

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992136** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.02.18

(51) Int. Cl. *C07K 16/10* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.03.09

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-L1**

(31) **РА 2017 00164; РА 2017 00408**

(32) **2017.03.09; 2017.07.11**

(33) **DK**

(86) **PCT/EP2018/055977**

(87) **WO 2018/162749 2018.09.13**

(71) Заявитель:
ГЕНМАБ А/С (DK)

(72) Изобретатель:

**Алтинтас Изил, Сатейн Давид, Ван
Ден Бринк Эдвард, Верзейл Деннис,
Радемакер Рик, Паррен Пауль, Де
Гуэй Барт (NL)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение касается новых антител и их применения в медицине. В частности, изобретение касается биспецифичных антител, способных связываться с PD-L1 человека и способных связываться с CD3 человека. Также представлены новые классы антител, способных связываться с PD-L1 человека. Изобретение также касается применения антител по изобретению и способов, конструкций из нуклеиновых кислот и клеток-хозяев для получения антител по изобретению.

201992136
A1

201992136

A1

АНТИТЕЛА ПРОТИВ PD-L1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается новых антител и их применения в медицине. В частности, изобретение касается биспецифичных антител, способных связываться с PD-L1 человека и способных связываться с CD3 человека. Также представлены новые классы антител, способных связываться с PD-L1 человека. Изобретение также касается применения антител по изобретению, а также способов, конструкций из нуклеиновых кислот и клеток-хозяев для получения антител по изобретению.

Уровень техники

Лиганд-1 запрограммированной смерти (PD-L1, PDL1, CD274, B7H1, B7-H1) представляет собой однопролетный мембранный белок I типа в 33 кДа. Были описаны три изоформы PD-L1 на основе альтернативного сплайсинга. PD-L1 принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов (Ig) и содержит один Ig-подобный домен типа C2 и один Ig-подобный домен типа V. Свежевыделенные Т- и В-клетки экспрессируют незначительное количество PD-L1, а фракция (около 16%) моноцитов CD14⁺ конститутивно экспрессирует PD-L1 (Rietz and Chen, 2004, Am J Transplant. 4: 8-14). Известно, что гамма-интерферон (IFN- γ) повышает уровень PD-L1 в опухолевых клетках (Abiko et al., 2015, Br J Cancer 112: 1501-1509; Dong et al., 2002, Nature Medicine 8(8): 793-800).

PD-L1 подавляет противоопухолевый иммунитет за счет: 1) придания толерантности реагирующих на опухоли Т-клеткам путем связывания со своим рецептором PD-1 (CD279) на активированных Т-клетках (Dong et al., supra; Latchman et al., 2004, Proc Natl Acad. Sci. USA 101, 10691-6); 2) придания опухолевым клеткам устойчивости к Т-клеткам CD8⁺ и опосредованному лигандом Fas лизису по сигнализации PD-1 через экспрессируемый опухолевыми клетками PD-L1 (Azuma et al., 2008, Blood 111, 3635-43); 3) придания Т-клеткам толерантности по обратной связи через экспрессируемый Т-клетками CD80 (B7.1) (Butte et al., 2007, Immunity 27, 111-22; Park et al., 2010, Blood 116, 1291-8); и 4) способствуя развитию и поддержанию индуцируемых Т-регуляторных клеток (Francisco et al., 2009, J Exp. Med. 206, 3015-29). PD-L1 экспрессируется при многих раковых заболеваниях человека, включая меланому, рак яичников, рак легких и толстой кишки (Dong et al., supra).

Антитела, блокирующие PD-L1, продемонстрировали клиническую активность при некоторых раковых заболеваниях, при которых гиперэкспрессируется PD-L1 (включая

меланому, NSCLC). Например, атезолизумаб представляет собой гуманизованное моноклональное антитело IgG1 против PD-L1. В настоящее время он проходит клинические испытания в качестве иммунотерапии по нескольким показаниям, включая различные типы солидных опухолей (напр., см. Rittmeyer et al., 2017, Lancet 389: 255-265). Антитело к PD-L1 авелумаб (Kaufman et al., Lancet Oncol. 2016, 17(10): 1374-1385) было одобрено FDA для лечения больных взрослых и детей в возрасте 12 лет и старше с метастатической карциномой Меркеля и в настоящее время проходит клинические испытания по нескольким раковым показаниям, включая рак мочевого пузыря, рак желудка, рак головы и шеи, мезотелиому, NSCLC, рак яичников и рак почек. Антитело к PD-L1 дурвалумаб одобрено для местного позднего или метастатического уротелиального рака и проходит клиническую разработку при многих солидных опухолях и гематологическом раке (напр., см. Massard et al., 2016, J Clin Oncol. 34(26): 3119 -25). Другие антитела против PD-L1 были описаны в WO 2004/004771, WO 2007/005874, WO 2010/036959, WO 2010/077634, WO 2013/079174, WO 2013/164694, WO 2013/173223 и WO 2014/022758.

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в ликвидации рака, все еще существует потребность в дальнейшем улучшении терапии рака на основе антител.

Сущность изобретения

В первом аспекте изобретения предусмотрены новые антитела против PD-L1, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека. Антитела по этому второму аспекту изобретения могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными, а если они мультиспецифичные, то данные мультиспецифичные антитела могут содержать или не содержать антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека.

Изобретением также предусмотрены биспецифичные антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека. Такие биспецифичные антитела обладают двойным действием.

Во-первых, через свой участок связывания PD-L1 антитело связывает экспрессирующие PD-L1 опухолевые клетки, а через свой участок связывания CD3 антитело связывает Т-клетки. Таким образом, антитело приводит Т-клетки в непосредственную близость к опухолевым клеткам, тем самым способствуя уничтожению опухолевых клеток Т-клетками. Кроме того, не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, предполагается, что приведение экспрессирующих PD-L1 клеток и эффекторных Т-клеток в непосредственную близость друг к другу может инициировать высвобождение

γ -интерферона, который, в свою очередь, может активировать PD-L1 в опухолевых клетках, тем самым способствуя рекрутингу большего количества антител к опухоли и дополнительно усиливая её уничтожение.

Во-вторых, биспецифичные антитела по изобретению ингибируют связывание PD-L1 человека с PD-1 человека, тем самым предотвращая блокирование PD-L1 противоопухолевого иммунитета через PD-1.

Биспецифичные антитела CD3 \times PD-L1 особенно полезны в таких терапевтических условиях, при которых желательно специфическое наведение и опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих PD-L1. Биспецифичные антитела CD3 \times PD-L1 очень эффективны для уничтожения клеток, экспрессирующих PD-L1, в том числе, в некоторых воплощениях, клеток с малым числом копий PD-L1.

Антитела по изобретению способны связываться с такими экспрессирующими PD-L1 клетками, как клетки MDA-MB-231, PC3 или HELA. Кроме того, антитела по изобретению ингибируют взаимодействие между PD-L1 и PD-1 и могут опосредовать уничтожение клеток MDA-MB-231, PC3 и/или HELA очищенными Т-клетками или РВМС.

В другом аспекте изобретения предусмотрено применение антител по изобретению в медицине, в частности, для лечения рака.

Эти и другие аспекты изобретения описаны более подробно ниже.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Связывание биспецифичных антител к PD-L1 CD3 \times PD-L1 и b12 \times PD-L1 и их моноспецифичных, бивалентных аналогов с клетками MDA-MB-231. (A) Связывание bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL \times 338-FEAR и IgG1-338-FEAR, (B) связывание bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL \times 547-FEAR и IgG1-547-FEAR, (C) связывание bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL \times 511-LC33S-FEAR и IgG1-511-LC33S-FEAR, (D) связывание bsIgG1-b12-FEAL \times 338-FEAR, (E) связывание bsIgG1-b12-FEAL \times 547-FEAR, (F) связывание bsIgG1-b12-FEAL \times 511-LC33S-FEAR. Представлены данные по средней интенсивности флуоресценции (MFI) при определении методом проточной цитометрии для одного репрезентативного эксперимента.

Фиг. 2. Связывание биспецифичных антител к PD-L1 CD3 \times PD-L1 и b12 \times PD-L1 и их моноспецифичных, бивалентных аналогов с клетками PC3. (A) Связывание bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL \times 338-FEAR и IgG1-338-FEAR, (B) связывание bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL \times 547-FEAR и IgG1-547-FEAR, (C) связывание bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL \times 511-LC33S-FEAR и IgG1-511-LC33S-FEAR, (D) связывание bsIgG1-b12-FEAL \times 338-FEAR, (E) связывание bsIgG1-b12-FEAL \times 547-FEAR, (F) связывание bsIgG1-b12-FEAL \times 511-LC33S-

FEAR. Представлены данные по средней интенсивности флуоресценции (MFI) при определении методом проточной цитометрии для одного репрезентативного эксперимента.

Фиг. 3. Связывание биспецифичных антител к PD-L1 CD3×PD-L1 и b12×PD-L1 и их моноспецифичных, бивалентных аналогов с клетками HELA. (A) Связывание bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR и IgG1-338-FEAR, (B) связывание bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR и IgG1-547-FEAR, (C) связывание bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR и IgG1-511-LC33S-FEAR, (D) связывание bsIgG1-b12-FEAL×338-FEAR, (E) связывание bsIgG1-b12-FEAL×547-FEAR, (F) связывание bsIgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR. Представлены данные по средней интенсивности флуоресценции (MFI) при определении методом проточной цитометрии для одного репрезентативного эксперимента.

Фиг. 4. Связывание биспецифичных антител к PD-L1 b12×PD-L1 и их моноспецифичных, бивалентных аналогов с клетками SK-MES-1. (A) Связывание bsIgG1-b12-FEAL×338-FEAR и IgG1-338-FEAR, (B) связывание bsIgG1-b12-FEAL×547-FEAR и IgG1-547-FEAR, (C) связывание bsIgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR и IgG1-511-LC33S-FEAR. Представлены данные по средней интенсивности флуоресценции (MFI) при определении методом проточной цитометрии для одного репрезентативного эксперимента.

Фиг. 5. Связывание биспецифичных антител к PD-L1 CD3×PD-L1 и b12×PD-L1 и их моноспецифичных, двухвалентных аналогов с клетками CHO, трансфицированными PD-L1 макаки-крабоеда. (A) Связывание bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR и IgG1-338-FEAR, (B) связывание bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR и IgG1-547-FEAR, (C) связывание bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR и IgG1-511-LC33S-FEAR, (D) связывание bsIgG1-b12-FEAL×338-FEAR, (E) связывание bsIgG1-b12-FEAL×547-FEAR, (F) связывание bsIgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR. Представлены данные по средней интенсивности флуоресценции (MFI) при определении методом проточной цитометрии для одного репрезентативного эксперимента.

Фиг. 6. Перекрестное блокирование антител. Определение перекрестного блокирования антител проводили методом интерферометрии в биослое. Все антитела получали в остове IgG1 FEAR. В таблице сигналы $\geq 0,1$ нм считались не блокирующими парами антител (представлены в виде цифр обычным шрифтом в табл.), сигналы менее 0,1 считались блокирующими парами антител (представлены в виде цифр жирным шрифтом в табл.), а некоторые сигналы не были ни блокирующими, ни неблокирующими, они представлены как антитела, проявляющие вытеснение (указаны звездочкой (*)) в табл.).

MEDI = MEDI4736; MPDL = MPDL3280A. Представлены типичные графики для вытесняющих (А), блокирующих (В) и неблокирующих (С) пар антител.

Фиг. 7. Влияние биспецифичных антител к PD-L1 b12×PD-L1 и их моноспецифичных, бивалентных аналогов на взаимодействие PD-1/PD-L1. Действие (А) bsIgG1-b12-FEAL×338-FEAR и IgG1-338-FEAR, (В) bsIgG1-b12-FEAL×547-FEAR и IgG1-547-FEAR, (С) bsIgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR и IgG1-511-LC33S-FEAR определяли методом биоанализа блокады PD-1/PD-L1. Представлены данные по кратности индукции относительно контроля (без добавления антител) для одного репрезентативного эксперимента.

Фиг. 8. Индукция цитотоксичности *in vitro* биспецифичными антителами CD3×PD-L1 на клетках MDA-MB-231. Клетки MDA-MB-231 инкубировали с bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR и bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR. В качестве эффекторных клеток использовали очищенные Т-клетки (А) или РВМС (В). Представлены данные в виде % жизнеспособных клеток для одного репрезентативного эксперимента.

Фиг. 9. Индукция цитотоксичности *in vitro* биспецифичными антителами CD3×PD-L1 на клетках РС-3. Клетки РС-3 инкубировали с bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR и bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR. В качестве эффекторных клеток использовали очищенные Т-клетки (А) или РВМС (В). Представлены данные в виде % жизнеспособных клеток для одного репрезентативного эксперимента.

