. Пептиды, которые могут распознаваться MS, обозначены серыми полосками. Те, которые демонстрируют защиту от обмена HD в присутствии Fab, обозначены черными полосками. Пептиды, которые не поддаются анализу, выделены подчеркиванием и курсивом в последовательности.

Фиг. 3 показывает эпитоп A09-246-2 на PD-L1. Остов PD-L1 показан в виде ленты. Аминокислоты, которые при мутации до аланина дестабилизируют связывание A09-246-2 - PD-L1 более, чем на 0,7 ккал/моль, показаны в виде палочек.

Фиг. 4 показывает, что A09-246-2 эффективно повышает активность Т-клеток, представленную выработкой IL-2, как демонстрирует SEA-анализ человеческих PBMC.

Фиг. 5-16 показывают, что A09-246-2 повышает ADCC в различных линиях (стимулированных и нестимулированных) и аллотипах опухолей.

Экспериментальный раздел

Представленные ниже рабочие примеры поясняют конкретные варианты воплощения изобретения, никоим образом, не ограничивая объема описания или формулы изобретения.

1. Выбор и улучшение антител

Антитела выбирали из фаг-дисплейных библиотек Fab. Выбор включал два разных плеча: в одном использовали биотинилированный человеческий PD-L1 в разных циклах отбора, а в другом чередовали человеческий и мышиный PD-L1 в качестве мишени в разных циклах. 3840 клонов отбирали при помощи ELISA-анализа для распознавания 170 отдельных связывающих компонентов PD-L1. На основе ингибирования лигандного связывания PD-1 выбирали 48 попаданий и экспрессировали в среднем масштабе для дальнейшей характеристики.

Выбранные попадания переформатировали и экспрессировали как IgG. Кандидаты для оптимиза-

ции отбирали на основе эффективности блокирования связывания PD-1 с PD-L1 и способности к связыванию, как с человеческим, так и с мышинным вариантами PD-L1. Связывание с PD-L1 изначально определяли при помощи ELISA, а затем количественно определяли при помощи инструмента Bioscye, а связывание с экспрессирующими PD-L1 клетками - при помощи FACS. Четыре кандидата отвечали заданному профилю, включая A09-188-1, который содержал лямбда-легкую цепь.

A09-188-1 выбирали для созревания аффинности и оптимизации последовательности. Целями созревания аффинности были повышенная аффинность к мишени человеческого происхождения, перекрестная реактивность с мишенью мышинного происхождения и улучшение технологичности. Мутации тяжелых цепей в HVR вводили путем рандомизации на основе кодона. Это разнообразие тяжелых цепей комбинировали с разнообразием легких цепей, включенным путем перетасовки легкой цепи для создания библиотеки созревания аффинности. Другие остатки FR и HVR тяжелой и легкой цепей подвергали мутации для повышения устойчивости антитела и включения аминокислот, содержащихся в зародышевой линии, такой, как мутация FR 193 V тяжелой цепи.

В результате образовывались последовательности HVR, указанные ниже. Как можно увидеть, как минимум остатки X_1 - X_{17} являются вариabельными с точки зрения связывания с мишенью и имеют заданные значения, указанные в данном описании.

Последовательность HVR-H1 представляет собой $X_1YX_2MX_3$ (SEQ ID NO: 1);

Последовательность HVR-H2 представляет собой SIYPSGGX₄TFYADX₅VKG (SEQ ID NO: 2);

Последовательность HVR-H3 представляет собой IKLGTVTTVX₆Y (SEQ ID NO: 3);

причем X_1 представляет собой K, R, T, Q, G, A, W, M, I или S; X_2 представляет собой V, R, K, L, M или I; X_3 представляет собой H, T, N, Q, A, V, Y, W, F или M; X_4 представляет собой F или I; X_5 представляет собой S или T; X_6 представляет собой E или D;

Последовательность HVR-L1 представляет собой TGTX₇X₈DVGX₉YNYVS (SEQ ID NO: 8);

Последовательность HVR-L2 представляет собой $X_{10}VX_{11}X_{12}RPS$ (SEQ ID NO: 9);

Последовательность HVR-L3 представляет собой SSX₁₃TX₁₄X₁₅X₁₆X₁₇RV (SEQ ID NO: 10);

причем X_7 представляет собой N или S; X_8 представляет собой T, R или S; X_9 представляет собой A или G; X_{10} представляет собой E или D; X_{11} представляет собой I, N или S; X_{12} представляет собой D, H или N; X_{13} представляет собой F или Y; X_{14} представляет собой N или S; X_{15} представляет собой R, T или S; X_{16} представляет собой G или S; X_{17} представляет собой I или T.

2. Производство, очистка и рецептирование

2.1 Биопродуцирование и осветление

Антитело A09-246-2, соответствующее SEQ ID NO: 32 (тяжелая цепь) и SEQ ID NO: 33 (легкая цепь), экспрессировали из клеток CHO-S, трансфицированных последовательностью ДНК изотипа KOL и вариантом EU с оптимизированной последовательностью, соответственно. Культивирование клеток осуществляли в периодическом режиме в 250 л одноразовом биореакторе (SUB) (табл. 2-2). Клетки выращивали в среде для выращивания ProCHO5, дополненной 4 mM L-глутамина + 25 мкг/мл пуромидина при 37°C. Культуры подпитывали 15% Efficient Feed B и 1,0 mM вальпроевой кислоты через 3 дня после инокуляции.

Необработанные кондиционированные среды из прогонов биореактора осветляли с использованием фильтров 1,1 м² Millistak+ Pod D0HC (Millipore MD0HC10FS1) и 0,11 м² Millistak+ Pod A1HC (Millipore MA1HC01FS1), с последующей завершающей фильтрацией при помощи фильтра Sartopore 2 (Sartorius 5445307H8-SS).

2.2 Очистка

Процесс очистки состоял из двух этапов хроматографии; (a) MabSelect на протеине A для захвата антитела из собранного осветленного материала и (b) этап "шлифовки" с использованием гидроксипатита II типа для удаления остатков агрегированного продукта, белков клетки-хозяина и ДНК, а также связанных с продуктом примесей. Промежуточный этап Q-фильтрации включали между 2 этапами хроматографии для дополнительного уменьшения содержания ДНК. SDS-PAGE и эксклюзионную хроматографию (SE-HPLC) применяли для анализа обрабатываемых образцов во время очистки. Содержание белка в обрабатываемых образцах Mabselect определяли с применением HPLC на протеине A, а спектрофотографию в УФ и видимой области применяли для всех остальных этапов процесса.

Элюаты после Mabselect в течение 30 мин подвергали вирусной инаktivации при низком уровне pH (pH 3,7), а затем нейтрализовали до pH 7,0 перед следующим этапом очистки.

Окончательный этап "шлифовки" представлял собой хроматографию на гидроксипатите II типа. Проводимость фильтрата Sartobind Q доводили до < 3 мСм/см водой и уровень pH снижали до 6,5 уксусной кислотой перед загрузкой образца.

Связанное антитело против PD-L1 элюировали со ступенчатым градиентом NaCl. Агрегированные связанные с продуктом примеси элюировали композитным буфером.

2.3 Рецептирование, ультрафильтрация и диафильтрация

Очищенные антитела против PDL1 с этапа "шлифовки" гидроксипатитом концентрировали, а затем подвергали диафильтрации в соответствующие буферы согласно представленной ниже таблице. Затем нерасфасованные продукты подвергали стерильной фильтрации через 0,2 мкм фильтр и дальнейше-

му разведению буферной смесью до окончательной концентрации. Рецептированное нерасфасованное вещество подвергали дальнейшей проверке на наличие эндотоксина и проверяли с применением SE-HPLC.

UF/DF композиции	A09-246-2
Исходный образец (мг)	1279
% извлечения	100
Конечная концентрация (мг/мл)	10,2
Чистота (% мономера)	99
Буферная смесь	10 мМ ацетата натрия, 140 мМ хлорида натрия, 0,05% (объем/объем) Tween 20, pH 6,0

2.4 Человеческая композиция

Был установлен следующий заданный профиль введения и рецептирования:

Путь введения: внутривенная инфузия

Диапазон доз для человека: 1-15 мг/кг

Концентрация: 10 мг/мл

Условия хранения: в жидком или замороженном виде

Срок хранения: более 12 мес.

Выбирали следующую жидкую композицию: 10,0 мг/мл A09-246-2 10 мМ ацетата 5,1% (мас./об.) маннита 1,4 мМ метионин 0,05% (мас./об.) Tween 20 доведение до pH 5,5

Композиция содержала противоокислительные эксципиенты и продемонстрировала достаточную устойчивость в следующих экстремальных условиях:

Световая нагрузка

Напряжение сдвига

Циклы замораживания-размораживания

Окислительная нагрузка

Устойчивость определяли при 2-8°C и 25°C до 26 и 13 недель соответственно. Композиция оказалась достаточно устойчивой при 2-8°C до последнего момента времени - через 26 недель. Кроме того, после замораживания-размораживания композиция обладала отличной устойчивостью при 25°C до 26 недель.

3. Биохимическая и биологическая характеристика

3.1 Определяемая при помощи Biacore аффинность и специфичность связывания

Аффинность и селективность связывания определяли при помощи анализов Biacore. Показатели аффинности основного антитела-кандидата для ортологов человеческого или отличного от человеческого происхождения сведены ниже в таблице. Аффинность связывания антитела против PD-L1 A09-246-2 согласно настоящему изобретению в отношении белков человека, мыши и яванского макака были статистически подобными, но очень сниженными в отношении белков собак, крыс и кроликов, демонстрируя очень быстрый профиль диссоциации.