Фиг. 10. Индукция цитотоксичности *in vitro* биспецифичными антителами CD3×PD-L1 на клетках HELA. Клетки HELA инкубировали с bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR и bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR. В качестве эффекторных клеток использовали очищенные Т-клетки (А) или РВМС (В). Представлены данные в виде % жизнеспособных клеток для одного репрезентативного эксперимента.

Фиг. 11. Пролиферация и активация Т-клеток биспецифичными антителами CD3×PD-L1. Биспецифичные антитела CD3×PD-L1 тестировали при анализе *in vitro* для измерения активации и пролиферации Т-клеток, используя клетки MDA-MB-231 в качестве клеток-мишеней и очищенные Т-клетки в качестве эффекторных клеток. (А) Общее число Т-клеток, (В) число Т-клеток CD69^{pos}, (С) число Т-клеток CD25^{pos}.

Фиг. 12. Изменения в связывании антител к PD-L1 с вариантами PD-L1 с аланиновыми мутациями в положениях с 42 по 131. Кратность изменений определяли как $\log_{10}(\text{нормализованное } gMFI_{[Ala-мутант]}/\text{нормализованное } gMFI_{[wt]})$. Остатки, по которым

изменения в связывании были меньше, чем среднее изменение – $1,5 \times SD$ (указаны пунктирной линией), считались “мутациями с потерей связывания”. Остатки с положительными значениями изменений в связывании – это остатки с потерей связывания у контрольного антитела IgG1-625-FEAR-A488 (остатки 75 и 86). Цифрами над осью x обозначены положения аминокислот.

Фиг. 13. Антителозависимая клеточная цитотоксичность у клеток MDA-MB-231 под действием антител к PD-L1 при определении методом высвобождения ^{51}Cr . Определяли ADCC клеток MDA-MB-231 методом высвобождения ^{51}Cr *in vitro* со свежeweыделенными PBMCs от здорового донора-человека при соотношении E:T = 100: 1. Для каждой точки данных представлено среднее значение и стандартное отклонение из 3 повторов. Представлен типичный пример с PBMCs от одного донора.

Фиг. 14. Антителозависимая клеточная цитотоксичность у клеток MDA-MB-231 под действием антител к PD-L1 при определении люминесцентным методом биоанализа репортера ADCC. Определяли ADCC у клеток MDA-MB-231 под действием антител к PD-L1, используя экспрессирующие FcγRIIIa репортерные клетки Jurkat, которые экспрессируют люциферазу при связывании FcγRIIIa. Продукция люциферазы представлена в виде относительных единиц люминесценции (RLU). Для каждой точки данных представлено среднее значение и стандартное отклонение из 2 повторов.

Раскрытие сущности изобретения

Определения

Термин “иммуноглобулин” относится к классу структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей: одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, причем все четыре связаны между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо изучена, к примеру, см. *Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul W., 2nd ed., Raven Press, N.Y. (1989))*. Вкратце, каждая тяжелая цепь обычно состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно V_H) и константной области тяжелой цепи (сокращенно C_H). Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Шарнирный участок находится между доменами C_{H1} и C_{H2} тяжелой цепи и является очень гибким. Дисульфидные связи в шарнирном участке являются частью взаимодействий между двумя тяжелыми цепями в молекуле IgG. Каждая легкая цепь обычно состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно V_L) и константной области легкой цепи (сокращенно C_L). Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена, C_L . Области V_H и V_L можно еще подразделить на участки гипервариабельности (или гипервариабельные участки, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или

образовывать структурно определенные петли), которые также именуется определяющими комплементарность участками (CDR) и перемежаются с более консервативными участками, а именно каркасными участками (FR). Каждый V_H и V_L обычно состоит из трех CDR и четырех FR, располагающихся от N-конца до C-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (также см. Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). Если не указано иначе или не противоречит контексту, последовательности CDR идентифицируются здесь в соответствии с правилами IMGT с помощью DomainGapAlign Version 4.9.2 (2016-09-26) (Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999, 27:209-212; и Ehrenmann F., Kaas Q. and Lefranc M.-P., Nucleic Acids Res., 38, D301-307 (2010); также см. интернет-адрес <http://www.imgt.org/>). Если не указано иначе или не противоречит контексту, указания положений аминокислот в константных областях по настоящему изобретению соответствуют нумерации EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci USA 1969 May, 63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. 1991 NIH Publication No. 91-3242). Например, в SEQ ID NO: 93 приведены положения аминокислот 118-447 по нумерации EU в константной области тяжелой цепи IgG1m(f).

Термин “аминокислота, соответствующая положению...” в настоящем изобретении относится к номеру положения аминокислоты в тяжелой цепи IgG1 человека. Соответствующие положения аминокислот в других иммуноглобулинах можно найти путем выравнивания с IgG1 человека. Так, аминокислота или сегмент в одной последовательности, которая “соответствует” аминокислоте или сегменту в другой последовательности, выравнивается с другой аминокислотой или сегментом с помощью стандартной программы выравнивания последовательностей типа ALIGN, ClustalW или аналогичной, обычно при настройках по умолчанию, и по меньшей мере на 50%, на 80%, на 90% или на 95% идентична тяжелой цепи IgG1 человека. В данной области хорошо известно, как выравниваются последовательности или сегменты последовательности и тем самым определяются положения в последовательности, соответствующие положениям аминокислот по настоящему изобретению.

Термин “антитело” (Ab) в контексте настоящего изобретения относится к молекулам иммуноглобулина, фрагментам молекул иммуноглобулина или производным тех и других, которые обладают способностью к специфическому связыванию с антигеном в типичных физиологических условиях со значительным по времени периодом полужизни типа по меньшей мере 30 мин, по меньшей мере 45 мин, по меньшей мере один час, по меньшей мере два часа, по меньшей мере четыре часа, по меньшей мере 8 часов, по меньшей мере 12 часов, около 24 часов или больше, около 48 часов или больше,

около 3, 4, 5, 6, 7 или больше дней и т.д., или любым другим соответствующим функционально определенным периодом (типа времени, достаточного для индуцирования, стимулирования, усиления и/или модулирования физиологической реакции, связанной со связыванием антитела с антигеном, и/или времени, достаточного для того, чтобы антитело вызвало эффекторную активность). Варибельные области тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина содержат домен связывания, взаимодействующий с антигеном. Термин “антигенсвязывающий участок” в настоящем изобретении относится к участку, который взаимодействует с антигеном и включает участки V_H и V_L . Термин антитело в настоящем изобретении охватывает не только моноспецифичные антитела, но также и мультиспецифичные антитела, которые содержат несколько, как-то два или больше, напр., три или больше различных антигенсвязывающих участков. Константные области антител (Abs) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (типа эффекторных клеток) и компоненты системы комплемента типа C1q, первого компонента в классическом пути активации комплемента. Как указано выше, термин антитело, если не указано иначе или явно не противоречит контексту, включает фрагменты антител, которые являются антигенсвязывающими фрагментами, то есть сохраняют способность к специфическому связыванию с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антител может выполняться фрагментами полноразмерных антител. Примеры антигенсвязывающих фрагментов, охватываемых термином “антитело”, включают (i) Fab'- или Fab-фрагмент – моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} , либо моновалентное антитело типа описанных в WO 2007/059782 (Genmab); (ii) F(ab')₂-фрагменты – бивалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий в основном из доменов V_H и C_{H1} ; (iv) Fv-фрагмент, состоящий в основном из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), который в основном состоит из домена V_H и также называется доменным антителом (Holt et al., Trends Biotechnol. 2003 Nov, 21(11): 484-90); (vi) верблюжьих или нанотел (Revets et al., Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan, 5(1): 111-24) и (vii) выделенные участки, определяющие комплементарность (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, их можно соединить рекомбинантными методами с помощью синтетического линкера, который позволяет им вырабатываться в виде единой белковой цепи, в которой области V_L и V_H попарно образуют моновалентные молекулы (известные как одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), к примеру, см. Bird et al., Science 242, 423-426 (1988); и Huston

et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела охватываются термином антитело, если не указано иначе или не следует явно из контекста. Хотя такие фрагменты обычно входят в значение антитела, однако они в совокупности и каждый независимо представляют собой уникальные признаки настоящего изобретения, проявляющие различные биологические свойства и применимости. Эти и другие полезные фрагменты антител в контексте настоящего изобретения, а также биспецифичные форматы таких фрагментов еще обсуждаются далее. Также следует иметь в виду, что термин антитело, если не указано иначе, также охватывает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb), антителоподобные полипептиды типа химерных антител и гуманизованных антител, а также фрагменты антител, сохраняющие способность к специфическому связыванию с антигеном (антигенсвязывающие фрагменты), полученные любым известным методом типа ферментативного расщепления, синтеза пептидов и рекомбинантных методов. Полученное антитело может иметь любой изотип. В настоящем изобретении термин “изотип” относится к классу иммуноглобулина (к примеру, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. При упоминании конкретного изотипа, напр., IgG1, термин не ограничивается определенной последовательностью изотипа, напр., конкретной последовательностью IgG1, но означает то, что антитело ближе по последовательности к этому изотипу, напр., IgG1, чем к другим изотипам. Так, напр., антитело типа IgG1 по изобретению может представлять собой вариант последовательности природного антитела IgG1, включающий вариации в константных областях.

Термин “моноклональное антитело” в настоящем изобретении относится к препаратам молекул антител с одинаковым молекулярным составом. Композиция моноклонального антитела проявляет одну специфичность связывания и сродство к конкретному эпитопу. Соответственно, термин “человеческое моноклональное антитело” относится к антителам, проявляющим одну специфичность связывания, у которых переменные и константные области происходят из гаметных последовательностей иммуноглобулина человека. Человеческие моноклональные антитела могут вырабатываться гибридомой, которая включает В-клетки, полученные из трансгенного или трансхромосомного животного типа трансгенной мыши, геном которой содержит трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, слитые с иммортализованными клетками.

Термин “биспецифичное антитело” или “bs” в контексте настоящего изобретения относится к антителам, содержащим два разных антигенсвязывающих участка, заданные различными последовательностями антител. В некоторых воплощениях данные различные

антигенсвязывающие участки связывают различные эпитопы на одном и том же антигене. Однако в предпочтительных воплощениях данные различные антигенсвязывающие участки связывают различные целевые антигены. Биспецифичные антитела могут быть в любом формате, включая любые из описанных ниже форматов биспецифичных антител.

В настоящем изобретении термины “половинка молекулы”, “Fab-плечо” и “плечо” относятся к одной паре тяжелая цепь-легкая цепь.

Если описано, что биспецифичное антитело содержит половинку молекулы антитела, “происходящую из” первого антитела, и половинку молекулы антитела, “происходящую из” второго антитела, то термин “происходящая из” означает, что биспецифичное антитело было получено путем рекомбинации любым известным способом данных половинок молекул от каждого из данных первого и второго антитела в одно биспецифичное антитело. В этом контексте “рекомбинация” не должна ограничиваться каким-то конкретным методом рекомбинации, а включает все способы получения биспецифичных антител, описанные здесь, включая, к примеру, рекомбинацию путем обмена половинок молекул, а также рекомбинацию на уровне нуклеиновой кислоты и/или посредством совместной экспрессии двух половинок молекул в одних и тех же клетках.

Термин “моновалентное антитело” в контексте настоящего изобретения означает, что молекула антитела способна связывать только одну молекулу антигена и поэтому не способна сшивать антигены или клетки.

Термин “полноразмерное” при использовании в контексте антитела означает то, что антитело не является фрагментом, а содержит все домены определенного изотипа, которые обычно встречаются у этого изотипа в природе, напр., домены V_H , C_H1 , C_H2 , C_H3 , шарнирный, V_L и C_L антитела IgG1.

В настоящем изобретении, если это не противоречит контексту, термин “Fc-область” относится к области антитела, состоящей из двух последовательностей Fc тяжелых цепей иммуноглобулина, причем данные последовательности Fc содержат по меньшей мере шарнирный участок, домен C_H2 и домен C_H3 .

В настоящем изобретении термин “гетеродимерное взаимодействие между первым и вторым участками C_H3 ” относится к взаимодействию между первым участком C_H3 и вторым участком C_H3 в гетеродимерном белке типа первый- C_H3 /второй- C_H3 .

В настоящем изобретении термин “гомодимерное взаимодействие первого и второго участков C_H3 ” относится к взаимодействию между первым участком C_H3 и другим первым участком C_H3 в гомодимерном белке типа первый- C_H3 /первый- C_H3 и взаимодействию между вторым участком C_H3 и другим вторым участком C_H3 в

гомодимерном белке типа второй-С_{Н3}/второй-С_{Н3}.

В настоящем изобретении термины “способно связываться” или “связывается” в контексте связывания антитела с заданным антигеном или эпитопом обычно означает связывание со сродством, соответствующим значению K_D в 10^{-6} М или меньше, как-то 10^{-7} М или меньше, как-то 10^{-8} М или меньше, как-то 10^{-9} М или меньше, около 10^{-10} М или меньше либо 10^{-11} М или еще меньше, при определении методом интерферометрии в биослое (BLI), напр., как описано в примере 8, или же, к примеру, при определении по технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIAcore 3000 при использовании антигена в качестве лиганда и антитела в качестве анализируемого вещества. Антитело связывается с заданным антигеном со сродством, соответствующим значению K_D , которое по меньшей мере в десять раз меньше, как-то по меньшей мере в 100 раз меньше, как-то по меньшей мере в 1000 раз меньше, как-то по меньшей мере в 10 000 раз меньше, как-то по меньшей мере в 100 000 раз меньше, чем его сродство при связывании с неспецифическим антигеном (напр., BSA, казеином), а не с заданным антигеном или близкородственным антигеном. В какой степени сродство будет меньше, зависит от K_D антитела, поэтому, если значение K_D антитела очень низкое (то есть антитело является высокоспецифичным), то степень, в которой сродство к антигену будет ниже, чем сродство к неспецифическому антигену, может составлять по меньшей мере 10 000 раз.

Термин “ k_d ” (сек^{-1}) в настоящем изобретении относится к константе скорости диссоциации определенного взаимодействия антитело-антиген. Данная величина также упоминается как значение k_{off} или k_{dis} .

Термин “ K_D ” (М) в настоящем изобретении относится к равновесной константе диссоциации определенного взаимодействия антитело-антиген. Получается путем деления k_d на k_a .

Термин “ k_a ” ($\text{М}^{-1} \times \text{сек}^{-1}$) в настоящем изобретении относится к константе скорости ассоциации определенного взаимодействия антитело-антиген. Данная величина также упоминается как значение k_{on} или скорость ассоциации.

В предпочтительном воплощении антитело по изобретению является выделенным. “Выделенное антитело” в настоящем изобретении означает такое антитело, которое практически не содержит других антител с другой антигенной специфичностью. В предпочтительном воплощении выделенное биспецифичное антитело, которое специфически связывается с PD-L1 и второй мишенью типа CD3, практически не содержит моноспецифичных антител, специфически связывающихся с PD-L1 или со второй мишенью, напр., CD3. В другом предпочтительном воплощении антитело или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, практически не содержит

возникающих естественным путем антител, не способных связываться с PD-L1. В следующем предпочтительном воплощении антитело по изобретению содержит структурное изменение своей аминокислотной последовательности относительно структуры природного антитела против PD-L1, причем данное структурное изменение вызывает изменение функциональности данного антитела относительно функциональности у природного антитела против PD-L1, причем данная функциональность выбрана из группы, состоящей из: (i) средства связывания с PD-L1, (ii) способности ингибировать связывание PD-L1 с PD-1 и (iii) способности индуцировать Fc-опосредованные эффекторные функции.

Термин “PD-L1” в настоящем изобретении относится к лиганду-1 белка запрограммированной смерти. PD-L1 встречается у людей и других видов, поэтому термин “PD-L1” не ограничивается PD-L1 человека, если это не противоречит контексту. Последовательности PD-L1 человека, макаки и мыши можно найти через номер доступа в Genbank NP_054862.1, XP_005581836 и NP_068693, соответственно.

Термин “PD-L2” в настоящем изобретении относится к лиганду-2 белка запрограммированной смерти человека (номер доступа в Genbank NP_079515).

Термин “PD-1” в настоящем изобретении относится к белку-1 запрограммированной смерти человека, также известному как CD279.

Термин “CD3” в настоящем изобретении относится к белку-3 кластера дифференцировки человека, который входит в состав корцепторного Т-клеточного белкового комплекса и состоит из четырех отдельных цепей. CD3 также встречается у других видов, поэтому термин “CD3” не ограничивается человеческим CD3, если это не противоречит контексту. У млекопитающих этот комплекс содержит цепь CD3 γ (гамма) (CD3 γ человека – UniProtKB/Swiss-Prot No. P09693, а CD3 γ макаки-крабоеда – UniProtKB/Swiss-Prot No. Q95LI7), цепь CD3 δ (дельта) (CD3 δ человека – UniProtKB/Swiss-Prot No. P04234, а CD3 δ макаки-крабоеда – UniProtKB/Swiss-Prot No. Q95LI8), две цепи CD3 ϵ (эпсилон) (CD3 ϵ человека – UniProtKB/Swiss-Prot No. P07766 (SEQ ID NO:95); CD3 ϵ макаки-крабоеда – UniProtKB/Swiss-Prot No. Q95LI5; CD3 ϵ макаки-резус – UniProtKB/Swiss-Prot No. G7NCB9), и цепь CD3 ζ -цепь (дзета) (CD3 ζ человека – UniProtKB/Swiss-Prot No. P20963, CD3 ζ макаки-крабоеда – UniProtKB/Swiss-Prot No. Q09TK0). Эти цепи связываются с молекулой, известной как Т-клеточный рецептор (TCR), и генерируют сигнал активации в Т-лимфоцитах. Молекулы TCR и CD3 вместе составляют комплекс TCR.

“Антитело к PD-L1” или “антитело против PD-L1” представляет собой антитело, как описано выше, которое специфически связывается с антигеном PD-L1, в частности,

PD-L1 человека.

“Антитело к CD3” или “антитело против CD3” представляет собой антитело, как описано выше, которое специфически связывается с антигеном CD3, в частности, CD3ε (эпсилон) человека.

“Антитело к CD3×PD-L1”, “антитело против CD3×PD-L1”, “антитело к PD-L1×CD3” или “антитело против PD-L1×CD3” представляет собой биспецифичное антитело, которое содержит два разных антигенсвязывающих участка, один из которых специфически связывается с антигеном PD-L1, а другой специфически связывается с CD3.

Настоящим изобретением также предусмотрены антитела, содержащие функциональные варианты областей V_L , областей V_H либо одного или нескольких CDR антител из примеров. Функциональные варианты V_L , V_H или CDR при использовании в контексте антител все же позволяет антителам сохранять по меньшей мере существенную долю (по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или больше) сродства и/или специфичности/избирательности “эталонного” или “исходного” антитела, а в некоторых случаях такое антитело может быть связываться с большим сродством, избирательностью и/или специфичностью, чем исходное антитело.

Такие функциональные варианты обычно сохраняют значительную идентичность последовательности с родительским антителом. Степень идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных позиций между этими последовательностями (то есть % гомологии = число идентичных позиций/общее число позиций × 100), принимая во внимание количество пробелов и длину каждого пробела, который необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Степень идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями можно определить, напр., по алгоритму E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci.* 4, 11-17 (1988), который встроен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу весов остатков PAM120, штраф за длину пробела 12 и штраф за пробел 4. Кроме того, степень идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить по алгоритму Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970).

Типичные варианты включают варианты, которые отличаются от последовательностей областей V_H и/или V_L и/или CDR исходного антитела в основном консервативными заменами; к примеру, 10, как-то 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замена у варианта являются консервативными заменами аминокислотных остатков.

В контексте настоящего изобретения консервативные замены можно определить как замены в пределах классов аминокислот, приведенных в следующей таблице.

Классы аминокислотных остатков для консервативных замен

Кислые остатки	Asp (D), Glu (E)
Основные остатки	Lys (K), Arg (R), His (H)
Гидрофильные незаряженные остатки	Ser (S), Thr (T), Asn (N), Gln (Q)
Алифатические незаряженные остатки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I)
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M), Pro (P)
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y), Trp (W)

В контексте настоящего изобретения для описания мутаций используются следующие обозначения, если не указано иначе: i) замена аминокислоты в данном положении записывается, напр., как K409R, что означает замену лизина в положении 409 на аргинин; и ii) для определенных вариантов используются специфические трех- или однобуквенные коды, включая коды Хаа и X для обозначения любых аминокислотных остатков. Так, замена лизина на аргинин в положении 409 обозначается как K409R, а замена лизина на любой аминокислотный остаток в положении 409 обозначается как K409X. В случае делеции лизина в положении 409 она обозначается как K409*.

В контексте настоящего изобретения “конкуренция” означает значительное снижение склонности определенной молекулы к связыванию с определенным партнером по связыванию в присутствии другой молекулы, которая связывается с партнером по связыванию. “Конкуренция” может означать как “блокирование”, так и “вытеснение”, то есть конкурирующая молекула может быть либо блокирующей, либо вытесняющей молекулой. “Вытеснение” означает такое состояние, при котором второе антитело может вытеснять антиген из комплекса антиген-антитело (сформировавшегося ранее), что приводит к обмену антигена (Abdiche et al., 2017 Plos One 12(1): e0169535). Конкуренцию за связывание с PD-L1 между двумя или несколькими антителами против PD-L1 можно определить любым подходящим методом. В одном воплощении конкуренция определяется, как описано здесь в Примере 9.

Аналогично, в контексте настоящего изобретения “ингибирование связывания PD-L1 с PD-1” означает любое измеримое значительное снижение связывания PD-L1 с PD-1 в присутствии антитела, способного связываться с PD-L1. Как правило, ингибирование означает снижение по меньшей мере на 10%, как-то по меньшей мере на 15%, напр., по меньшей мере на 20%, как-то по меньшей мере на 40% связывания между PD-L1 и PD-1, вызванное присутствием антитела против PD-L1. Ингибирование связывания PD-L1 с PD-1 можно определить любым подходящим методом. В одном воплощении ингибирование определяется, как описано здесь в Примере 10.

Термин “эпитоп” обозначает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из поверхностных группировок

молекул типа боковых цепей аминокислот или сахаров, и обычно имеют специфические характеристики трехмерной структуры, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первыми, но не с последними теряется в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые не участвуют непосредственно в связывании, типа аминокислотных остатков, которые эффективно блокируются или закрываются специфичными антигенсвязывающими пептидами (иными словами, этот аминокислотный остаток находится в зоне действия специфически связывающегося с антигеном пептида).

Термин “химерное антитело” в настоящем изобретении относится к таким антителам, у которых переменная область происходит из другого вида, чем человек (напр., от грызунов), а константная область происходит из другого вида типа человека. Химерные моноклональные антитела для терапевтического применения разрабатываются для снижения иммуногенности антител. Термины “переменная область” или “переменный домен” в контексте химерных антител относятся к области, которая включает участки CDR и каркасные участки как тяжелых, так и легких цепей иммуноглобулина. Химерные антитела могут быть получены стандартными методами ДНК, как описано в Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15. Химерные антитела могут представлять собой генетически или энзиматически инженерные рекомбинантные антитела. Специалисту в данной области известно, как получают химерные антитела, поэтому получение химерных антител по настоящему изобретению может проводиться и другими способами, чем описанные здесь.

Термин “гуманизованное антитело” в настоящем изобретении относится к генно-инженерным не человеческим антителам, которые содержат константные домены человеческого антитела и переменные домены не от человека, модифицированные так, чтобы у них был высокий уровень гомологии последовательности с переменными доменами человека. Это достигается путем пересадки шести определяющих комплементарность участков (CDR) антитела не от человека, которые вместе образуют антигенсвязывающий сайт, на гомологичную акцепторную каркасную область (FR) человека (см. WO 92/22653 и EP 0629240). Для полного восстановления сродства и специфичности связывания исходного антитела может потребоваться замена каркасных остатков человека на каркасные остатки исходного антитела (т.е. антитела не от человека) (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь

идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных участках, которые важны для свойств связывания антитела. Таким образом, гуманизованное антитело может содержать последовательности CDR не от человека, в основном человеческие каркасные участки, необязательно содержащие одну или несколько обратных аминокислотных мутаций в аминокислотной последовательности не от человека, и полностью человеческие константные области. Необязательно проводятся дополнительные модификации аминокислот, которые необязательно являются обратными мутациями, чтобы получить гуманизованное антитело с предпочтительными характеристиками типа сродства и биохимических свойств.

Термин “человеческое антитело” в настоящем изобретении относится к антителам, у которых переменные и константные области происходят из гаметных последовательностей иммуноглобулина человека. Человеческие антитела могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые гаметными последовательностями иммуноглобулина человека (напр., мутации, введенные при случайном или сайт-специфичном мутагенезе *in vitro* или при соматических мутациях *in vivo*). Однако термин “человеческое антитело” в настоящем изобретении не должен охватывать антитела, у которых на каркасные последовательности человека были пересажены последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих типа мыши. Человеческие моноклональные антитела по изобретению могут быть получены различными методами, включая стандартные методы моноклональных антител, напр., стандартным методом гибридизации соматических клеток Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975). Хотя предпочтительны методики гибридизации соматических клеток, но в принципе могут применяться и другие методы получения моноклональных антител, напр., вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов или методы фагового дисплея с использованием библиотек генов антител человека. Подходящей системой на животных для получения гибридом, секретирующих человеческие моноклональные антитела, является система на мышах. Получение гибридомы у мышей – очень хорошо отработанная процедура. Методики иммунизации и методы выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в данной области. Партнеры для слияния (напр., клетки миеломы мыши) и процедуры слияния также известны. Так, человеческие моноклональные антитела могут быть получены, напр., с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей или крыс, несущих части иммунной системы человека, а не мыши или крысы. Соответственно, в одном воплощении человеческие антитела получают из трансгенных животных типа мышей или крыс, несущих гаметные последовательности иммуноглобулина человека вместо

последовательностей иммуноглобулина животных. В таких воплощениях антитело происходит из гаметных последовательностей иммуноглобулина человека, введенных животному, но конечная последовательность антитела является результатом того, что данные гаметные последовательности иммуноглобулина человека подвергаются дополнительным модификациям посредством соматических гипермутаций и созревания сродства под действием эндогенных механизмов антител у животных, напр., см. Mendez et al., 1997 Nat Genet. 15(2):146-56. Термин “восстановительные условия” или “восстановительная среда” относится к таким условиям или средам, в которых субстрат, в данном случае остаток цистеина в шарнирной области антитела, с большей вероятностью станет восстановленным, чем окисленным.