PD-L1	ka (1/M s)	kd (1/s)	KD(M)	KD(nM)	+/- STDEV
Человек	2.72E+05	1.83E-04	6.73E-10	0.7	0.09
Обезьяна	2.49E+05	2.79E-04	1.12E-09	1.1	0.02
Мышь	1.77E+05	1.64E-04	9.26E-10	0.9	0.04
Собака	2.38E+06	1.07E-02	4.50E-09	4.5	0.4
Крыса	3.54E+05	2.20E-02	6.68E-08	66.8	8.8
Кролик	2.77E+05	2.82E-02	1.05E-07	105.4	11.2

Профили кинетики для A09-188-1 и других его мутантов показаны ниже в таблице:

Acc ID	Антитело против PD-L1	K _D (нМ)	t1/2 (мин)	Относит. K _D
A09-188-1	Антитело, имеющее тяжелую цепь согласно SEQ ID NO:34 и легкую цепь согласно SEQ ID NO:35	5,29	13,2	1,00
	Комбинация вариантов тяжелой цепи A09-188-1 *			
A09-204-1	VH-M31L,M33L,M35F,S63T,I93V	0,10	578,2	0,02
A09-211-1	VH-M31L,M33L,M35F,S63T,I93V	0,59	109,4	0,11
A09-212-1	VH-M33L,M35F,S63T,I93V	0,22	254,4	0,04
A09-213-1	VH-M31L,M35F,S63T,I93V	2,51	27,7	0,47
A09-214-1	VH-M31L,M33L,S63T,I93V	0,40	179,1	0,08
A09-215-1	VH-M33L,M35F,S63T,I93V	1,28	50,6	0,24
A09-216-1	VH-M31L,M33L,S63T,I93V	0,91	77,8	0,17
A09-219-1	VH-M31S,M33L,M35F,S63T,I93V	0,18	278,5	0,03
A09-220-1	VH-M31S,M33L,M35F,S63T,I93V	0,78	68,3	0,15
A09-221-1	VH-M31S,M33L,S63T,I93V	0,44	126,7	0,08
A09-222-1	VH-M31S,M33L,S63T,I93V	1,24	47,1	0,23
A09-223-1	VH-M31S,M35F,S63T,I93V	3,62	13,5	0,68
	Вариант легкой цепи A09-188-1 *			
A09-202-1	VL-A31G	4,15	18,8	0,78
	Варианты комбинации тяжелой и легкой цепей A09-188-1 *			
A09-248-2	VL-A31G; VH-M31L,M33L,M35F,S63T,I93V	0,10	436,4	0,02
A09-239-2	VL-A31G; VH-M31L,M33L,M35F,S63T,I93V	0,36	119,7	0,08
A09-240-2	VL-A31G; VH-M33L,M35F,S63T,I93V	0,16	245,9	0,03
A09-241-2	VL-A31G; VH-M31L,M33L,S63T,I93V	0,32	166,4	0,07
A09-242-2	VL-A31G; VH-M33L,M35F,S63T,I93V	0,76	55,6	0,16
A09-243-2	VL-A31G; VH-M31L,M33L,S63T,I93V	0,63	85,0	0,13
A09-244-2	VL-A31G; VH-M31S,M33L,M35F,S63T,I93V	0,12	279,7	0,03
A09-245-2	VL-A31G; VH-M31S,M33L,M35F,S63T,I93V	0,43	77,2	0,09
A09-246-2	VL-A31G; VH-M31S,M33L,S63T,I93V	0,34	125,4	0,07
A09-247-2	VL-A31G; VH-M31S,M33L,S63T,I93V	0,76	57,8	0,16

(*) Аминокислотные позиции отсчитывали от N-конца тяжелой и легкой цепей соответственно

3.2 Селективность

Селективность определяли путем оценки связывания с представителями семейства B7, включая hu-PD-L1-huFc, hu-PDL-2-huFc, hu-B7.1-huFc, hu-B7.2-huFc, huB7-H2-huFc и huB7-H3-huFc, при помощи Biacore.

Все испытанные антитела MAб против huPD-L1, включая A09-246-2, специфично реагировали только с белком huPD-L1, но не с каким-либо другим из белков семейства B7.

3.3 Блокирование взаимодействия PD-L1:PD-1

Способность A09-246-2 и контрольного антитела к конкуренции со связыванием радиоактивно меченного PD-L1 с иммобилизованным PD-1 определяли при помощи радиоактивного анализа конкурентного вытеснения. На фиг. 1 показаны типичные кривые конкуренции для испытываемых антител. Результаты продемонстрировали, что A09-246-2 эффективно блокирует взаимодействие PD-1 и PD-L1 с показателем IC₅₀ 0,071±0,008 нМ (0,01±0,001 мкг/мл).

Применяли следующий протокол анализа:

1. Добавляют 60 мл/лунку о PBS, содержащего 1 мг/мл человеческого PD-1Fc (R&D Systems, 1086-PD; лиофилизированный PD-1, растворенный PBS при 200 мг/мл) в белые планшеты Costar (Corning 3922). Инкубируют в течение суток при 4°C.

2. Лунки 1 раз промывают PBS.

3. Лунки блокируют 120 мл 0,5% BSA (Sigma A-3059), растворенным в буферном растворе, в течение 1 ч при комнатной температуре (RT).

4. Лунки один раз промывают буферным раствором.

5. В лунки добавляют 50 мл испытуемого образца (антитело, супернатант). Антитела разводят до 20 нМ в аналитическом буфере с последовательными 9х разведениями 1:4. Образцы разводят до 2х конеч-

ной концентрации перед добавлением в лунки (как правило, начиная с 10 нМ - 1х концентрации).

6. Неспецифическое связывание: добавляют 50 мл PD-L1/Fc (R&D Systems, 156-B7) в конечной концентрации 250 нМ вместо испытываемого образца при 500-кратном избытке к меченному PD-L1. В целом лунки получают одинаковый объем аналитического буфера.

7. В каждую лунку добавляют 50 мл 0,5 нМ ^{125}I -PD-L1 (специально меченного в Perkin Elmer, номер партии CIS32211, 250 нМ, 2400 Ки/ммоль). Разводят до 2х конечной концентрации в аналитическом буфере - конечная концентрация = 0,25 нМ.

8. Планшет встряхивают в течение 2-2,5 ч при 37°C.

9. Лунки промывают 5 раз холодным буферным раствором.

10. В каждую лунку добавляют 100 мл Microscint 20 (Packard 6013641). Инкубируют в течение как минимум 1 ч при комнатной температуре.

11. Подсчитывают люминесценцию на Topcount (протокол ^{125}I -Microscint). Буферный раствор: 50 мМ Hepes, pH 7,5, 130 мМ NaCl, 5,1 мМ KCl, 1,3 мМ MgSO_4

Аналитический буфер: буферный раствор + 0,5% BSA

3.4 Блокирование взаимодействия PD-L1: B7.1

Способность A09-246-2 к блокированию связывания растворимого B7.1 с PD-L1 на поверхности клеток измеряли при помощи FACS. Результаты показали, что A09-246-2 эффективно блокирует взаимодействие B7.1 и PD-L1 с показателем IC_{50} $0,2 \pm 0,004$ нМ ($0,03 \pm 0,0006$ мкг/мл).

3.5 Картирование эпитопов

а) Водородно-дейтериевый обмен

Внеклеточный домен антигена PD-L1 (SEQ ID NO: 29) инкубировали в растворе тяжелой воды (D_2O) для того, чтобы амидные протоны на белковом остоле могли обмениваться с дейтронами из растворителя, в присутствии или в отсутствие избыточного количества антитела против PD-L1 Fab или неспецифического Fab. Образцы расщепляли протеазой и анализировали при помощи жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии (LC-MS) для определения уровня дейтерирования каждого пептида.

Fab, соответствующее A09-246-2, использовали вместо полного IgG с целью упрощения масс-спектрометрического анализа путем снижения количества пептидов, образованных путем расщепления протеазой. Несмотря на это, оставались некоторые участки, не поддающиеся распознаванию и анализу (подчеркнутые, выделенные курсивом части последовательностей на фиг. 2), однако эти участки представляют малую часть последовательности и в основном находятся во втором домене иммуноглобулина, дальнем от участка, содержащего эпитоп. Остатки 32-39 в домене I внеклеточного домена также не поддавались распознаванию путем масс-спектрометрии и включают сайт N-связанного гликозилирования; поскольку известно, что A09-246-2 связывается с агликозилированным вариантом PD-L1, вырабатываемого в *E. coli*, невозможность анализа этого пептида в отношении показателей обмена FID не представлялась проблемой.

Наблюдалось, что некоторые пептиды из антигена имеют существенно сниженную интенсивность обмена протонов на дейтроны в присутствии Fab по сравнению с его отсутствием, указывая на то, что как минимум некоторые остатки этих пептидов пребывают в прямом контакте с Fab и составляют конформационный эпитоп (фиг. 2). Хотя два пептида, демонстрирующие защиту от растворителя, находятся на большом расстоянии друг от друга в первичной последовательности (подчеркнутые, выделенные курсивом на фиг. 2, они близко располагаются а трехмерной структуре PD-L1, и каждый составляет участок связывания на поверхности антигена (см. фиг. 3).

Таким образом, обмен HD выявил два пептида

(i) остатки 36-48 на фиг. 2 (внеклеточный домен плюс гистидиновая метка, SEQ ID NO: 29), соответствующие остаткам 54-66 последовательности полной длины (SEQ ID NO: 28)

(ii) остатки 94-104 на фиг. 2 (SEQ ID NO: 29), соответствующие остаткам 112-122 SEQ ID NO: 28, которые образуют конформационный эпитоп на PD-L1 и содержит функциональный эпитоп A09-246-2.

б) Мутагенез

Для обеспечения более точного, на уровне остатков, картирования эпитопа и для дополнения данных обмена HD применяли молекулярное моделирование и ручную проверку кристаллической структуры PD-L1 (Lin, D.Y.-W. et al. PNAS 105, 3011 - 6 (2008; PDB record 3BIK) с целью отбора подверженных воздействию растворителя остатков в пределах и в окружении эпитопа, распознанного при помощи обмена HD. Выбранные остатки мутировали либо до аланина (от больших к малым), либо до другого, потенциально более разрушительной аминокислоты (от малых к большим).

Всего 48 точечных мутантов было создано, экспрессировано, очищено от клеток НЕК и испытано на связывание с A09-246-2 с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Связывающие гипервариабельные участки или остатки, вносящие наибольший вклад в энергию связывания (Wells. J.A., PNAS 93, 1-6, 1996), определялись как не соответствующие пороговому сигналу связывания при 100 нМ антигена. Кроме того, аффинность антитела к дикому типу и каждому мутанту определяли и использовали для вычисления вклада каждого остатка эпитопа в энергию связывания.