Термин “рекомбинантная клетка-хозяин” (или просто “клетка-хозяин”) в настоящем изобретении служит для обозначения клеток, в которые был введен экспрессирующий вектор, напр., экспрессирующий вектор, кодирующий антитело по изобретению. Рекомбинантные клетки хозяина включают, к примеру, трансфектомы типа клеток CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6 или NS0 и лимфоцитарные клетки.

Термин “лечение” относится к введению эффективного количества терапевтически активного антитела по настоящему изобретению с целью смягчения, ослабления, прекращения или устранения (излечения) симптомов или заболеваний.

Термин “эффективное количество” или “терапевтически эффективное количество” означает такое количество, которое при дозировках и в течение необходимого времени эффективно дает требуемый терапевтический результат. Терапевтически эффективное количество антитела может варьироваться в зависимости от таких факторов, как заболевание, возраст, пол и вес индивида и способность антитела вызывать требуемый ответ у индивида. Терапевтически эффективное количество также означает такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела или части антитела перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

Термин “антиидиотипическое антитело” относится к таким антителам, которые распознают уникальные детерминанты, обычно связанные с антигенсвязывающим сайтом антител.

Другие аспекты и воплощения изобретения

Как описано выше, в первом аспекте изобретения предусмотрены биспецифичные антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека, причем антитело ингибирует связывание PD-L1 человека с PD-1 человека.

Таким образом, такие биспецифичные антитела содержат два разных антигенсвязывающих участка, один из которых обладает специфичностью связывания для PD-L1, а другой – специфичностью связывания для CD3.

В одном воплощении антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем последовательность CDR3 V_H выбрана из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 21.

В другом воплощении антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6, последовательность KAS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7, соответственно, или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 9, 10 и 11, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:16, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:17, соответственно, или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 19, 20 и 21, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:23, последовательность DDN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:24, соответственно.

В другом воплощении антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:18.

В другом воплощении антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , выбранной из группы, состоящей из

последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:22.

В следующем воплощении антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:5, или

(ii) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:15, или

(iii) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:22.

Так, например, антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

последовательность V_H , которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:5, или

последовательность V_H , которая по меньшей мере на 97% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 97% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:5, или

последовательность V_H , которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:5, или

последовательность V_H , которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:15, или

последовательность V_H , которая по меньшей мере на 97% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 97% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:15, или

последовательность V_H , которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:15, или

последовательность V_H , которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:22, или

последовательность V_H , которая по меньшей мере на 97% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 97% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:22, или

последовательность V_H , которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:22.

В следующем воплощении каждая из последовательностей V_H и V_L содержит три последовательности CDR: CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности: FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно, причем соответствующие совокупные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 из V_H по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичны по аминокислотной последовательности соответствующим совокупным каркасным последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 из данных последовательностей V_H , а последовательности CDR V_H не мутированы, при этом соответствующие совокупные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 из V_L по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичны по аминокислотной последовательности соответствующим совокупным каркасным

последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 из данных последовательностей V_L , а последовательности CDR V_L не мутированы. В контексте этого воплощения степень идентичности означает процент идентичности, полученный при сложении вместе всех каркасных последовательностей в виде одной последовательной последовательности без промежуточных последовательностей CDR.

В предпочтительном воплощении антител по изобретению антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

- (i) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5, или
- (ii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15, или
- (iii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22.

Различные антитела, способные связываться с одним и тем же антигеном типа PD-L1, могут связывать различные участки данного антигена. В некоторых случаях связывание одного антитела к PD-L1 с PD-L1 все же может позволять связывание другого антитела к PD-L1 с PD-L1. Однако в других случаях связывание одного антитела к PD-L1 с PD-L1 может конкурировать (блокировать или вытеснять) связывание другого антитела к PD-L1 с PD-L1. Таким образом, эксперименты по конкурированию дают информацию о том, где на целевом антигене связывается антитело, что может повлиять на функциональные эффекты связывания антитела.

В одном воплощении биспецифичные антитела по изобретению:

- (i) конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15, но не конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 22, или
- (ii) конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22, но не конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15.

В следующем воплощении данные антитела конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5.

Антитела, которые конкурируют за связывание целевого антигена, могут связываться с разными эпитопами на антигене, причем эпитопы настолько близки друг к другу, что связывание первого антитела с одним эпитопом предотвращает связывание второго антитела с другим эпитопом. Однако в других ситуациях два разных антитела могут связываться с одним и тем же эпитопом на антигене.

Так, в одном воплощении антитела по изобретению:

(i) способны связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитела, содержащие последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5, или

(ii) способны связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитела, содержащие последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15, или

(iii) способны связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитела, содержащие последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22.

В другом воплощении связывание биспецифичных антител с PD-L1 человека не вытесняется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO: 53, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:57.

В следующем воплощении связывание биспецифичных антител с PD-L1 человека блокируется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO: 18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 22. При этом “блокирование” означает, что антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO: 18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 22, конкурирует с биспецифичным антителом, но не вытесняет его.

Как описано выше, вышеупомянутые биспецифичные антитела по первому аспекту изобретения содержат антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека.

В одном воплощении антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области (V_H) тяжелой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 28, соответственно, и варибельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно.

Шесть последовательностей CDR, как определено выше, происходят из мышинового антитела, обозначенного SP34. Были получены гуманизованные версии этого антитела, и

эти гуманизованные антитела обозначены здесь как huCD3 и более подробно раскрыты в WO 2015/001085 (Genmab).

В предпочтительном воплощении биспецифичных антител по изобретению данные биспецифичные антитела содержат:

(i) антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включающий переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6, последовательность KAS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7, соответственно, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3 ϵ человека, включающий переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 28, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(ii) антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включающий переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 9, 10 и 11, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:16, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:17, соответственно, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3 ϵ человека, включающий переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 28, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(iii) антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включающий переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 19, 20 и 21, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:23, последовательность DDN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:24, соответственно, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3 ϵ человека, включающий

вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 28, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно.

В одном воплощении биспецифичные антитела содержат антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, который включает вариабельную область тяжелой цепи (V_H), причем данная последовательность V_H по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:25.

В одном воплощении биспецифичные антитела содержат антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, который включает вариабельную область легкой цепи (V_L), причем данная последовательность V_L по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:29.

В предпочтительном воплощении антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, включает последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:25, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29.

В одном аспекте биспецифичные антитела по изобретению могут быть модифицированы для уменьшения сродства антител. Это может быть выгодно в некоторых условиях и приводить к повышению эффективности. В частности, низкое сродство связывания с CD3ε человека может повлиять на подвижность Т-клеток в кровотоке и на месте опухоли, что ведет к лучшему взаимодействию Т-клеток с опухолевыми клетками, см. Mølhøj et al., *Molecular Immunology* 44 (2007).

Соответственно, в другом воплощении биспецифичных антител по изобретению, содержащих антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, данные биспецифичные антитела:

(i) имеют более низкое сродство связывания с CD3ε человека по сравнению с антителом, содержащим антигенсвязывающий участок, включающий последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO: 25, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 29, причем предпочтительно данное сродство по меньшей мере в 2 раза ниже, напр., по меньшей мере в 5 раз ниже, как-то по меньшей мере в 10 раз ниже, напр., по меньшей мере в 25 раз ниже, напр., по меньшей мере в 50 раз ниже, и

(ii) способны опосредовать зависимую от концентрации цитотоксичность для

клеток MDA-MB-231, клеток PC-3 и/или клеток HELA при использовании PBMC или очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток.

Аналогично, в одном воплощении антитела по изобретению содержат антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, причем данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека:

(i) имеет более низкое сродство связывания с CD3ε человека по сравнению с антителом, содержащим антигенсвязывающий участок, включающий последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO: 25, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 29, причем предпочтительно данное сродство по меньшей мере в 2 раза ниже, напр., по меньшей мере в 5 раз ниже, как-то по меньшей мере в 10 раз ниже, напр., по меньшей мере в 25 раз ниже, напр., по меньшей мере в 50 раз ниже, и

(ii) способен опосредовать зависимость от концентрации цитотоксичность для клеток MDA-MB-231, клеток PC-3 и/или клеток HELA при использовании PBMC или очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток.

Сродство к CD3ε человека может быть измерено, напр., октетным методом определения сродства связывания, как описано в Примере 7 из WO 2017/009442.

Способность антител опосредовать цитотоксичность у PBMCs или очищенных Т-клеток можно определить, напр., как описано в здесь Примере 11, то есть высеивают клетки MDA-MB-231, PC-3 или клетки HELA и культивируют в лунках. Добавляют опухолевые клетки, PBMCs и серийные разведения антител, а после инкубации проводят окрашивание опухолевых клеток на жизнеспособность.

При этом huCD3-H1L1 означает антитело против CD3 с последовательностями V_H и V_L , приведенными в SEQ ID NO: 25 и 29. IgG1-huCD3-FEAL означает его вариант, содержащий замены L234F, L235E, D265A и F405L (также см. здесь в другом месте).

Примеры вариантов IgG1-huCD3-FEAL с пониженным сродством к CD3ε человека были описаны в WO 2017/009442 (Genmab). В примере 7 (табл. 6) из WO 2017/009442 приведено сродство IgG1-huCD3-FEAL и семи его вариантов при измерении октетным методом определения сродства связывания:

Антитело	K_D (нМ)	SDEV	SEM	CV
IgG1-huCD3-FEAL	15	6	3	37
IgG1-huCD3-Y114V-FEAL	29	8	4	26
IgG1-huCD3-T31P-FEAL	42	9	4	21
IgG1-huCD3-Y114M-FEAL	42	14	8	33
IgG1-huCD3-Y114R-FEAL	46	10	6	22
IgG1-huCD3-S110A-FEAL	72	15	6	21
IgG1-huCD3-T31M-FEAL	99	23	13	23
IgG1-huCD3-H101G-FEAL	683	169	97	25

В одном воплощении биспецифичных антител по изобретению антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, включает:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 99, 27 и 28, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 100, 27 и 28, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 101, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(iv) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 102, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(v) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 103, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(vi) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 104, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(vii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 105, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие

последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно.

В другом воплощении антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, включает:

(i) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:39, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(ii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:40, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(iii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:41, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(iv) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:42, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(v) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:43, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(vi) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:44, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(vii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:45, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29.

В других предпочтительных воплощениях биспецифичных антител по изобретению каждый из антигенсвязывающих участков включает вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и вариабельную область легкой цепи (V_L), причем каждая из данных вариабельных областей содержит три последовательности CDR: CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности: FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно.

В других предпочтительных воплощениях биспецифичных антител по изобретению антитело содержит две константные области тяжелой цепи (C_H) и две константные области легкой цепи (C_L).

В одном предпочтительном воплощении биспецифичное антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, причем каждая из данных первой и второй тяжелых цепей включает по меньшей мере шарнирный участок и участки C_{H2} и C_{H3} , причем у первой тяжелой цепи была заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 (по нумерации EU), и у второй тяжелой цепи была заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 (по

нумерации EU), при этом у данных первой и второй тяжелой цепи замены были не в одинаковых положениях.

Наиболее предпочтительно (i) аминокислота в положении, соответствующем F405 (по нумерации EU), представлена L в данной первой тяжелой цепи, а аминокислота в положении, соответствующем K409 (по нумерации EU), представлена R в данной второй тяжелой цепи, или же (ii) аминокислота в положении, соответствующем K409 (по нумерации EU), представлена R в данной первой тяжелой цепи, а аминокислота в положении, соответствующем F405 (по нумерации EU), представлена L в данной второй тяжелой цепи.

В следующем особенно предпочтительном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело CD3×PD-L1, содержащее первую и вторую тяжелую цепь, причем положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, и в первой тяжелой цепи, и во второй тяжелой цепи представлены F и E, соответственно, при этом (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU в первой тяжелой цепи, представлено L, а положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU во второй тяжелой цепи, представлено R, или же (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU в первой тяжелой цепи, представлено R, а положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU во второй тяжелой цепи, представлено L.