Результаты сведены ниже в таблице, в которой 48 точечных мутантов PD-L1 сравнивались с антигеном PD-L1 дикого типа на связывание с антителом. Применяли SPR (Biacore) для осуществления кине-

тического исследования, позволяющего определять кинетические константы скорости (k_a и k_d). В общих чертах поликлональное антитело козы против Fc человека химически соединяли с чипом CM5. Затем инъецировали A11-128 и захватывали поликлональным антителом. Применяли буфер для вымывания несвязанного антитела до стабилизации изначального RU. Затем инъецировали антиген (дикого типа или мутант PD-L1) в фиксированной концентрации в течение 3 минут и ассоциацию записывали. Еще в течение 3 минут инъецировали буфер и наблюдали диссоциацию. Антигены инъецировали в концентрации 100, 50, 25, 12,5 и 6,25 нМ (за исключением мутантов Y56 и D61, которые инъецировали в количестве 1 мкМ, 500, 250, 125 и 62,5 нМ). Между циклами чип регенерировали буфером с низким уровнем pH и свежий A09-246-2 захватывали перед инъекцией следующей концентрации антигена. Константы скорости определяли путем многократной подгонки данных к 1:1 модели связывания с использованием алгоритма, который минимизирует хи-квадрат. Равновесную константу диссоциации (K_D) вычисляли как отношение кинетических констант и изменения свободной энергии Гиббса для связывания мутанта относительно дикого типа PD-L1 ($\Delta\Delta G_{\text{mut}}$) выводили из соотношения показателей K_D дикого типа и мутанта. Изменения свободной энергии выделяют в соответствии с дестабилизацией связывания антитело-антиген; "***": дестабилизация >3 ккал/моль (связывающие гипервариабельные участки); "**": > 0,7 ккал/моль. Мутанты Y56 имели слишком низкую аффинность для точного измерения показателя K_D , и вместо него указан минимальный показатель K_D . Для D61A связывание не было обнаружено. Согласно этому анализу, аминокислоты, помеченные "***" или "**", являются частью функционального эпитопа. Средняя точка температуры флуоресцентно отслеживаемой термической денатурации представлен для белков дикого типа и мутантных белков. ND: не определено; BP: двухфазный. Также представлена качественная оценка белков дикого типа и мутантных белков после эксклюзионной хроматографии (SEC). М: монодисперсный и одинаковый объем элюирования с диким типом; М/Т: пик при одинаковом объеме элюирования с диким типом с дополнительным хвостом. Для K_D и $T_{1/2}$ среднее и стандартное отклонение указывается при $n > 1$.

Мутация	$\Delta\Delta G_{\text{mut}}$ (ккал/моль)	K_D (нМ)	$T_{1/2}$ (°C)	SEC
PDL-1	0,00	0,55 +/- 0,21	59,1	М
T20A	-0,19	0,39 +/- 0,15	52,5 +/- 0,2	М
D26A	-0,44	0,26 +/- 0,19	52,8 +/- 0,2	М
L27A	-0,07	0,48 +/- 0,68	51,7 +/- 0,5	М
E45A	-0,54	0,22	58,0	М
K46A	-0,28	0,34 +/- 0,10	51,6	М
Q47A	0,04	0,59 +/- 0,27	ND	М
D49A	-0,25	0,36 +/- 0,04	BP (>49)	М
A51Q	0,09	0,63 +/- 0,32	57,3 +/- 0,6	М
A52R	-0,84	0,13 +/- 0,04	55,2	М
I54A	-1,28	0,06 +/- 0,09	57,2 +/- 2,5	М
I54K	0,62	1,57 +/- 0,19	57,2	М
Y56A	> 4**	> 1 мкМ	57,5 +/- 0,7	М
Y56K	> 5**	> 4 мкМ	55,4 +/- 1,3	М
E58A	1,90*	13,58 +/- 0,59	54,6 +/- 0,6	М
E60A	1,45*	6,32 +/- 0,44	50,4	М
D61A	бесконечн.**	> 5 мкМ	52,0	М
K62A	0,49	1,26 +/- 0,07	ND	ND
N63A	0,21	0,78 +/- 0,18	ND	М
Q66A	0,86*	2,35 +/- 0,23	ND	М

V68A	0,02	0,57 +/- 0,04	ND	M
V68R	0,55	1,37 +/- 0,05	56,0	M/T
H69Q	0,01	0,56 +/- 0,06	ND	M
E71A	-0,25	0,36 +/- 0,11	52,8 +/- 1,5	M
D73A	-0,14	0,43 +/- 0,01	53,5 +/- 2,1	M
K75A	-0,57	0,21 +/- 0,06	57,7 +/- 1,8	M
V76A	-0,49	0,24 +/- 0,06	55,7	M
H78A	0,10	0,65 +/- 0,01	56,6 +/- 0,6	M
S79A	-0,03	0,52 +/- 0,21	56,3 +/- 0,9	M
S79E	-0,36	0,30 +/- 0,09	60,0	M
S80A	0,07	0,61 +/- 0,05	57,0	M
S80E	0,16	0,71 +/- 0,15	56,8 +/- 4,5	M
R82A	-0,23	0,37 +/- 0,16	51,2 +/- 0,4	M
K105A	-0,19	0,40 +/- 0,08	57,0 +/- 1,5	M
Q107A	-0,13	0,44 +/- 0,03	58,6 +/- 2,0	M/T
A109E	-0,03	0,52 +/- 0,04	54,0	M
V111A	-0,42	0,27 +/- 0,03	50,2 +/- 0,2	M
V111E	-0,39	0,28 +/- 0,07	51,6 +/- 0,0	M
R113A	1,53*	7,22 +/- 0,26	56,7	M
M115A	0,97*	2,79 +/- 0,17	51,4 +/- 0,1	M
S117A	-0,60	0,20 +/- 0,04	52,7 +/- 0,3	M
A121R	-0,10	0,46 +/- 0,20	54,0 +/- 0,5	M
D122A	-0,13	0,44 +/- 0,02	ND	M
Y123A	0,40	1,07 +/- 0,05	ND	M
K124A	0,10	0,65 +/- 0,09	53,1 +/- 0,6	M
R125A	0,41	1,09 +/- 0,04	51,8 +/- 0,2	M
T127K	-0,25	0,36 +/- 0,01	54,0	M
T127A	-0,13	0,44 +/- 0,03	51,4 +/- 0,0	M
K129A	-0,21	0,38 +/- 0,18	50,8 +/- 1,2	M

Важно было подтвердить, что отсутствие связывания с A09-246-2 точечных мутантов Y56A, Y56K и D61A действительно было обусловлено потерей остатков гипервариабельного участка, а не общим разворачиванием антигена. Структурную целостность мутированных белков подтверждали, применяя отслеживаемый при помощи флуоресценции анализ термического разворачивания, при котором белок инкубируют с красителем, который гасится в водном растворе, но флуоресцирует при связывании открытыми гидрофобными остатками. С повышением температуры термическая денатурация бела открывает остатки гидрофобного остова, и этот процесс можно проследить через повышение флуоресценции красителя. Мутанты Y56 или D61 демонстрируют переход между двумя состояниями, подобный наблюдаемому у PD-L1 дикого типа, указывая на свернутую структуру при комнатной температуре. Данные подгоняли по уравнение 1 (на основе Bullock, A. N. et al. Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain. PNAS 94, 14338-14342 (1997)) для определения температуры в точке перегиба кривой ($T_{1/2}$). Уравнение 1:

$$F = \frac{\{F_i + \beta i \cdot T + ((F_{max} + \beta_{max} \cdot T) \cdot e^{[m \cdot (T - T_{1/2})]})\}}{1 + e^{[m \cdot (T - T_{1/2})]}}$$

Мутанты Y56 и D61 демонстрировали минимальную дестабилизацию антигена, на которую указывало небольшое снижение показателя $T_{1/2}$ отслеживаемого через флуоресценцию разворачивания (см. таблицу выше). Это подтверждает, что Y56 и D61 действительно являются связывающими гипервариабельными участками для A09-246-2. Структурная целостность большинства других мутантных белков также подтверждалась этим способом (см. таблицу выше). Наблюдаемое при помощи аналитической эксклюзионной хроматографии (последняя колонка в приведенной выше таблице) поведение большинства мутантных белков, подобное поведению белков дикого типа, дополнительно подтверждает нативную структуру мутантных белков антигенов.

3.6. Связывание с опухолевыми клетками и первичными клетками Связывание A09-246-2 с PD-L1 на поверхности опухолевых клеток, а также на первичных клетках человека и экспериментальных животных было подтверждено анализом FACS. У A09-246-2 была обнаружена способность к реакции с человеческим PD-L1 на всех семи испытываемых линиях опухолей человека (A431, линия эпителиальных клеток карциномы; A549, эпителиальные клетки аденокарциномы легких; ВхPC3, клетки рака поджелудочной железы; HCT116, карцинома ободочной и прямой кишки; M24, линии клеток меланомы; PC3mm2, линия клеток рака предстательной железы; U-87 MG, глиобластома-астроцитомы), из которых PD-L1 подвергали повышенной регуляции путем обработки интерфероном для обеспечения возможно-

сти обнаружения. Поскольку первичные PBMC имеют низкий уровень экспрессии PD-L1, который трудно поддается обнаружению, PBMC человека или PBMC собаки, кролика и крысы подвергали стимуляции РНА в течение 2 дней. У A09-246-2 была обнаружена способность к реакции PD-L1 на первичных клетках человека и животных.

3.7 Показатель EC50, измеряемый путем FACS анализа прямого связывания

Дозозависимая способность связывания A09-246-2 с мишенью на поверхности клеток подтверждалась при помощи FACS. A09-246-2 эффективно связывается с PD-L1 человека, экспрессируемым на поверхности НЕК клеток, с показателем EC50 $0,3 \pm 0,02$ нМ ($0,04 \pm 0,003$ мкг/мл); с PD-L1 яванского макака, экспрессируемым на поверхности НЕК клеток, с показателем EC50 $0,94 \pm 0,015$ нМ ($0,14 \pm 0,002$ мкг/мл); с PD-L1 мыши, экспрессируемым на поверхности НЕК293 клеток, с показателем EC50 $0,34 \pm 0,08$ нМ ($0,05 \pm 0,012$ мкг/мл) и PD-L1 мыши, экспрессируемым на поверхности EL4 клеток, с показателем EC50 $0,91 \pm 0,21$ нМ ($0,13 \pm 0,03$ мкг/мл). Анализы количественно определяли дозозависимые характеристики связывания антитела против PD-L1.

3.8 Активность в клеточных анализах

В настоящее время не существует научных свидетельств того, что связь PD-L1 с лигандами преобразует стимулирующий сигнал через PD-L1 в экспрессирующие PD-L1 клетки, поэтому в разработанных анализах в процедурах используют активацию Т-клеток в процедурах. Способность антитела против PD-L1 к усилению иммунного ответа Т-клеток измеряли *in vitro* в клеточных анализах с применением мышиных Т-клеток или PBMC человека.

а) Анализ ОТ-1

Антиген-специфические Т-клетки CD8 генерировали путем стимуляции спленоцитов трансгенных мышей ОТ-1 с Ова-пептидом SIINFEKL и замораживали для хранения. MPD-L1, сверхэкспрессирующий клетки EL4, использовали как антиген-представляющие клетки. Последовательные разведения испытываемых соединений инкубировали с размороженными Т-клетками ОТ-1 и загруженными SIINFEKL APC в течение 48 часов. IFN- γ в супернатанте измеряли, применяя ELISA-анализ mIFN- γ . Антитело против PD-L1 (A09-246-2) эффективно повышало активность Т-клеток, представленную выработкой IFN- γ , с показателем EC50 $0,28 \pm 0,1$ нМ ($0,04 \pm 0,015$ мкг/мл).