В следующем особенно предпочтительном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело CD3×PD-L1, содержащее первую и вторую тяжелую цепь, причем положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, и в первой тяжелой цепи, и во второй тяжелой цепи представлены F, E и A, соответственно, при этом (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU в первой тяжелой цепи, представлено L, а положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU во второй тяжелой цепи, представлено R, или же (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU в первой тяжелой цепи, представлено R, а положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU во второй тяжелой цепи, представлено L.

Новые классы антител к PD-L1

В следующем аспекте изобретения предусмотрены новые антитела против PD-L1, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека. Антитела по этому аспекту изобретения могут быть моноспецифичными или

мультиспецифичными, а если они мультиспецифичные, то данные мультиспецифичные антитела могут содержать или не содержать антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека.

В одном воплощении изобретения предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, имеет признаки, определенные здесь выше.

В одном воплощении изобретения предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем связывание антител с мутантным PD-L1, в котором один или несколько аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям 113 (R113), 123 (Y123) и 125 (R125) в SEQ ID NO: 94, заменены на аланин, снижается по сравнению со связыванием с PD-L1 дикого типа, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94; при этом снижение связывания определяется как кратность изменения в связывании данного антитела, которая меньше средней кратности изменений в связывании по всем аланиновым мутантам – $1,5 \times SD$, где SD означает стандартное отклонение по всем рассчитанным изменениям для связывания антитела с мутантным PD-L1, а кратность изменений в связывании рассчитывается, как описано в Примере 13.

Данные антитела могут связываться с эпитопом на PD-L1 (SEQ ID NO: 94), причем данный эпитоп содержит аминокислотный остаток в положении 113 (R113), аминокислотный остаток в положении 123 (Y123) и/или аминокислотный остаток в положении 125 (R125) SEQ ID NO: 94.

В одном воплощении изобретения предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем связывание антител с мутантным PD-L1, в котором один или несколько аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям 19 (F19), 42 (F42), 45 (E45), 46 (K46), 94 (L94) и 116 (I116) в SEQ ID NO: 94, заменены на аланин, снижается по сравнению со связыванием с PD-L1 дикого типа, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94; при этом снижение связывания определяется как кратность изменения в связывании данного антитела, которая меньше средней кратности изменений в связывании по всем аланиновым мутантам – $1,5 \times SD$, где SD означает стандартное отклонение по всем рассчитанным изменениям для связывания антитела с мутантным PD-L1, а кратность изменений в связывании рассчитывается, как описано в Примере 13.

Эти антитела могут связываться с эпитопом на PD-L1 (SEQ ID NO: 94), причем

данный эпитоп содержит один или несколько аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из аминокислотного остатка в положении 45 (E45), аминокислотного остатка в положении 46 (K46) и/или аминокислотного остатка в положении 94 (L94) SEQ ID NO: 94.

В одном воплощении изобретения предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем связывание антител с мутантным PD-L1, в котором один или несколько аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям 58 (E58) и 113 (R113) в SEQ ID NO: 94, заменены на аланин, снижается по сравнению со связыванием с PD-L1 дикого типа, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94; при этом снижение связывания определяется как кратность изменения в связывании данного антитела, которая меньше средней кратности изменений в связывании по всем аланиновым мутантам $- 1,5 \times SD$, где SD означает стандартное отклонение по всем рассчитанным изменениям для связывания антитела с мутантным PD-L1, а кратность изменений в связывании рассчитывается, как описано в Примере 13.

Эти антитела могут связываться с эпитопом на PD-L1 (SEQ ID NO: 94), причем данный эпитоп содержит аминокислотный остаток в положении 58 (E58) и/или аминокислотный остаток в положении 113 (R113) SEQ ID NO: 94.

В следующих воплощениях антитела по изобретению способны вызывать дозозависимый лизис эпителиальных клеток аденокарциномы типа MDA-MB-231 посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

В других воплощениях антитела по изобретению способны уменьшать количество клеток в культуре данных эпителиальных клеток по меньшей мере на 5%, как-то по меньшей мере на 6%, 7%, 8%, 9% или по меньшей мере на 10% в результате лизиса клеток.

ADCC можно определять *in vitro* по высвобождению ^{51}Cr типа методики, приведенной в примере 14. В частности, ADCC определяют *in vitro* путем инкубации указанных эпителиальных клеток с композицией, содержащей антитело и эффекторные клетки типа мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), в течение 4 часов при 37°C, 5% CO₂, при этом содержание антител в композиции находится в пределах 0,1-1 мкг/мл, а соотношение эффекторных клеток к эпителиальным клеткам составляет 100:1.

Лизис эпителиальных клеток можно определять *in vitro* методом анализа репортера – люциферазы в качестве показателя ADCC типа люминесцентного биоанализа репортера ADCC, изложенного в примере 14.

В частности, ADCC можно определять *in vitro* путем:

(i) контактирования культуры указанных эпителиальных клеток с композицией, содержащей антитело и Т-клетки Jurkat человека, стабильно экспрессирующие FcγRIIIa (CD16) и люциферазу светлячка (эффекторные клетки), при соотношении эффекторные клетки:эпителиальные клетки 1:1,

(ii) доведения культуры эпителиальных клеток и эффекторных клеток до комнатной температуры в течение 15 минут,

(iii) инкубирования культуры эпителиальных клеток и эффекторных клеток с субстратом люциферазы,

(iv) определения продукции люциферазы в данной культуре клеток;

при этом содержание антител в композиции находится в пределах 0,5-250 нг/мл, а соотношение эффекторных клеток к эпителиальным клеткам составляет 1:1.

ADCC данных эпителиальных клеток можно определить методом репортерного анализа люциферазы типа репортерного анализа по п. 23 или 24, при этом ADCC, которая наблюдается после инкубации культуры эпителиальных клеток с исследуемой композицией, содержащей данное антитело, по меньшей мере в 1,5 раза больше той ADCC, которая наблюдается после инкубации культуры эпителиальных клеток с композицией, содержащей контрольное антитело; ADCC определяется в относительных единицах люминесценции (RLU), причем концентрация антител в исследуемой композиции и в композиции, содержащей контрольное антитело, одинакова и находится в пределах от 20 до 250 нг/мл, а контрольное антитело выбирают из:

a) антитела, содержащего последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO: 74, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 78; и

b) антитела, содержащего последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO: 81, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 85.

В одном воплощении предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем последовательность CDR3 V_H выбрана из группы, состоящей из последовательностей, приведенных SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:21.

В другом воплощении предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности

CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6, последовательность KAS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7, соответственно, или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 9, 10 и 11, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:16, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:17, соответственно, или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 19, 20 и 21, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:23, последовательность DDN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:24, соответственно.

В другом воплощении предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:18.

В другом воплощении предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:22.

В следующем воплощении предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по

меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:5, или

(ii) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:15, или

(iii) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:22.

В следующем воплощении предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательности V_H и V_L , каждая из которых содержит три последовательности CDR: CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности: FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно, причем соответствующие совокупные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 из V_H по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичны по аминокислотной последовательности соответствующим совокупным каркасным последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 из данных последовательностей V_H , а последовательности CDR V_H не мутированы, при этом соответствующие совокупные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 из V_L по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичны по аминокислотной последовательности соответствующим совокупным каркасным последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 из данных последовательностей V_L , а последовательности CDR V_L не мутированы.

В следующем воплощении предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5, или

(ii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15, или

(iii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22.

В следующем воплощении предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем данные антитела:

(i) конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15, но не конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 22, или

(ii) конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22, но не конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15.

Предпочтительно данные антитела конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5.

В следующем воплощении предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем связывание данных антител с PD-L1 человека не вытесняется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:53, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:57.

В следующем воплощении предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем связывание данных антител с PD-L1 человека не блокируется при связывании антитела, содержащего последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:106, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:110.

В следующем воплощении предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем связывание данных антител с PD-L1 человека не вытесняется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:53, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:57, при этом данные антитела ингибируют связывание PD-L1

человека с PD-1 человека.

В следующем воплощении предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем связывание данных антител с PD-L1 человека не вытесняется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:53, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:57, при этом данные антитела конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22.

В следующем воплощении предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем связывание данных антител с PD-L1 человека не вытесняется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:53, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:57, при этом связывание данных антител с PD-L1 человека блокируется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22. При этом “блокирование” означает, что антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22, конкурирует с биспецифичным антителом, но не вытесняет его.

В следующем воплощении предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем данные антитела:

(i) способны связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитела, содержащие последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5, или

(ii) способны связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитела, содержащие последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15, или

(iii) способны связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитела, содержащие последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем данные антитела включают:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 33, 34 и 35, соответственно, и

вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:37, последовательность KAS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:38, соответственно, или

(ii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 47, 48 и 49, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:51, последовательность DVI и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:52, соответственно, или

(iii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 54, 55 и 56, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:58, последовательность RDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:59, соответственно, или

(iv) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 61, 62 и 63, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:65, последовательность DDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:66, соответственно, или

(v) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 107, 108 и 109, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:111, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:113, соответственно, или

(vi) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 68, 69 и 70, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:72, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:73, соответственно.

В следующем воплощении антитела включают:

(i) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:32, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:36, или

(ii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:46, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:50, или

(iii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:53, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:57, или

(iv) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:60, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:64, или

(v) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:106, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:110, или

(vi) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:67, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:71.

В одном воплощении антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, являются моновалентными.

В другом воплощении антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, представляют собой моноспецифичные антитела, содержащие два или несколько идентичных антигенсвязывающих участков.

В следующем воплощении антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, представляют собой бивалентные антитела, содержащие два антигенсвязывающих участка, способные связываться с PD-L1 человека, при этом данные два антигенсвязывающих участка имеют идентичные последовательности варибельной области.

В другом воплощении антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, представляют собой бивалентные биспецифичные антитела, которые в дополнение к первому антигенсвязывающему участку, способному связываться с PD-L1 человека, содержат второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном, причем вторым антигеном является CD3ε человека.

В другом воплощении антитела, содержащие антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, представляют собой бивалентные биспецифичные антитела, которые в дополнение к первому антигенсвязывающему участку, способному связываться с PD-L1 человека, содержат второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем вторым антигеном не является CD3ε человека.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены мультиспецифичные антитела, содержащие первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем второй антиген необязательно не представлен CD3ε человека, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает варибельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и варибельную область легкой

цепи (V_L), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем последовательность CDR3 V_H выбрана из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO:70. При этом “другой эпитоп” означает, что эпитоп, с которым связывается второй антигенсвязывающий участок, отличается от того эпитопа, с которым связывается первый антигенсвязывающий участок.

В одном воплощении таких мультиспецифичных антител данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6, последовательность KAS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7, соответственно, или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 9, 10 и 11, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:16, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:17, соответственно, или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 19, 20 и 21, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:23, последовательность DDN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:24, соответственно, или

(iv) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 33, 34 и 35, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:37, последовательность KAS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:38, соответственно, или

(v) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 47, 48 и 49, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:51, последовательность DVI и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:52, соответственно, или

(vi) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 54, 55 и 56, соответственно, и

вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:58, последовательность RDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:59, соответственно, или

(vii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 61, 62 и 63, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:65, последовательность DDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:66, соответственно, или

(viii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 68, 69 и 70, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:72, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:73, соответственно.

В другом воплощении таких мультиспецифичных антител данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:18.

В другом воплощении таких мультиспецифичных антител данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:22.

В другом воплощении таких мультиспецифичных антител данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:5, или

(ii) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична

аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:15, или

(iii) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:22.

В другом воплощении таких мультиспецифичных антител каждая из последовательностей V_H и V_L содержит три последовательности CDR: CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности: FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно, причем соответствующие совокупные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 из V_H по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичны по аминокислотной последовательности соответствующим совокупным каркасным последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 из данных последовательностей V_H , а последовательности CDR V_H не мутированы, при этом соответствующие совокупные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 из V_L по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичны по аминокислотной последовательности соответствующим совокупным каркасным последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 из данных последовательностей V_L , а последовательности CDR V_L не мутированы.

В другом воплощении таких мультиспецифичных антител данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5, или

(ii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15, или

(iii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22, или

(iv) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:32, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:36, или

(v) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:46, и последовательность

V_L , приведенную в SEQ ID NO:50, или

(vi) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:53, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:57, или

(v) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:106, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:110, или

(vii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:60, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:64, или

(viii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:67, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:71.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены мультиспецифичные антитела, содержащие первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем второй антиген необязательно не представлен CD3ε человека, при этом данные антитела:

(i) конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15, но не конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 22, или

(ii) конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22, но не конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15.