б) Анализ SEA

Во время разработки анализа человеческих PBMC могло быть продемонстрировано, что только обработка антителом против PD-L1 не вызывает выработки IL-2 или IFN- γ в отсутствие активации Т-клеток и не повышает выработку IL-2 в присутствии оптимальной активации. Оценивали способность антитела против PD-L1 к усилению выработки IL-2 Т-клетками, реагирующими на активацию суперантигена. Суперантиген, такой как стафилококковый энтеротоксин А (SEA), способен сшивать Т-клеточный рецептор (TCR) и МНС II класса для активации Т-клеток CD4. Дозозависимая способность A09-246-2 к усилению функций Т-клеток оценивали после такой активации. Последовательные разведения A09-246-2 инкубировали с PBMC человека в присутствии SEA в течение 96 ч. IL-2 человека в супернатанте измеряли с применением ELISA-анализа IL-2 человека. Результаты показали, что антитело против PD-L1 эффективно повышает активность Т-клеток, выражаемую выработкой IL-2 с показателем EC50 $0,08 \pm 0,03$ нМ ($0,012 \pm 0,005$ мкг/мл).

3.9 Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC)

ADCC измеряли, используя две разные линии опухолей человека A431 и A549 в качестве клеток-мишеней и человеческие PBMC в качестве эффекторных клеток. В некоторых случаях выполняли испытания с применением клеток-мишеней после стимуляции интерфероном-гамма для усиления экспрессии PD-L1. Антитело против EGFR, цетуксимаб, использовали в качестве положительного контроля ADCC. С учетом того, что аллотип 158V рецептора Fc γ IIIa демонстрирует более высокую аффинность к человеческому IgG1 и повышает ADCC, наблюдаемые результаты коррелировали с аллотипом донора.

ADCC-активность A09-246-2 была сравнима с активностью, опосредованной антителом против EGFR цетуксимабом, вызывая приблизительно 50% максимального лизиса в обеих линиях клеток. Обработка INF- γ не меняла реакции клеток A431 ни для одного из разных испытанных аллотипов (V/V, V/F и F/F). Значительная разница (почти в два раза) между стимулированными и нестимулированными клетками наблюдалась, когда клетки A549 применяли для PBMC от доноров V/V и V/F. При анализе PBMC от доноров F/F с клетками A549 ADCC не наблюдалось.

4. In vivo активность

В представленных в данном описании исследованиях изучали эффективность блокады антитела против PD-L1 (Ab) против различных моделей опухолей у мышей. Предполагается, что ингибирование взаимодействия PD-1/PD-L1 обеспечивает терапевтический эффект через возобновление противоопухолевых реакций CD8⁺ Т-клеток, поэтому все доклинические исследования эффективности проводили на синергетических моделях опухолей у мышей, в которых иммунная система хозяина является полностью интактной. Чтобы избежать потребности в суррогатном антителе, антитело, применяемое в исследованиях, специально отбирали на перекрестную реактивность с мышинным PD-L1. Однако, поскольку антитело является полностью человеческим, у мышей вызывается нейтрализация иммуногенности, которая огра-

ничивает окно эффективных доз семидневным периодом. Несмотря на это значительное ограничение доз, выбранное антитело продемонстрировало значительную активность в качестве монотерапии и в различных вариантах комбинированной терапии. Противоопухолевая активность антитела против PD-L1 продемонстрировала дозозависимую тенденцию при применении в качестве монотерапии против опухоли MC38.

Иммуногистохимический анализ экспрессии PD-L1 в реагирующих и нереагирующих моделях опухолей обнаружил сильную связь между уровнем экспрессии PD-L1 и уровнем противоопухолевой эффективности. Для подтверждения предполагаемого механизма действия (МОА) проводили исследование на мышах с опухолью MC38, из организма которых удаляли $CD8^+$ Т-клетки. У животных, лишенных $CD8^+$ Т-клеток, эффективность терапии с применением антитела против PD-L1 полностью исчезала, что подтверждало, что эффекторная функция цитотоксичных Т-лимфоцитов (CTL) отвечает за ингибирование роста опухоли.

Для оценки комбинированного потенциала терапии с применением антитела против PD-L1 отбирались партнеры по комбинации, наверняка вызывающие противоопухолевые реакции Т-клеток или иным образом усиливающие эффект иммунотерапии. В комбинации с фракционной лучевой терапией против опухолей MC38 антитело против PD-L1 демонстрировало синергетическую активность с лечебным потенциалом. Комбинация с однократной низкой дозой циклофосфида в результате усиливала противоопухолевый эффект в модели MC-38, который был связан с повышенной частотой специфических к опухолевым антигенам $CD8^+$ Т-клеток. Терапия с применением антител против PD-L1 значительно продлевала время выживания при комбинации с гемцитабином в модели ортотопической опухоли PANC02 рака поджелудочной железы. При комбинировании антитела против PD-L1 с предварительным лечением циклофосфамидом с последующей вакцинацией Stimuvax достигалось значительное увеличение ингибирования роста опухоли в моделях опухоли MC38/MUC1 и PANC02/MUC1. Значительное повышение эффективности также наблюдалось при комбинации антитела против PD-L1 с основными компонентами режима химиотерапии FOLFOX. Таким образом, были успешно определены несколько перспективных комбинированных подходов к терапии с применением антитела против PD-L1, включая три "стандартных" режима лечения (лучевая терапия; FOLFOX; Гемцитабин).

Механистические данные, полученные по результатам этих исследований, продемонстрировали, что терапия с применением антитела против PD-L1 неизменно связана с повышенным процентом $CD8^+$ Т-клеток, $CD8^+$ Т эффекторных клеток памяти и $PD-1^+CD8^+$ Т-клеток в селезенке и опухолях подвергнутых лечению мышей.

4.1 Реакция на дозу в модели опухоли MC38 и комбинация с СРА

В этом исследовании мышам делали подкожную прививку в правый бок с введением 1×10^6 клеток карциномы толстой кишки MC38. Когда опухоли достигали среднего размера $\sim 50 \text{ мм}^3$, мышей разбивали на экспериментальные группы (N=14) (определяемые в день начала отсчета времени). Группам внутривенно вводили A09-246-2 на уровне доз 100, 200, 400 или 800 мкг на 0, 3 и 6-й дни. Контрольная группа получала 200 мкг антитела неактивного типа. Опухоли измеряли два раза в неделю на протяжении исследования. Все экспериментальные группы демонстрировали значительную эффективность ($P < 0,050$) по сравнению с изотипической контрольной группой. Хотя группа, получавшая дозу 800 мкг, не демонстрировала повышенной эффективности по сравнению с группой, получавшей 400 мкг, наблюдалась значительная тенденция в направлении дозозависимого эффекта. Во втором исследовании зависимости доза-эффект, которое проводили по тому же плану, также наблюдалась тенденция в направлении дозозависимой активности. Однако в группе, получавшей дозу 800 мкг, в этом конкретном исследовании наблюдалась значительно более низкая противоопухолевая активность по сравнению с группой, получавшей дозу 400 мкг. Отсутствие повышенной эффективности при дозах свыше 400 мкг может указывать на плато эффективности в результате насыщения мишени, или же при более высоких дозах может иметь место более сильный иммуногенный эффект, в результате чего воздействие лекарственного препарата снижается.

Кроме того, в этих исследованиях изучали эффективность антитела против PD-L1 в комбинации с предварительным лечением с применением низкой, иммуномодулирующей дозы циклофосфида (СРА). По наблюдениям, комбинация СРА значительно улучшала эффективность низких доз антитела против PD-L1 (100 мкг), и этот эффект был связан с повышенной частотой специфических к опухолевому антигену p15E $CD8^+$ Т-клеток, как определяли при помощи ELISPOT.

Данные иммунофенотипирования по результатам этих исследований обнаружили, что терапия с применением антитела против PD-L1 связана со значительно повышенным процентом различных субпопуляций $CD8^+$ Т-клеток в селезенке: общих $CD8^+$ Т-клеток, специфических к опухолевому антигену p15E $CD8^+$

Т-клеток, $PD-1^+CD8^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т эффекторных клеток (T_{EM}) и $CD8^+$ Т центральных клеток памяти (T_{CM}). Также наблюдалось повышенное внутриопухолевое накопление $CD8^+$ Т-клеток и $CD8^+$ T_{EM} клеток. Эти наблюдения подтверждают, что терапия с применением антитела против PD-L1 является эффективным способом вызывания противоопухолевой реакции $CD8^+$ Т-клеток.

4.2 Эффективность в модели рассеянного лейкоза с C1498/GFP

Для создания модели рассеянного лейкоза лейкозные клетки C4198-GFP (2×10^4) вводили путем внутривенной инъекции мышам C57BL/6 на 0-й день. Затем мышей рандомизированно распределяли по экспериментальным группам ($N=5$), которые получали дозу 400 мкг антитела против PD-L1 Ab (A09-246-2) или эквивалентную дозу изотипного антитела неактивного типа на 1, 4 и 7-й дни путем внутривенной инъекции. Первичной конечной точкой этого исследования было выживание после появления клинических признаков, указывающих на распространение метастазов, гарантирующих гибель животных. В конце исследования (76-й день) 20% мышей (1/5) еще были живы в группе, получавшей изотипное антитело, и 80% (4/5) выживших животных оставались в группе, получавшей A09-246-2.

4.3 Комбинация с Гемцитабином в ортотопической модели PANC02

Проводили три отдельных исследования для изучения комбинации антитела против PD-L1 MAb (A09-246-2) и Гемцитабина (GEM). Исследования планировались для позиционирования терапии с применением антитела против PD-L1 в пределах периода паузы химиотерапии 21- или 28-дневного цикла GEM. Ортотопические модели включают инокуляцию опухолевых клеток в орган происхождения, в результате которой происходит близкая рекапитуляция прогрессирования болезни при ее возникновении в организме человека. Для создания модели аденокарциномы поджелудочной железы клетки PANC02 (1×10^6) инъецировали в поджелудочную железу самок мышей C57BL/6. Через пять дней мышей рандомизированно распределяли по экспериментальным группам. GEM вводили в дозе 150 мг/кг во всех исследованиях, а A09-246-2 вводили в дозе 400 мкг каждой мыши. В двух исследованиях моделировали 28-дневный цикл GEM (введение на 5, 19 и 26-й дни) с 14-дневным периодом паузы, на протяжении которого A09-246-2 вводили на 8, 11 и 14-й дни. В третьем исследовании моделировали 21-дневный цикл GEM (введение на 5, 12, 26 и 33-й дни), с 14-дневным периодом паузы, на протяжении которого A09-246-2 вводили на 13, 16 и 19-й дни. Монотерапия с применением GEM или антитела против PD-L1 не обеспечивала продления времени выживания в этой модели. Однако во всех трех исследованиях комбинация GEM и A09-246-2 значительно продлевала среднее время выживания ($P < 0,02$). Иммунофенотипирование обнаружило несколько эффектов в группах, получавших A09-246-2, как в режиме монотерапии, так и в комбинации с GEM, что соответствовало предполагаемому МОА антитела против PD-L1, включая повышенный процент $CD8^+$ ТЕМ в селезенке, повышенное соотношение селезеночных $CD8^+$ ТЕМ с T_{reg} клетками и повышенный процент селезеночных PD-1 $^+$ $CD8^+$ Т-клеток. Кроме того, иммунофенотипирование проникающих в опухоль лимфоцитов (TIL) продемонстрировало значительно повышенный процент $CD8^+$ TIL в комбинированной группе.

4.4 Комбинация с низкой дозой циклофосфида (CRA)

Известно, что CRA в низких дозах усиливает противоопухолевые иммунные реакции через ингибирование иммуносупрессивных регуляторных Т-клеток. Потенциал низкодозированного предварительного лечения с применением CRA исследовали для повышения эффективности антитела против PD-L1 Ab (A09-246-2) в модели подкожной опухоли MC38. Мышам подкожно в правый бок инокулировали 1×10^6 MC38 клеток карциномы толстой кишки. Когда опухоли достигали среднего объема $\sim 50 \text{ мм}^3$, мышей разбивали на экспериментальные группы ($N=14$) на 0-й день. Комбинированная группа получала 100 мкг A09-246-2 путем внутривенной инъекции на 0, 3 и 6-й дни, с применением и без применения предварительного лечения дозой 100 мг/кг CRA, которую доставляли внутривенно в -1-й день. Контрольная группа получала 100 мкг антитела неактивного типа в комбинации с предварительным лечением CRA. Комбинированная группа демонстрировала статистически значимое повышение ($p < 0,050$) противоопухолевой активности по сравнению с изотипической и монотерапевтической контрольными группами. Применяя анализ ELISPOT, измеряли влияние от лечения на величину реакции $CD8^+$ Т-клеток, направленной против хорошо изученного опухолевого антигена p15E. И CRA, и A09-246-2 демонстрировали существенно повышенный уровень p15E-реактивных $CD8^+$ Т-клеток (~ 100 точек в обеих группах) по сравнению с изотипическим контролем (~ 25 точек), причем в комбинированной группе наблюдалось дальнейшее повышение (~ 250 точек). Таким образом, противоопухолевая эффективность комбинации CRA плюс A09-246-2 была связана с повышенной частотой реагирующих с опухолевым антигеном CTL.

4.5 Комбинация с циклофосфамидом/Stimuvax

Способность блокирования PD-L1 к восстановлению противоопухолевой реакции Т-клеток достаточно обосновывает целесообразность комбинации и противораковыми вакцинами. Stimuvax представляет собой вакцину против MUC1 антигена человека, который обычно сверхэкспрессируется твердыми опухолями. Мыши, которые являются трансгенными в отношении белка MUC1 человека (MUC1.tg) иммунологически толерантны к антигену и при инокуляции мышинных опухолей, которые также экспрессируют MUC1 человека, обеспечивают релевантную модель клинических условий вакцинации. В клинических условиях предварительное лечение циклофосфамидом (CRA) применяют в комбинации с Stimuvax в качестве способа временного истощения иммуносупрессивных T_{reg} клеток, ингибирующих вакцинную реакцию.

В этом исследовании мышам MUC1.tg подкожно инокулировали в правую заднюю боковую область 1×10^6 MC38/MUC1 клеток карциномы толстой кишки. Через пять дней после инокуляции опухоле-

вых клеток мышей рандомизированно распределяли по экспериментальным группам (N=10) на -3-й день. На -3-й день внутривенно вводили дозу 100 мг/кг CPA. Вакцинацию начинали на 0-й день и повторяли еженедельно. Дозу антитела против PD-L1 Ab (A09-246-2) вводили путем внутрибрюшинной инъекции на 0, 3 и 6-й дни. Опухоли измеряли два раза в неделю. Комбинация CPA/Stimuvax и A09-246-2 продемонстрировала значительно усиленное ингибирование ($p < 0,050$) роста опухолей по сравнению с применением CPA/Stimuvax.

Во втором исследовании 1×10^6 PANC02/MUC1 клеток инокулировали в поджелудочную железу мышей MUC1.tg. Через четыре дня мышей рандомизированно распределяли по группам (N=8) и начинали лечение. Применяли такой же план лечения, как и для первого исследования. Комбинация CPA/Stimuvax и антитела против PD-L1 (A09-246-2) значительно увеличивала среднее время выживания (MST) по сравнению с лечением с применением CPA/Stimuvax (MST 43,5 дня по сравнению с 70 днями, $P = 0,0001$). Иммунофенотипирование согласно FACS продемонстрировало значительную тенденцию в направлении увеличения процента $CD8^+$ T_{ЕМ} и $CD8^+$ T_{СМ} в комбинированной группе.

4.6 Комбинация с фракционной лучевой терапией

Было продемонстрировано, что лучевая терапия (RT) повышает иммуногенность опухолевых клеток через повышенную экспрессию МНС I класса и диверсификацию внутриклеточного пептидного пула. Для испытания лечения с применением антитела против PD-L1 в комбинации с лучевой терапией MC38 клетки карциномы толстой кишки (1×10^5) внутримышечно инокулировали в правую четырехглавую мышцу самок мышей C57BL/6. Когда опухоли достигали среднего объема 150 мм³, мышей разбивали на экспериментальные группы (N=8) на 0-й день. Конечности с опухолью отделяли и обрабатывали 360 сГр гамма-облучения из источника цезия-137 на 0, 1, 2, 3 и 4-й дни (общая доза 1800 сГр). Антитело против PD-L1 Ab (A09-246-2) внутривенно вводили в дозе 400 мкг на 3, 6 и 9-й дни. Комбинация A09-246-2 и лучевой терапии в результате давала высокий показатель регрессии опухолей, в конечном счете приводя к 6/10 полным ответам (CR). Мышей с CR подвергали повторной антигенной стимуляции путем инокуляции опухолевых клеток MC38, и у 3/6 опухоль отсутствовала через семьдесят четыре дня после повторной антигенной стимуляции, что указывало на то, что комбинированная терапия обеспечивала эффективную иммунологическую память. И наоборот, в контрольной группе, которая получала изотипическое контрольное антитело в комбинации с облучением, наблюдалось значительное ингибирование роста опухоли, но не вызывалась регрессия.

Проводили повторное исследование с применением комбинации RT и антитела против PD-L1 (A09-246-2) с включением второй получавшей комбинированную терапию группы, в которой из организма мышей удаляли $CD8^+$ Т-клетки. Дополнительные иммунологические определения показаний, применяемые в этом исследовании, включали определяемое при помощи FACS иммунофенотипирование спленоцитов, *in vivo* анализ пролиферации и анализ ELISPOT. Кроме того, комбинация продемонстрировала синергетическую эффективность, вызывающую первоначальную фазу регрессии или стаза во всех опухолях. Однако полная регрессия наблюдалась только у 1/8 мышей, а у еще одной мыши наблюдался продленный период стаза опухоли. Удаление $CD8^+$ Т-клеток полностью исключало синергизм комбинации, подтверждая, что механизм включает стимуляцию реакции противоопухолевых $CD8^+$ Т-клеток. Это наблюдение дополнительно подтверждалось повышенной частотой $CD8^+$ Т-клеток, реагирующих на опухолевый антиген p15E. Иммунофенотипирование согласно FACS обнаружило повышенный процент пролиферации $CD8^+$ Т-клеток в селезенке и повышенный процент в селезенке $CD8^+$ T_{ЕМ} и $CD8^+$ T_{СМ}. 4.7 Комбинация с основными компонентами режима FOLFOX FOLFOX представляет собой комбинированный режим химиотерапии, состоящий из фолиновой кислоты, 5-фторурацила (5-FU) и оксалиплатина (OX), который применяют для лечения III стадии рака ободочной и прямой кишки. Исследовали потенциал комбинирования антитела против PD-L1 с основными компонентами FOLFOX (5-фторурацилом и оксалиплатином) в модели подкожной MC38 карциномы толстой кишки. Мышам в правый бок подкожно инокулировали 1×10^6 клеток MC38 карциномы толстой кишки. Когда опухоли достигали среднего объема ~50 мм³, мышей разбивали на экспериментальные группы (N=10) на 0-й день. 5-FU (60 мг/кг внутривенно) и OX (5 мг/кг внутрибрюшинно) вводили на 0 и 14-й дни. Антитело против PD-L1 Ab (A09-246-2) (400 мкг внутривенно) вводили на 3, 6 и 9-й дни. Наблюдалось, что комбинированное лечение обеспечивает значительно большую эффективность ($p < 0,050$) по сравнению с введением только A09-246-2 или 5-FU и OX, вводимыми в комбинации с изотипным антителом. Проводили повторное исследование комбинации антитела против PD-L1 Ab и FOLFOX, и комбинация снова продемонстрировала значительно большую ($p < 0,050$) противоопухолевую активность, чем при любом режиме монотерапии.

Иммунофенотипирование на основе FACS, проводимое в этих исследованиях, обнаружило увеличение в некоторых иммунологических маркерах, соответствующее вызываемому $CD8^+$ Т-клетками MOA, включая повышенный уровень в селезенке специфических к опухолевому антигену p15E $CD8^+$ Т-клеток, повышение в селезенке соотношения T_{ЕМ} с регуляторными Т-клетками (T_{рег}) и повышенный процент в селезенке $CD8^+$ PD-1⁺ Т-клеток. Кроме того, наблюдалось, что процент проникающих в опухоль природных киллерных (NK) клеток и $CD8^+$ Т-клеток в комбинированной группе значительно повышался.

4.8 4-недельное предварительное исследование токсичности повторной дозы у яванского макака

Четыре группы по 2 самца и 2 самки яванского макака получали антитела против PD-L1 человека (A09-246-2) в дозах 0 (наполнитель), 20, 60 и 140 мг/кг путем еженедельной внутривенной инфузии при общем количестве 5 введений.