В одном воплощении таких мультиспецифичных антител данные антитела конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены мультиспецифичные антитела, содержащие первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем связывание таких антител с PD-L1 человека не вытесняется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:53, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:57.

В одном из таких воплощений антитела ингибируют связывание PD-L1 человека с

PD-1 человека.

В другом воплощении антитела конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22.

В другом воплощении связывание таких антител с PD-L1 человека блокируется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 22. При этом “блокирование” означает, что антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22, конкурирует с биспецифичным антителом, но не вытесняет его.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены мультиспецифичные антитела, содержащие первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем второй антиген необязательно не представлен CD3ε человека, при этом первый антигенсвязывающий участок:

(i) способен связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5, или

(ii) способен связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15, или

(iii) способен связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены бивалентные биспецифичные антитела, содержащие первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем второй антиген необязательно не представлен CD3ε человека, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем последовательность CDR3 V_H выбрана из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:21.

В одном воплощении таких бивалентных биспецифичных антител данный

антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6, последовательность KAS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7, соответственно, или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 9, 10 и 11, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:16, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:17, соответственно, или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 19, 20 и 21, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:23, последовательность DDN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:24, соответственно.

В другом воплощении таких бивалентных биспецифичных антител данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:18.

В другом воплощении таких бивалентных биспецифичных антител данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:22.

В другом воплощении таких бивалентных биспецифичных антител данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной

последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:5, или

(ii) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:15, или

(iii) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:22.

В другом воплощении таких бивалентных биспецифичных антител каждая из последовательностей V_H и V_L содержит три последовательности CDR: CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности: FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно, причем соответствующие совокупные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 из V_H по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичны по аминокислотной последовательности соответствующим совокупным каркасным последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 из данных последовательностей V_H , а последовательности CDR V_H не мутированы, при этом соответствующие совокупные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 из V_L по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичны по аминокислотной последовательности соответствующим совокупным каркасным последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 из данных последовательностей V_L , а последовательности CDR V_L не мутированы.

В другом воплощении таких бивалентных биспецифичных антител данный антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5, или

(ii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15, или

(iii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены бивалентные биспецифичные антитела, содержащие первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем второй антиген необязательно не представлен CD3ε человека, при этом данные антитела:

(i) конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15, но не конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 22, или

(ii) конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22, но не конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15.

В одном воплощении таких бивалентных биспецифичных антител данные антитела конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителами, содержащими последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены бивалентные биспецифичные антитела, содержащие первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем связывание таких антител с PD-L1 человека не вытесняется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:53, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:57.

В одном из таких воплощений антитела ингибируют связывание PD-L1 человека с PD-1 человека.

В другом воплощении антитела конкурируют за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22.

В другом воплощении связывание таких антител с PD-L1 человека блокируется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 22. При этом “блокирование” означает, что антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22, конкурирует с

биспецифичным антителом, но не вытесняет его.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены бивалентные биспецифичные антитела, содержащие первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем второй антиген необязательно не представлен CD3ε человека, при этом первый антигенсвязывающий участок:

(i) способен связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5, или

(ii) способен связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15, или

(iii) способен связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22.

Дополнительные воплощения антител по изобретению

В одном воплощении антитела по изобретению связываются с PD-L1 человека со значением K_D 10^{-8} М или меньше, как-то 10^{-9} М или меньше, напр., 10^{-10} М или меньше при таком определении, как описано здесь в Примере 8.

В другом воплощении антитела по изобретению опосредуют зависимость от концентрации цитотоксичность для клеток MDA-MB-231, клеток PC-3 и/или клеток HELA при использовании очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток при таком анализе, как описано здесь в Примере 11.

В предпочтительном воплощении антитела по изобретению не связываются с PD-L2 человека.

Форматы антител

Как описано выше, в данной области были описаны различные форматы антител. Антитела по изобретению в принципе могут быть любого изотипа. Выбор изотипа обычно определяется требуемыми Fc-опосредованными эффекторными функциями типа индукции ADCC либо потребностью в антителах, лишенных Fc-опосредованной эффекторной функции (“инертных” антителах). Типичными изотипами являются IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Можно использовать любые из константных областей легкой цепи человека, каппа или лямбда. Эффекторная функция антител по настоящему изобретению может быть изменена путем переключения изотипа, напр., на антитела IgG1, IgG2, IgG3,

IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM, для различных терапевтических применений. В одном воплощении обе тяжелые цепи антител по настоящему изобретению имеют изотип IgG1, например IgG1,κ. Необязательно тяжелая цепь может быть модифицирована в шарнирном и/или участке C_H3, как описано здесь в другом месте.

Предпочтительно каждый антигенсвязывающий участок содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H) и вариабельную область легкой цепи (V_L), причем каждая из данных вариабельных областей содержит три последовательности CDR: CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасных последовательности: FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно. Кроме того, предпочтительно, антитело содержит две константные области тяжелой цепи (C_H) и две константные области легкой цепи (C_L).

В одном воплощении антитела представляют собой полноразмерные антитела типа полноразмерных антител IgG1. В другом воплощении антитела представляют собой полноразмерные антитела IgG4, предпочтительно со стабилизированной шарнирной областью. В данной области описаны модификации, которые стабилизируют шарнирную область IgG4, как-то мутация S228P в глубине шарнире, напр., см. Labrijn et al., 2009 Nat Biotechnol. 27(8): 767-71.

В других воплощениях антитела по изобретению представляют собой фрагменты антител типа Fab'- или Fab-фрагментов, моновалентные фрагменты, состоящие из доменов V_L, V_H, C_L и C_H1, моновалентные антитела, описанные в WO 2007/059782 (Genmab), фрагменты F(ab')₂, Fd-фрагменты, Fv-фрагменты, фрагменты dAb, верблюжьки или нанотела либо выделенные участки, определяющие комплементарность (CDR).

Антитела по изобретению предпочтительно являются человеческими, гуманизованными или химерными. В тех воплощениях, в которых антитела представлены биспецифичными антителами, обе половинки молекулы могут быть человеческими, гуманизованными или химерными, или же половинки молекулы могут отличаться по природе в отношении происхождения последовательности.

Например, в одном воплощении биспецифичное антитело содержит две половинки молекулы, каждая из которых содержит антигенсвязывающий участок, причем:

- (i) половинка молекулы, содержащая антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, является химерной, и/или
- (ii) половинка молекулы, содержащая антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека, если она присутствует, является химерной.

Например, в другом воплощении биспецифичное антитело содержит две половинки молекулы, каждая из которых содержит антигенсвязывающий участок, причем:

- (i) половинка молекулы, содержащая антигенсвязывающий участок, способный

связываться с PD-L1 человека, является гуманизованной, и/или

(ii) половинка молекулы, содержащая антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека, если она присутствует, является гуманизованной.

Например, в другом воплощении биспецифичное антитело содержит две половинки молекулы, каждая из которых содержит антигенсвязывающий участок, причем:

(i) половинка молекулы, содержащая антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, является человеческой, и/или

(ii) половинка молекулы, содержащая антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека, если он присутствует, является человеческой.

Так, например, в одном воплощении антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, является гуманизованным, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека, если он присутствует, является гуманизованным.

В другом воплощении антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, является человеческим, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека, если он присутствует, является человеческим.

В следующем воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека, причем половинка молекулы, содержащая антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, является человеческой, гуманизованной или химерной, а половинка молекулы, содержащая антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека, является гуманизованной.

Предпочтительно половинка молекулы, содержащая антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, является человеческой, а половинка молекулы, содержащая антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека, является гуманизованной.

Форматы биспецифичных антител

В данной области известно много различных форматов и применений биспецифичных антител, которые рассмотрены в Kontermann, *Drug Discov Today*, 2015 Jul, 20(7): 838-47; MAbs, 2012 Mar-Apr, 4(2):182-97.

Биспецифичные антитела по настоящему изобретению не ограничиваются каким-либо конкретным биспецифичным форматом или способом их получения.

Примеры молекул биспецифичных антител, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают: (i) единое антитело, которое имеет два плеча,

содержащих разные антигенсвязывающие участки; (ii) одноцепочечное антитело, обладающее специфичностью к двум различным эпитопам, напр., в виде двух scFv, связанных в тандеме через дополнительный пептидный линкер; (iii) антитело с двумя переменными доменами (DVD-Ig), где каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержит два переменных домена в тандеме через короткий пептидный линкер (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (iv) химически связанный биспецифичный (Fab')₂-фрагмент; (v) Tandab, который представляет собой слияние двух одноцепочечных антител, приводящее к тетравалентному биспецифичному антителу с двумя сайтами связывания для каждого из целевых антигенов; (vi) Flexibody, которое представляет собой комбинацию scFv с диателом, образуя поливалентную молекулу; (vii) так называемые молекулы “dock and lock” на основе “домена димеризации и стыковки” протеинкиназы А, что в применении к Fabs может давать тривалентный биспецифичный связывающий белок, состоящий из двух идентичных Fab-фрагментов, связанных с другим Fab-фрагментом; (viii) так называемые молекулы-скорпионы, содержащие, напр., два scFv, слитые с обоими концами Fab-плеча человека; и (ix) диатела.

В одном воплощении биспецифичные антитела по настоящему изобретению представляют собой диатела, сшитые антитела или биспецифичные антитела, полученные путем контролируемого обмена Fab-плеча (типа описанных в WO 2011/131746 (Genmab)).

Примеры различных классов биспецифичных антител включают, без ограничения: (i) IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами C_{H3} для принудительной гетеродимеризации; (ii) рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным наведением, в которых каждая из двух сторон молекулы содержит Fab-фрагмент или часть Fab-фрагмента по меньшей мере из двух различных антител; (iii) слитые молекулы IgG, в которых полноразмерные антитела IgG слиты с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагментов; (iv) слитые молекулы Fc, в которых одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные диатела слиты с константными доменами, Fc-областями тяжелой цепи либо их частями; (v) слитые молекулы Fab, в которых слиты вместе различные Fab-фрагменты, слитые с константными доменами, Fc-областями тяжелой цепи либо их частями; и (vi) антитела на основе scFv и диател и тяжелых цепей (напр., доменные антитела, нанотела), в которых различные одноцепочечные молекулы Fv или различные диатела или различные антитела из тяжелых цепей (напр., доменные антитела, нанотела) слиты друг с другом или с другим белком или с молекулой носителя, слитой с константными доменами, Fc-областями тяжелой цепи либо их частями.

Примеры IgG-подобных молекул с комплементарными доменами C_{H3} включают,

без ограничения, молекулы Triomab/Quadromab (Trion Pharma/Fresenius Biotech; Roche, WO 2011/069104), так называемые молекулы “knobs-into-holes” (Genentech, WO 98/50431), CrossMAbs (Roche, WO 2011/117329) и электростатически подогнанные молекулы (Amgen, EP1870459 и WO 2009/089004; Chugai, US 2010/00155133; Oncomed, WO 2010/129304), молекулы LUZ-Y (Genentech; Wranik et al., J. Biol. Chem. 2012, 287(52): 43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012, Nov 1), DIG-тела и PIG-тела (Pharmabcine, WO 2010/134666, WO 2014/081202), антитела с полученными путем обмена нитей доменами (SEEDbody) (EMD Serono, WO 2007/110205), молекулы Biclomics (Merus, WO 2013/157953), молекулы Fc Δ Adp (Regeneron, WO 2010/15792), биспецифичные молекулы IgG1 и IgG2 (Pfizer/Rinat, WO 11/143545), молекулы Azymetric scaffold (Zymeworks/Merck, WO 2012/058768), молекулы mAb-Fv (Xencor, WO 2011/028952), бивалентные биспецифичные антитела (WO 2009/080254) и молекулы DuoBody[®] (Genmab, WO 2011/131746).

Примеры рекомбинантных IgG-подобных молекул с двойным наведением включают, без ограничения, молекулы с двойным наведением (DT)-Ig (WO 2009/058383), антитела два-в-одном (Genentech; Bostrom et al., 2009 Science 323, 1610-1614.), сшитые mAbs (Karmanos Cancer Center), mAb₂ (F-Star, WO 2008/003116), молекулы Zybody (Zyngenia; LaFleur et al., MAbs 2013 Mar-Apr, 5(2):208-18), подходы с общей легкой цепью (Crucell/Merus, US 7,262,028), κLbodies (NovImmune, WO 2012/023053) и CovX-body (CovX/Pfizer; Doppalapudi V.R. et al., 2007 Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 501-506).