Оценка ТК указывает, что все животные подвергались воздействию испытываемого материала на протяжении всего исследования. Уровень воздействия возрастал приблизительно пропорционально увеличению дозы при 1-й и 4-й дозе без какого бы то ни было существенного накопления или зависимости от пола при любой дозе. Антитело против медикамента обнаруживалось у 2/4 и 1/4 обезьян при 20 и 140 мг/кг, соответственно. Случаев преждевременной смерти животных в этом исследовании не было. Не отмечалось связанных с лечением изменений в группах, получавших дозы 20 и 60 мг/кг для всех параметров, оцениваемых в ходе исследования.

При высоком уровне дозы 140 мг/кг связанный с лечением результаты включают небольшое снижение лимфоцитов в гематологических испытаниях, небольшое снижение числа лимфоцитов вместе со снижением количества NK клеток на 30-й день исследования. Не отмечалось значительных гистологических изменений в жизненно важных органах/тканях, за исключением умеренного около сосудистого кровотечения и воспаления/некроза сосудов, наблюдаемого в месте инъекции при 140 мг/кг. Не наблюдалось четкой тенденции или изменений в мультицитокининовом анализе на этом уровне доз. На основе результатов этого исследования в качестве уровня отсутствия наблюдаемых нежелательных эффектов (NOAEL) был определен уровень 140 мг/кг.

Вывод: A09-246-2 переносится яванским макаком на уровне доз до 140 мг/кг после получения общего количества из 5 последовательных еженедельных доз. Наблюдались реакции в местах инъекций с умеренной выраженностью подкожных/околососудистых и сосудистых воспалительных и дегенеративных изменений при 140 мг/кг.

Перечень последовательностей

```
<110> Мерк Патент ГмбХ
<120> Антитела против PD-L1 и их применение
<130> P 11/183
<150> US 61/563,903
<151> 2011-11-28
<160> 35
<170> PatentIn версия 3.5
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> из библиотеки FAB человека
<220>
<221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
<222> (1)..(1)
<223> X = K, R, T, Q, G, A, W, M, I или S
<220>
<221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
<222> (3)..(3)
<223> X = V, R, K, L, M или I
<220>
<221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
<222> (5)..(5)
<223> X = H, T, N, Q, A, V, Y, W, F или M
<400> 1
Xaa Tyr Xaa Met Xaa
1 5
<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> из библиотеки FAB человека
<220>
<221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
```

<222> (8)..(8)
 <223> X = F или I

<220>
 <221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
 <222> (14)..(14)
 <223> X = S или T

<400> 2

Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Xaa Thr Phe Tyr Ala Asp Xaa Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> из библиотеки FАВ человека

<220>
 <221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
 <222> (10)..(10)
 <223> X = E или D

<400> 3

Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Xaa Tyr
 1 5 10

<210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> из библиотеки FАВ человека

<400> 4

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> из библиотеки FАВ человека

<400> 5

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 6
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> из библиотеки FАВ человека

<400> 6

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> из библиотеки FАВ человека

<400> 7

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> из библиотеки FАВ человека

<220>

<221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
 <222> (4)..(4)
 <223> X = N или S

<220>
 <221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
 <222> (5)..(5)
 <223> X = T, R или S

<220>
 <221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
 <222> (9)..(9)
 <223> X = A или G

<400> 8

Thr	Gly	Thr	Xaa	Xaa	Asp	Val	Gly	Xaa	Tyr	Asn	Tyr	Val	Ser
1				5					10				

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> из библиотеки FAV человека

<220>
 <221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
 <222> (1)..(1)
 <223> X = E или D

<220>
 <221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
 <222> (3)..(3)
 <223> X = I, N или S

<220>
 <221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
 <222> (4)..(4)
 <223> X = D, H или N

<400> 9

Xaa	Val	Xaa	Xaa	Arg	Pro	Ser
1				5		

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> из библиотеки FАВ человека

<220>
 <221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
 <222> (3)..(3)
 <223> X = F или Y

<220>
 <221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
 <222> (5)..(5)
 <223> X = N или S

<220>
 <221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
 <222> (6)..(6)
 <223> X = R, T или S

<220>
 <221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
 <222> (7)..(7)
 <223> X = G или S

<220>
 <221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
 <222> (8)..(8)
 <223> X = I или T

<400> 10

Ser Ser Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Val
 1 5 10

<210> 11
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> из библиотеки FАВ человека

<400> 11

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys
 20

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

```

<220>
<223> из библиотеки FАВ человека

<400> 12

Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr
1          5          10          15

<210> 13
<211> 32
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> из библиотеки FАВ человека

<400> 13

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser
1          5          10          15

Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
          20          25          30

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> из библиотеки FАВ человека

<400> 14

Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
1          5          10

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> из библиотеки FАВ человека

<400> 15

Ser Tyr Ile Met Met
1          5

```

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> из библиотеки FАВ человека

<400> 16

Ser	Ile	Tyr	Pro	Ser	Gly	Gly	Ile	Thr	Phe	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> из библиотеки FАВ человека

<400> 17

Ile	Lys	Leu	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Val	Asp	Tyr
1			5						10	

<210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> из библиотеки FАВ человека

<400> 18

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Val	Ser
1			5						10				

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> из библиотеки FАВ человека

<400> 19

Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> из библиотеки FАВ человека

<400> 20

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Arg Val
1 5 10

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> из библиотеки FАВ человека

<400> 21

Met Tyr Met Met Met
1 5

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> из библиотеки FАВ человека

<400> 22

Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 23
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> из библиотеки FАВ человека

<400> 23

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ala Tyr Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 24

<211> 120

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> из библиотеки FАВ человека

<220>

<221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

<222> (1)..(120)

<223> А09-246-2 переменная область тяжелой цепи

<400> 24

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

```

<210> 25
<211> 110
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> из библиотеки FАВ человека

<220>
<221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
<222> (1)..(110)
<223> A09-246-2 переменная область легкой цепи

<400> 25

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1          5          10          15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
          20          25          30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
          35          40          45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
          50          55          60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65          70          75          80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
          85          90          95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
          100          105          110

<210> 26
<211> 120
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> из библиотеки FАВ человека

<220>
<221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
<222> (1)..(120)

```

<223> A09-188-1 переменная область тяжелой цепи

<400> 26

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Tyr
20 25 30

Met Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27

<211> 110

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> из библиотеки FAV человека

<220>

<221> ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

<222> (1)..(110)

<223> A09-188-1 переменная область легкой цепи

<400> 27

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

036814

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ala Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 28
<211> 290
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr

036814

100	105	110
Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val 115 120 125		
Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val 130 135 140		
Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr 145 150 155 160		
Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser 165 170 175		
Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn 180 185 190		
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr 195 200 205		
Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu 210 215 220		
Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His 225 230 235 240		
Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr 245 250 255		
Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys 260 265 270		
Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu 275 280 285		
Glu Thr 290		
<210> 29		
<211> 226		
<212> PRT		
<213> Искусственная последовательность		

<220>

<223> из библиотеки FAB человека

<400> 29

Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser
 1 5 10 15

Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu
 20 25 30

Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln
 35 40 45

Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg
 50 55 60

Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys
 85 90 95

Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val
 100 105 110

Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
 115 120 125

Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
 130 135 140

Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
 145 150 155 160

Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
 165 170 175

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
 180 185 190

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
 195 200 205

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg His His His His
 210 215 220

His His
 225

<210> 30
 <211> 1407
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> из библиотеки FАВ человека

<400> 30
 atggagttgc ctgttaggct gttgggtgctg atgttctgga ttctgtctag ctccagcgag
 60

gtgcagctgc tggaaatccgg cggaggactg gtgcagcctg gcggctccct gagactgtct
 120

tgcgccgct ccggcttcac cttctccagc tacatcatga tgtgggtgcg acaggccct
 180

ggcaagggcc tggaatgggt gtctccatc taccctccg gcggcatcac cttctacgcc
 240

gacacgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg
 300

cagatgaact cctgcgggc caggacacc gccgtgtact actgcgccg gatcaagctg
 360

ggcaccgtga ccaccgtgga ctactggggc cagggcaccc tggtgacagt gtctccgcc
 420

tcaccaagg gccatcggt cttccccctg gcacctctt ccaagagcac ctctgggggc
 480

acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttcccc aaccggtgac ggtgtcgtgg
 540

aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttcccg ctgtctaca gtctcagga
 600

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac
 660

atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagccaaa
 720

tcttgtagaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg

780

tcagtctctcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag
840

gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac
900

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc
960

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag
1020

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa
1080

gccaaaggcg agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcacg ggatgagctg
1140

accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc
1200

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg
1260

gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag cagggtggcag
1320

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag
1380

aagagcctct cctgtcccc gggtaaa
1407

<210> 31
<211> 705
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> из библиотеки FАВ человека

<400> 31
atggagttagc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcttgcttc cttaaagccag
60

tccgcctga cccagcctgc ctccgtgtct ggctcccctg gccagtccat caccatcagc
120

tgcaccggca cctccagcga cgtgggaggc tacaactacg tgtcctggta tcagcagcac
180

cccggcaagg cccccaagct gatgatctac gacgtgtcca accggccctc cggcgtgtcc
240

aacagattct ccggctccaa gtcgggcaac accgcctccc tgaccatcag cggactgcag
300

gcagaggacg agggcgacta ctactgctcc tcctacacct cctccagcac cagagtgttc
360

ggcaccggca caaaagtgc cgtgctgggc cagcccaagg ccaacccaac cgtgacactg
420

ttcccccat cctccgagga actgcaggcc aacaaggcca ccctggtctg cctgatctca
480

gatttctatc caggcgccgt gaccgtggcc tggaaggctg atggctcccc agtgaaggcc
540

ggcgtggaaa ccaccaagcc ctccaagcag tccaacaaca aatacgccgc ctctcctac
600

ctgtccctga ccccgagca gtggaagtcc caccggtcct acagctgcca ggtcacacac
660

gagggtctca ccgtggaaaa gaccgtcgcc cccaccgagt gctca
705

<210> 32
<211> 450
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> из библиотеки FAV человека

<220>
<221> ЦЕПЬ
<222> (1)..(450)
<223> A09-246-2 полная тяжелая цепь

<220>
<221> ЦЕПЬ
<222> (1)..(30)
<223> A09-246-2 каркасная область 1 тяжелой цепи

<220>
<221> ЦЕПЬ
<222> (1)..(120)
<223> A09-246-2 переменная область тяжелой цепи