Примеры слитых молекул IgG включают, без ограничения, молекулы с двойным переменным доменом (DVD)-Ig (Abbott, US 7,612,181), антитела с двумя доменами и двумя головками (Unilever; Sanofi Aventis, WO 2010/0226923), IgG-подобные биспецифичные молекулы (ImClone/Eli Lilly, Lewis et al., Nat Biotechnol. 2014 Feb, 32(2):191-8), молекулы Ts₂Ab (MedImmune/AZ; Dimasi et al., J Mol Biol. 2009 Oct 30, 393(3):672-92) и BsAb (Zymogenetics, WO 2010/111625), молекулы Hercules (Biogen Idec, US 007951918), слитые молекулы scFv (Novartis), слитые молекулы scFv (Changzhou Adam Biotech Inc., CN 10225 0246) и молекулы TvAb (Roche, WO 2012/025525, WO 2012/025530).

Примеры слитых молекул Fc включают, без ограничения, слияния scFv/Fc (Pearce et al., Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep, 42(6):1179-88), молекулы SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion; Blankenship JW et al., AACR 100th Annual meeting 2009, Abstract # 5465; Zymogenetics/BMS, WO 2010/111625), молекулы по технологии двойного сродства с перенаведением (Fc-DART) (MacroGenics, WO 2008/157379, WO 2010/080538) и двойные молекулы (scFv)₂-Fab (National Research Center for Antibody Medicine, Китай).

Примеры биспецифичных антител типа слитых Fab включают, без ограничения, молекулы F(ab)₂ (Medarex/AMGEN; Deo et al., J. Immunol. 1998 Feb 15, 160(4): 1677-86), молекулы двойного действия или bis-Fab (Genentech; Bostrom et al., 2009 Science 323, 1610-1614), молекулы “dock-and-lock” (DNL) (ImmunoMedics, WO 2003/074569, WO 2005/004809), бивалентные биспецифичные молекулы (Biotecno; Schoonjans, J. Immunol. 2000 Dec. 15, 165(12): 7050-7) и молекулы Fab-Fv (UCB-Celltech, WO 2009/040562 A1).

Примеры антител на основе scFv, диател и доменных антител включают, без ограничения, биспецифичные молекулы T-cell Engager (BiTE) (Micromet, WO 2005/061547), молекулы тандемных диател (TandAb) (Affimed; Le Gall et al., Protein Eng Des Sel., 2004 Apr, 17(4): 357-66.), молекулы по технологии двойного сродства с перенаведением (DART) (MacroGenics, WO 2008/157379, WO 2010/080538), одноцепочечные молекулы диател (Lawrence, FEBS Lett. 1998 Apr 3, 425(3): 479-84), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), слитые с сывороточным альбумином человека scFv (Merrimack, WO 2010/059315) и молекулы COMBODY (Epigen Biotech; Zhu et al., Immunol Cell Biol. 2010 Aug, 88(6): 667-75), нанотела с двойным наведением (Ablynx; Hmila et al., FASEB J., 2010) и доменные антитела только с тяжелыми цепями с двойным наведением.

В одном аспекте биспецифичные антитела по изобретению включают первую последовательность Fc, содержащую первый участок C_{H3}, и вторую последовательность Fc, содержащую второй участок C_{H3}, причем последовательности первого и второго участка C_{H3} различны и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанным первым и вторым участком C_{H3} будет более сильным, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первого и второго участков C_{H3}. Более подробно об этих взаимодействиях и как они достигаются изложено в WO 2011/131746 и WO 2013/060867 (Genmab), которые включены сюда в качестве ссылки.

Как описано далее здесь, стабильные биспецифичные антитела типа биспецифичных антител CD3×PD-L1 могут быть получены с высоким выходом определенным способом на основе одного гомодимерного исходного антитела к PD-L1 и одного гомодимерного исходного антитела, способного связывать разные эпитопы PD-L1 или другой антиген (типа гомодимерного исходного антитела к CD3), содержащих лишь несколько консервативных асимметричных мутаций в участках C_{H3}. Асимметричные мутации означают то, что последовательности указанных первого и второго участков C_{H3} содержат аминокислотные замены в неидентичных положениях.

В одном воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в

положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 405, 407 и 409, и второй участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 405, 407 и 409, причем замены в первом и втором участке C_{H3} находятся не в одинаковых положениях.

В одном воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в положении 366, а второй участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 368, 370, 399, 405, 407 и 409. В одном воплощении аминокислота в положении 366 выбрана из Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val или Gln.

В одном воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в положении 368, а второй участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 370, 399, 405, 407 и 409.

В одном воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в положении 370, а второй участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 399, 405, 407 и 409.

В одном воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в положении 399, а второй участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 405, 407 и 409.

В одном воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в положении 405, а второй участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 407 и 409.

В одном воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в положении 407, а второй участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 405 и 409.

В одном воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 405 и 407.

Соответственно, в одном воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, последовательности данных первого и второго

участков C_{H3} содержат асимметричные мутации, то есть мутации в разных положениях в двух участках C_{H3}, напр., мутацию в положении 405 в одном из участков C_{H3} и мутацию в положении 409 в другом участке C_{H3}.

В одном воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 405 и 407. В одном таком воплощении первый участок C_{H3} содержит другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит другую аминокислоту, чем Phe, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, Cys, Lys или Leu в положении 405. В следующем воплощении первый участок C_{H3} содержит другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит другую аминокислоту, чем Phe, Arg или Gly, напр., Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Met, Lys, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 405.

В другом воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит Phe в положении 405 и другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит другую аминокислоту, чем Phe, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, Leu, Met или Cys, в положении 405 и Lys в положении 409. В следующем воплощении первый участок C_{H3} содержит Phe в положении 405 и другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит другую аминокислоту, чем Phe, Arg или Gly, напр., Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Met, Lys, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 405 и Lys в положении 409.

В другом воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит Phe в положении 405 и другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит Leu в положении 405 и Lys в положении 409. В следующем воплощении первый участок C_{H3} содержит Phe в положении 405 и Arg в положении 409, а второй участок C_{H3}

содержит другую аминокислоту, чем Phe, Arg или Gly, напр., Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Met, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 405 и Lys в положении 409. В другом воплощении первый участок C_{H3} содержит Phe в положении 405 и Arg в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит Leu в положении 405 и Lys в положении 409.

В следующем воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит Lys в положении 409, Thr в положении 370 и Leu в положении 405. В другом воплощении первый участок C_{H3} содержит Arg в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит Lys в положении 409, Thr в положении 370 и Leu в положении 405.

В следующем воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит Lys в положении 370, Phe в положении 405 и Arg в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит Lys в положении 409, Thr в положении 370 и Leu в положении 405.

В другом воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит Lys в положении 409 и а) Ile в положении 350 и Leu в положении 405, или б) Thr в положении 370 и Leu в положении 405.

В другом воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит Arg в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит Lys в положении 409 и либо а) Ile в положении 350 и Leu в положении 405, либо б) Thr в положении 370 и Leu в положении 405.

В другом воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит Thr в положении 350, Lys в положении 370, Phe в положении 405 и Arg в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит Lys в положении 409 и либо а) Ile в положении 350 и Leu в положении 405, либо б) Thr в положении 370 и Leu в положении 405.

В другом воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит Thr в положении 350, Lys в положении 370, Phe в положении 405 и Arg в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит Ile в положении 350, Thr в положении 370, Leu в положении 405 и Lys в

положении 409.

В одном воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_H3 содержит другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met в положении 409, а второй участок C_H3 содержит другую аминокислоту, чем Phe в положении 405, как-то другую, чем Phe, Arg или Gly в положении 405; либо первый участок C_H3 содержит другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met в положении 409, а второй участок C_H3 содержит другую аминокислоту, чем Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr в положении 407.

В одном воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_H3 содержит другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met в положении 409, а второй участок C_H3 содержит другую аминокислоту, чем Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr в положении 407.

В одном воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_H3 содержит Tyr в положении 407 и другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met в положении 409, а второй участок C_H3 содержит другую аминокислоту, чем Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr в положении 407 и Lys в положении 409.

В одном воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_H3 содержит Tyr в положении 407 и Arg в положении 409, а второй участок C_H3 содержит другую аминокислоту, чем Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом воплощении первый участок C_H3 содержит другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а второй участок C_H3 содержит другую аминокислоту, чем Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr, напр., Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp или Cys в положении 407. В другом воплощении первый участок C_H3 содержит другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а второй участок C_H3 содержит Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val или Trp в положении 407.

В другом воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_H3 содержит другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а второй участок C_H3 содержит Gly, Leu, Met, Asn или Trp в положении 407.

В другом воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из

приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит Tyr в положении 407 и другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит другую аминокислоту, чем Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr, напр., Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp или Cys в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит Tyr в положении 407 и другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val или Trp в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит Tyr в положении 407 и другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит Gly, Leu, Met, Asn или Trp в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит Tyr в положении 407 и Arg в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит другую аминокислоту, чем Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr, напр., Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp или Cys в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит Tyr в положении 407 и Arg в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val или Trp в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит Tyr в положении 407 и Arg в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит Gly, Leu, Met, Asn или Trp в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом воплощении биспецифичных антител, определенных в любом из приведенных здесь воплощений, первый участок C_{H3} содержит другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит:

- (i) другую аминокислоту, чем Phe, Leu или Met, напр., Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr,

Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 368 или

(ii) Trp в положении 370 или

(iii) другую аминокислоту, чем Asp, Cys, Pro, Glu или Gln, напр., Phe, Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asn, Trp, Tyr или Cys в положении 399, или

(iv) другую аминокислоту, чем Lys, Arg, Ser, Thr или Trp, напр., Phe, Leu, Met, Ala, Val, Gly, Ile, Asn, His, Asp, Glu, Gln, Pro, Tyr или Cys в положении 366.

В одном воплощении первый участок C_{H3} содержит Arg, Ala, His или Gly в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит:

(i) Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val или Trp в положении 368 или

(ii) Trp в положении 370 или

(iii) Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg или Tyr в положении 399 или

(iv) Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, Gln, Phe, Gly, Ile, Leu, Met или Tyr в положении 366.

В одном воплощении первый участок C_{H3} содержит Arg в положении 409, а второй участок C_{H3} содержит:

(i) Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val или Trp в положении 368 или

(ii) Trp в положении 370 или

(iii) Phe, His, Lys, Arg или Tyr в положении 399 или

(iv) Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val или Gln в положении 366.

В предпочтительном воплощении биспецифичное антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, причем каждая из данных первой и второй тяжелых цепей содержит по меньшей мере шарнирный участок и участки C_{H2} и C_{H3}, при этом (i) аминокислота в положении, соответствующем F405 (по нумерации EU), представлена L в данной первой тяжелой цепи, а аминокислота в положении, соответствующем K409 (по нумерации EU), представлена R в данной второй тяжелой цепи, или же (ii) аминокислота в положении, соответствующем K409 (по нумерации EU), представлена R в данной первой тяжелой цепи, а аминокислота в положении, соответствующем F405 (по нумерации EU), представлена L в данной второй тяжелой цепи.

Наряду с приведенными выше аминокислотными заменами данные первая и вторая тяжелые цепи могут содержать и другие аминокислотные замены, делеции или вставки относительно последовательностей тяжелых цепей дикого типа.

В следующем воплощении данные первые и вторые Fab-плечи (или константные домены тяжелой цепи) содержат, помимо указанных мутаций, последовательность C_{H3},

выбранную независимо из следующего: IgG1m(a) (SEQ ID NO: 96), IgG1m(f) (SEQ ID NO: 97) и IgG1m(ax) (SEQ ID NO: 98).

В одном воплощении ни первая, ни вторая последовательность Fc не содержит последовательности Cys-Pro-Ser-Cys в (основном) шарнирном участке.

В другом воплощении и первая, и вторая последовательность Fc содержит последовательность Cys-Pro-Ser-Cys в (основном) шарнирном участке.

Способы получения биспецифичных антител

При получении биспецифичных антител по изобретению можно использовать традиционные методы типа гибридной гибридомы и методы химической конъюгации (Marvin and Zhu (2005) *Acta Pharmacol. Sin.* 26: 649). Совместная экспрессия в клетках хозяина двух антител, состоящих из разных тяжелых и легких цепей, приводит к смеси возможных продуктов антител в дополнение к требуемым биспецифичным антителам, которые затем можно выделить, напр., методом аффинной хроматографии или подобными методами.