<220>
<221> СВЯЗЫВАНИЕ
<222> (31)..(35)
<223> A09-246-2 определяющая комплементарность область 1 тяжелой цепи

```

<220>
<221> ЦЕПЬ
<222> (36)..(49)
<223> A09-246-2 каркасная область 2 тяжелой цепи

<220>
<221> СВЯЗЫВАНИЕ
<222> (50)..(66)
<223> A09-246-2 определяющая комплементарность область 2 тяжелой
цепи

<220>
<221> ЦЕПЬ
<222> (67)..(98)
<223> A09-246-2 каркасная область 3 тяжелой цепи

<220>
<221> СВЯЗЫВАНИЕ
<222> (99)..(109)
<223> A09-246-2 определяющая комплементарность область 3 тяжелой
цепи

<220>
<221> ЦЕПЬ
<222> (110)..(120)
<223> A09-246-2 каркасная область 4 тяжелой цепи

<220>
<221> ЦЕПЬ
<222> (121)..(218)
<223> A09-246-2 константный домен 1 тяжелой цепи

<220>
<221> ЦЕПЬ
<222> (219)..(233)
<223> A09-246-2 шарнирная область

<220>
<221> ЦЕПЬ
<222> (234)..(450)
<223> A09-246-2 константный домен 2 и 3 тяжелой цепи

<400> 32

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

```

036814

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

036814

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 33
<211> 216
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> из библиотеки FAE человека

<220>
 <221> ЦЕПЬ
 <222> (1)..(216)
 <223> A09-246-2 полная легкая цепь

<220>
 <221> ЦЕПЬ
 <222> (1)..(22)
 <223> A09-246-2 каркасная область 1 легкой цепи

<220>
 <221> ЦЕПЬ
 <222> (1)..(110)
 <223> A09-246-2 переменная область легкой цепи

<220>
 <221> СВЯЗЫВАНИЕ
 <222> (23)..(36)
 <223> A09-246-2 определяющая комплементарность область 1 легкой цепи

<220>
 <221> ЦЕПЬ
 <222> (37)..(51)
 <223> A09-246-2 каркасная область 2 легкой цепи

<220>
 <221> СВЯЗЫВАНИЕ
 <222> (52)..(58)
 <223> A09-246-2 определяющая комплементарность область 2 легкой цепи

<220>
 <221> ЦЕПЬ
 <222> (59)..(90)
 <223> A09-246-2 каркасная область 3 легкой цепи

<220>
 <221> СВЯЗЫВАНИЕ
 <222> (91)..(100)
 <223> A09-246-2 определяющая комплементарность область 3 легкой цепи

<220>
 <221> ЦЕПЬ
 <222> (101)..(110)
 <223> A09-246-2 каркасная область 4 легкой цепи

<220>
 <221> ЦЕПЬ
 <222> (111)..(216)
 <223> A09-246-2 постоянный домен легкой цепи

<400> 33

036814

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

036814

<210> 34
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> из библиотеки FАВ человека

<220>
 <221> ЦЕПЬ
 <222> (1)..(450)
 <223> А09-188-1 полная тяжелая цепь

<400> 34

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Tyr
 20 25 30

Met Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

036814

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

036814

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 35
<211> 216
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> из библиотеки FАВ человека

<220>
<221> ЦЕПЬ
<222> (1)..(216)
<223> A09-188-1 полная легкая цепь

<400> 35

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ala Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

```

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
      85                      90                      95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
      100                    105                    110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
      115                    120                    125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
      130                    135                    140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
      145                    150                    155                    160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
      165                    170                    175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
      180                    185                    190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
      195                    200                    205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
      210                    215

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающие последовательность варибельной области тяжелой цепи и легкой цепи, причем:

(a) тяжелая цепь включает HVR-H1, HVR-H2 и HVR-H3, причем также (i) последовательность HVR-H1 представляет собой $X_1YX_2MX_3$ (SEQ ID NO: 1); (ii) последовательность HVR-H2 представляет собой SIYPSGGX₄TFYADX₅VKG (SEQ ID NO: 2); (iii) последовательность HVR-H3 представляет собой IKLGTVTTVX₆Y и (SEQ ID NO: 3);

(b) легкая цепь включает HVR-L1, HVR-L2 и HVR-L3, причем также (iv) последовательность HVR-L1 представляет собой TGTX₇X₈DVGX₉YNYVS (SEQ ID NO: 8); (v) последовательность HVR-L2 представляет собой $X_{10}VX_{11}X_{12}RPS$ (SEQ ID NO: 9); (vi) последовательность HVR-L3 представляет собой SSX₁₃TX₁₄X₁₅X₁₆X₁₇RV (SEQ ID NO: 10);

причем также

X_1 представляет собой M, I или S; X_2 представляет собой L, M или I; X_3 представляет собой F или M; X_4 представляет собой I; X_5 представляет собой S или T; X_6 представляет собой D; X_7 представляет собой S; X_8 представляет собой S; X_9 представляет собой A или G; X_{10} представляет собой D; X_{11} представляет собой S; X_{12} представляет собой N; X_{13} представляет собой Y; X_{14} представляет собой S; X_{15} представляет собой S; X_{16} представляет собой S; X_{17} представляет собой T.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, отличающийся тем, что X_1 представляет собой S; X_2 представляет собой I; X_3 представляет собой M; X_5 представляет собой T; X_9 представляет собой G.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1, 2, отличающийся тем, что:

(a) каркасные последовательности варибельных областей тяжелой цепи являются следующими:

(i) HC-FR1 представляет собой EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 4);

(ii) HC-FR2 представляет собой WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO: 5);

(iii) HC-FR3 представляет собой RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 6);

(iv) HC-FR4 представляет собой WGQGT LTVSS (SEQ ID NO: 7) и

(b) каркасные последовательности варибельных областей легкой цепи являются следующими:

(i) LC-FR1 представляет собой QSALTQPASVSGSPGQSITISC (SEQ ID NO: 11);

(ii) LC-FR2 представляет собой WYQQHPGKAPKLMYI (SEQ ID NO: 12);

(iii) LC-FR3 представляет собой GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC (SEQ ID NO: 13);

(iv) LC-FR4 представляет собой FGTGTKVTVL (SEQ ID NO: 14).

4. Антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий последовательность варибельной области тяжелой цепи и последовательность варибельной области легкой цепи, где

а) тяжелая цепь включает последовательность

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSG-
GITFYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGT LTVSS

(SEQ ID NO: 24) и

б) легкая цепь включает последовательность

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPK-LMP7DVSNRPSGVSNRFSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTRVFGTGTKVTVL (SEQ ID NO: 25).

5. Антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 32 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 33.

6. Фрагмент антитела по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что также включает C_L, C_H1, C_H2 и C_H3 домен.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что также включает человеческую или мышиную константную область, причем константная область представляет собой IgG1.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что антитело способно блокировать взаимодействие между PD-L1 человека, мыши или яванского макака и соответствующими рецепторами PD-L1 человека, мыши или яванского макака.

9. Композиция для лечения рака или снижения резистентности опухоли к атаке иммунной системой, включающая антитело против PD-L1 или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8 и как минимум один фармацевтически приемлемый носитель.

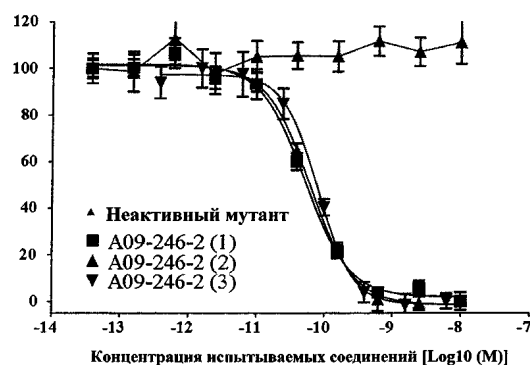
10. Применение антитела против PD-L1 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8, которое вызывает антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC), для лечения рака.

11. Применение антитела против PD-L1 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-8 для снижения резистентности опухоли к атаке иммунной системой.

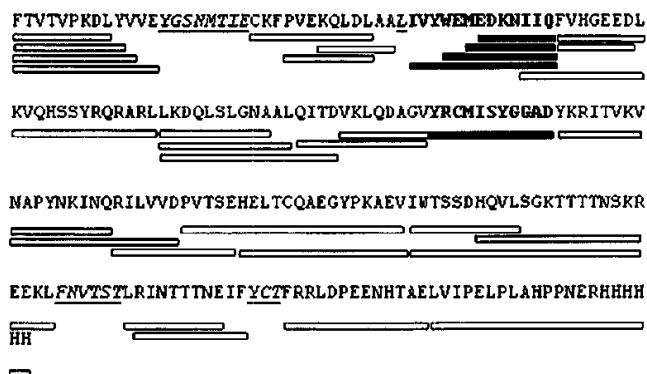
12. Применение комбинации антитела по пп.1-8 или его антигенсвязывающего фрагмента с дополнительным терапевтическим средством или вакциной, выбранными из группы, состоящей из гемцитабина, циклофосфида, комбинации 5-фторурацила и оксалиплатина или Stimuvax.

13. Композиция по п.9, которая представляет собой жидкую композицию, где фармацевтически приемлемые носители представляют собой 10 mM ацетат, 5,1% (мас./об.) маннит, 1,4 mM метионин, 0,05% (мас./об.) Tween 20.

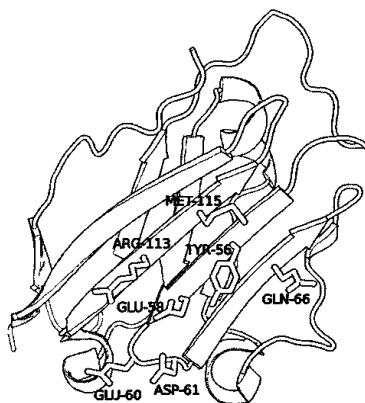
% специфического связывания



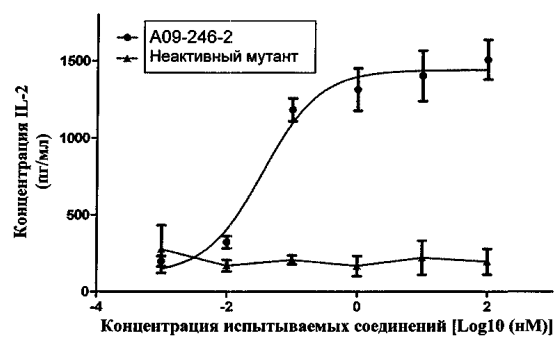
Фиг. 1



Фиг. 2

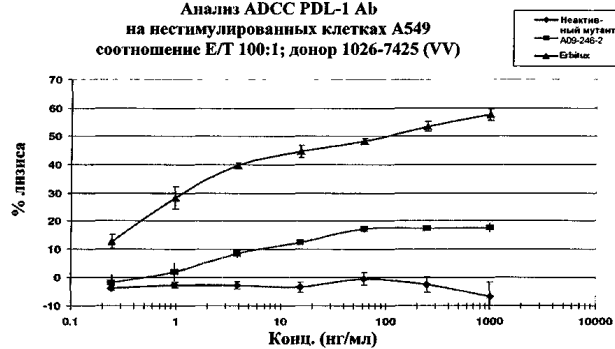


Фиг. 3



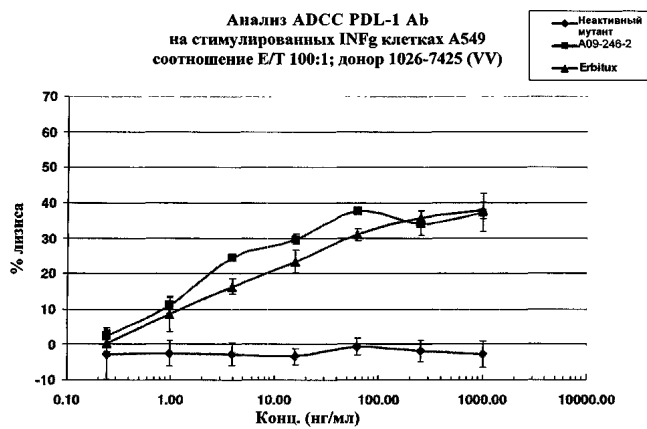
Фиг. 4

Анализ ADCC PDL-1 Ab
на нестимулированных клетках A549
соотношение Е/Т 100:1; донор 1026-7425 (VV)



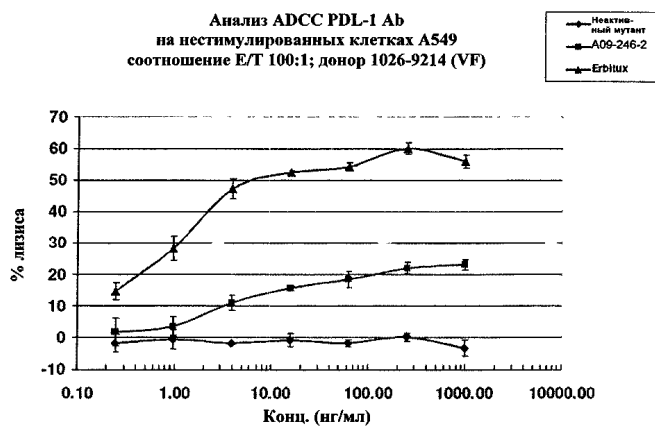
Фиг. 5

Анализ ADCC PDL-1 Ab
на стимулированных INFγ клетках A549
соотношение Е/Т 100:1; донор 1026-7425 (VV)



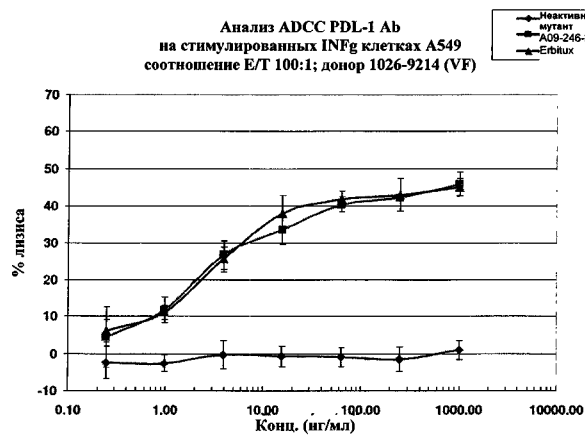
Фиг. 6

Анализ ADCC PDL-1 Ab
на нестимулированных клетках A549
соотношение Е/Т 100:1; донор 1026-9214 (VF)



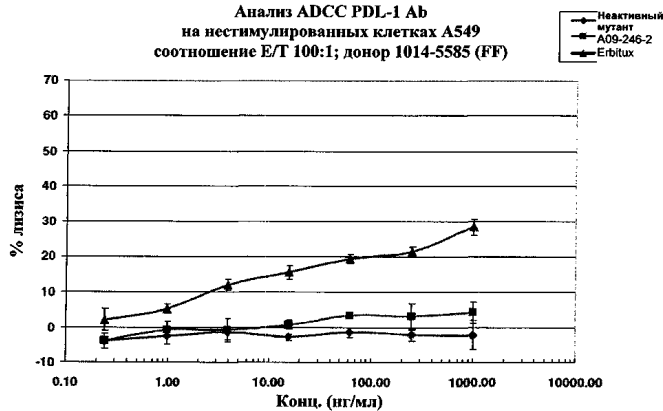
Фиг. 7

Анализ ADCC PDL-1 Ab
на стимулированных INF γ клетках A549
соотношение Е/Т 100:1; донор 1026-9214 (VF)



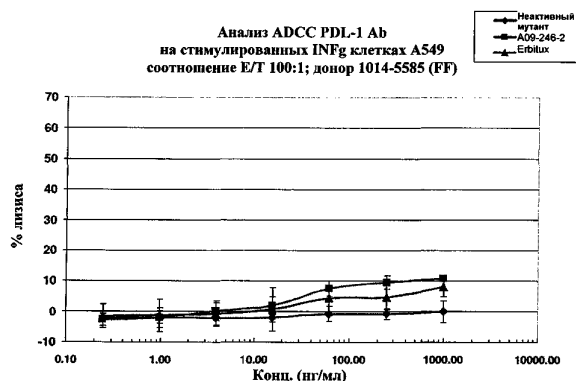
Фиг. 8

Анализ ADCC PDL-1 Ab
на нестимулированных клетках A549
соотношение Е/Т 100:1; донор 1014-5585 (FF)



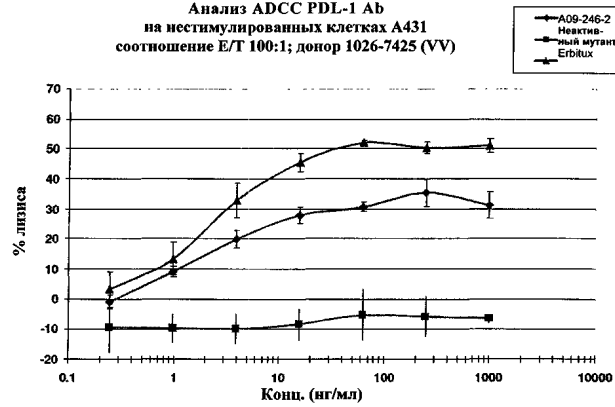
Фиг. 9

Анализ ADCC PDL-1 Ab
на стимулированных INF γ клетках A549
соотношение Е/Т 100:1; донор 1014-5585 (FF)



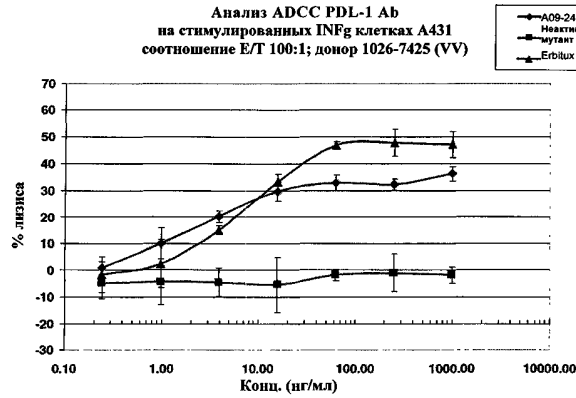
Фиг. 10

Анализ ADCC PDL-1 Ab
на нестимулированных клетках A431
соотношение Е/Т 100:1; донор 1026-7425 (VV)



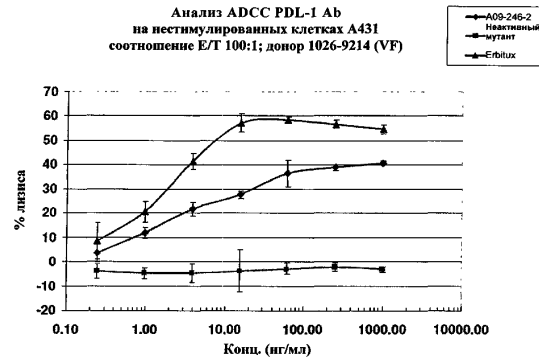
Фиг. 11

Анализ ADCC PDL-1 Ab
на стимулированных INFγ клетках A431
соотношение Е/Т 100:1; донор 1026-7425 (VV)



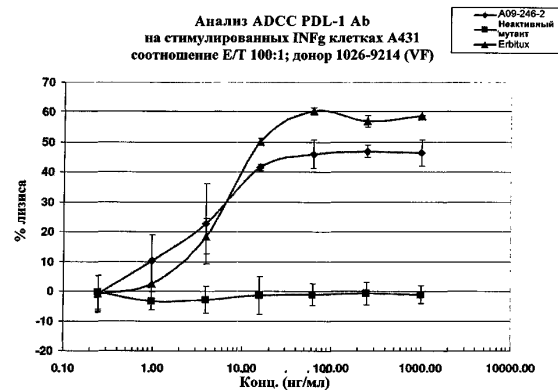
Фиг. 12

Анализ ADCC PDL-1 Ab
на нестимулированных клетках A431
соотношение Е/Т 100:1; донор 1026-9214 (VF)

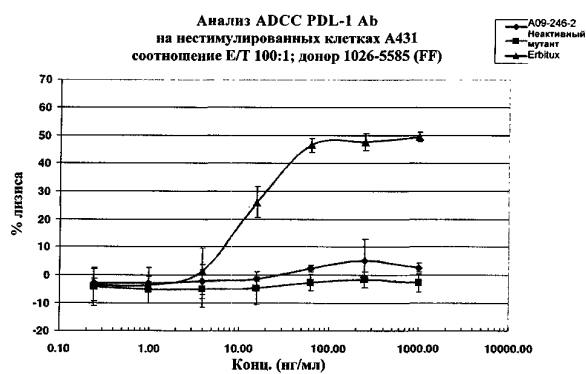


Фиг. 13

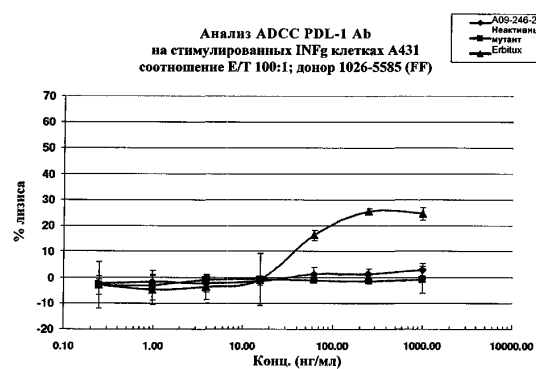
Анализ ADCC PDL-1 Ab
на стимулированных INFγ клетках A431
соотношение Е/Т 100:1; донор 1026-9214 (VF)



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2