Также можно использовать стратегии, способствующие образованию функционального биспецифичного продукта при совместной экспрессии различных конструкций антител, напр., метод, описанный Lindhofer et al. (1995 *J Immunol* 155: 219). Слияние крысиных и мышиных гибридом, вырабатывающих различные антитела, дает ограниченное число гетеродимерных белков вследствие предпочтительного спаривания тяжелых/легких цепей от одного вида. Другой стратегией, способствующей образованию гетеродимеров перед гомодимерами, является стратегия “knob-into-hole”, при которой вводится выступ в полипептид первой тяжелой цепи и соответствующая полость в полипептид второй тяжелой цепи с тем, чтобы выступ входил в полость на границе между этими двумя тяжелыми цепями, способствуя образованию гетеродимера и препятствуя образованию гомодимера. “Выступы” конструируются путем замены небольших боковых цепей аминокислот на границе раздела первого полипептида на более крупные боковые цепи. А на границе раздела второго полипептида создаются компенсаторные “полости” такого же или близкого выступам размера путем замены крупных боковых цепей аминокислот на более мелкие (US Patent 5,731,168). В EP 1870459 (Chugai) и WO 2009/089004 (Amgen) описаны другие стратегии, способствующие образованию гетеродимеров при совместной экспрессии различных доменов антител в клетках хозяина. В этих методах один или несколько остатков, составляющих границу раздела C_H3-C_H3 в обоих доменах C_H3, заменяются заряженными аминокислотами с тем, чтобы образование гомодимеров было электростатически невыгодно, а гетеродимеризация была электростатически выгодна. Еще одна стратегия описана в WO 2007/110205 (Merck), при

которой для усиления гетеродимеризации используются различия между доменами C_{H3} в IgA и IgG.

Другой метод получения биспецифичных антител *in vitro* описан в WO 2008/119353 (Genmab), в котором биспецифичные антитела образуются путем обмена “Fab-плеча” или “половинки молекулы” (перестановки тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи) между двумя моноспецифичными антителами IgG4 или IgG4-подобными при инкубации в восстановительных условиях. Полученный продукт представляет собой биспецифичное антитело, содержащее два Fab-плеча, которые могут иметь разные последовательности.

Предпочтительный способ получения биспецифичных антител типа биспецифичных антитела к CD3×PD-L1 по настоящему изобретению включает способы, описанные в WO 2011/131746 и WO 2013/060867 (Genmab), включающие следующие стадии:

а) получения первого антитела, содержащего Fc-область, причем данная Fc-область содержит первый участок C_{H3};

б) получения второго антитела, содержащего Fc-область, причем данная Fc-область содержит второй участок C_{H3};

причем первое антитело представляет собой антитело к PD-L1 по изобретению, а второе антитело представляет собой антитело, которое способно связываться с другим эпитопом PD-L1 или с другим антигеном типа CD3 человека, или наоборот;

при этом последовательности данных первого и второго участков C_{H3} различны и таковы, что гетеродимерные взаимодействия между первым и вторым участком C_{H3} будут сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий данных первых и вторых участков C_{H3};

с) инкубации данного первого антитела вместе со вторым антителом при восстановительных условиях; и

д) получения данного биспецифичного антитела, напр., биспецифичного антитела к CD3×PD-L1.

Также предусмотрен способ получения антител по изобретению, включающий стадии:

а) культивирования клеток-хозяев, вырабатывающих первое антитело, содержащее антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, как определено здесь, и очистка данного первого антитела из культуры;

б) культивирования клеток-хозяев, вырабатывающих второе антитело, содержащее антигенсвязывающий участок, способный связываться с другим эпитопом PD-L1 или с другим антигеном, напр., участок связывания CD3ε человека, как определено

здесь, и очистка данного второго антитела из культуры;

с) инкубации данного первого антитела вместе со вторым антителом в восстановительных условиях, достаточных для того, чтобы цистеины в шарнирной области подверглись изомеризации в дисульфидную связь; и

d) получения данного биспецифичного антитела.

В одном воплощении данное первое антитело вместе со вторым антителом инкубируют в восстановительных условиях, достаточных для того, чтобы цистеины в шарнирной области подверглись изомеризации в дисульфидную связь, причем гетеродимерное взаимодействие между первым и вторым антителом в образующемся гетеродимерном антителе таково, что не происходит замены Fab-плеча при 0,5 мМ GSH через 24 часа при 37°C.

Не ограничиваясь теорией, на стадии с) восстанавливаются дисульфидные связи тяжелой цепи в шарнирных участках исходных антител, а полученные цистеины затем способны образовывать дисульфидную связь между тяжелыми цепями с остатками цистеина молекулы другого исходного антитела (изначально с другой специфичностью). В одном воплощении этого способа восстановительные условия на стадии с) включают добавление восстановителя, напр., восстановителя, выбранного из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина (2-MEA), дитиотреитола (DTT), дитиозритритола (DTE), глутатиона, трис(2-карбоксиил)фосфина (TCEP), L-цистеина и β-меркаптоэтанола, предпочтительно восстановителя, выбранного из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиил)фосфина. В другом воплощении стадия с) включает возвращение условий до невозстановительных или менее восстановительных, к примеру, путем удаления восстановителя, напр., путем обессоливания.

Для этого способа можно использовать любые из антител, напр., антитела к CD3 и PD-L1, описанные выше, включая первое и второе антитело к CD3 и PD-L1, соответственно, содержащие первую и/или вторую Fc-область. Примеры таких первой и второй Fc-областей, включая комбинации таких первой и второй Fc-областей, могут включать в себя любые из описанных выше. В конкретном воплощении первое и второе антитело, напр., антитела к CD3 и PD-L1, соответственно, можно выбрать так, чтобы получить биспецифичное антитело, как описано здесь.

В одном воплощении этого способа данное первое и/или второе антитело являются полноразмерными антителами.

Fc-области первого и второго антитела могут быть любого изотипа, включая, без ограничения, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В одном воплощении этого способа Fc-области и

первого, и второго антитела имеют изотип IgG1. В другом воплощении одна из Fc-областей данных антител имеет изотип IgG1, а другая – изотип IgG4. В последнем воплощении полученное биспецифичное антитело содержит последовательность Fc из IgG1 и последовательность Fc из IgG4 и поэтому может обладать интересными промежуточными свойствами в отношении активации эффекторных функций.

В следующем воплощении один из исходных белков антител подвергся инженерии с тем, чтобы он не связывал белок А, что позволяет отделить гетеродимерный белок от гомодимерного исходного белка пропусканием продукта через колонку с белком А.

Как описано выше, последовательности первых и вторых участков C_H3 у гомодимерных исходных антител различны и таковы, что гетеродимерные взаимодействия между первым и вторым участком C_H3 будут сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий данных первых и вторых участков C_H3. Более подробно об этих взаимодействиях и как они достигаются изложено в WO 2011/131746 и WO 2013/060867 (Genmab), которые включены сюда путем ссылки во всей полноте.

В частности, стабильные биспецифичные антитела, напр., биспецифичные антитела CD3×PD-L1, могут быть получены с высоким выходом вышеприведенным способом по изобретению на основе двух гомодимерных исходных антител, которые связывают PD-L1 и другой эпитоп PD-L1 или другой антиген, напр., CD3, соответственно, и содержат лишь несколько консервативных асимметричных мутаций в участках C_H3. Асимметричные мутации означают, что последовательности данных первого и второго участка C_H3 содержат аминокислотные замены в неидентичных положениях.

Биспецифичные антитела по изобретению также могут быть получены путем совместной экспрессии конструкций, кодирующих первый и второй полипептид в одной клетке. Так, в следующем аспекте изобретения предусмотрен способ получения биспецифичных антител, который включает следующие стадии:

а) получение первой конструкции из нуклеиновой кислоты, кодирующей первый полипептид, содержащий первую последовательность Fc и первый антигенсвязывающий участок тяжелой цепи первого антитела, причем данная первая последовательность Fc содержит первый участок C_H3;

б) получение второй конструкции из нуклеиновой кислоты, кодирующей второй полипептид, содержащий вторую последовательность Fc и второй антигенсвязывающий участок тяжелой цепи второго антитела, причем данная вторая последовательность Fc содержит второй участок C_H3,

причем последовательности данных первого и второго участков C_H3 различны и

таковы, что гетеродимерные взаимодействия между первым и вторым участком C_{H3} будут сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий данных первых и вторых участков C_{H3}, при этом первый гомодимерный белок содержит другую аминокислоту, чем Lys, Leu или Met в положении 409, а второй гомодимерный белок содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из: 366, 368, 370, 399, 405 и 407,

при этом необязательно данные первая и вторая конструкции из нуклеиновой кислоты кодируют последовательности легкой цепи данных первого и второго антитела;

с) совместная экспрессия данных первой и второй конструкций из нуклеиновой кислоты в клетках хозяина; и

d) получение данного гетеродимерного белка из клеточной культуры.

Материалы и методы для получения антител по изобретению

В следующих аспектах изобретения предусмотрены материалы и методы для рекомбинантного получения антител по изобретению. Подходящие экспрессирующие векторы, включая промоторы, энхансеры и т.д., а также подходящие клетки хозяина для получения антител хорошо известны в данной области.

Так, в одном аспекте предусмотрены конструкции из нуклеиновой кислоты, включающие:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, содержащего антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, как определено здесь, и/или

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, содержащего антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, как определено здесь.

В одном воплощении конструкция из нуклеиновой кислоты дополнительно включает:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, содержащего антигенсвязывающий участок, способный связываться с другим эпитопом PD-L1 или с другим антигеном, напр., CD3ε человека, как определено здесь, и/или

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, содержащего антигенсвязывающий участок, способный связываться с другим эпитопом PD-L1 или с другим антигеном, напр., CD3ε человека, как определено здесь.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены экспрессирующие векторы, содержащие конструкции из нуклеиновой кислоты, как определено выше.

Экспрессирующим вектором в контексте настоящего изобретения может быть любой подходящий вектор, включая хромосомные, нехромосомные и синтетические векторы из нуклеиновой кислоты (последовательности нуклеиновой кислоты, содержащие подходящий набор контролирующих экспрессию элементов). Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговые ДНК, бакуловирусы, дрожжевые плазмиды, векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговой ДНК, и векторы из вирусной нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК). В одном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, напр., нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к PD-L1 или CD3, содержится в векторе из “голой” ДНК или РНК, включая, к примеру, линейные экспрессирующие элементы (как описано, к примеру, в Sykes and Johnston, *Nat Biotech.* 17, 355-59 (1997)), векторы из компактной нуклеиновой кислоты (как описано, к примеру, в US 6,077,835 и/или WO 00/70087), плазмидные векторы типа pBR322, pUC19/18 или pUC118/119), векторы из нуклеиновой кислоты минимального размера “midge” (как описано, к примеру, в Schakowski et al., *Mol Ther.* 3, 793-800 (2001)) или в виде осажденной конструкции вектора из нуклеиновой кислоты типа осажденных $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ конструкций (как описано, к примеру, в WO 2000/46147, Benvenisty and Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978), и Coraro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603 (1981)). Такие векторы из нуклеиновой кислоты и их применение хорошо известны в данной области (к примеру, см. US 5,589,466 и US 5,973,972).

В одном воплощении вектор подходит для экспрессии антител, напр., антител к PD-L1 и/или антител к CD3 в бактериальных клетках. Примеры таких векторов включают такие экспрессирующие векторы, как BlueScript (Stratagene), векторы pIN (Van Heeke & Schuster, *J Biol Chem.* 264, 5503-5509 (1989), векторы pET (Novagen, Madison, WI) и др.

Экспрессирующим вектором также или альтернативно может быть вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Можно использовать любой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Подходящие векторы включают, к примеру, векторы, содержащие конститутивные или индуцибельные промоторы типа α -фактора, алкогольоксидазы и PGH (см. обзоры F. Ausubel et al., Ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience, New York (1987); и Grant et al., *Methods in Enzymol.* 153, 516-544 (1987)).

Экспрессирующим вектором также или альтернативно может быть вектор, подходящий для экспрессии в клетках млекопитающих, напр., вектор, содержащий глутаминсинтетазу в качестве селектируемого маркера, типа векторов, описанных в Bebbington (1992) *Biotechnology (NY)* 10: 169-175.

Нуклеиновая кислота и/или вектор также может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность секреции/локализации, которая может направлять полипептид типа появляющейся полипептидной цепи в периплазматическое пространство или в среду для культивирования клеток. Такие последовательности известны в данной области и включают лидеры секреции или сигнальные пептиды.

Экспрессирующий вектор может содержать или быть связан с любым подходящим промотором, энхансером и другими способствующими экспрессии элементами. Примеры таких элементов включают сильные промоторы экспрессии (напр., промотор/энхансер IE CMV человека, а также промоторы LTR RSV, SV40, SL3-3, MMTV и ВИЧ), эффективные последовательности терминации поли(A), начала репликации для плазмидных продуктов в *E. coli*, гены устойчивости к антибиотикам в качестве селектируемых маркеров и/или удобные сайты клонирования (напр., полилинкеры). Нуклеиновые кислоты также могут содержать индуцибельные промоторы, в отличие от конститутивных промоторов типа IE CMV.

В одном воплощении кодирующий антитело экспрессирующий вектор, напр., кодирующий антитело к PD-L1 и/или CD3 экспрессирующий вектор, может быть расположен и/или доставлен в клетки хозяина или организм животного через вирусный вектор.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены клетки-хозяева, содержащие одну или несколько конструкций из нуклеиновой кислоты или экспрессирующих векторов, приведенных выше.

Так, настоящим изобретением также предусмотрены рекомбинантные эукариотические или прокариотические клетки-хозяева типа трансфектомы, которые вырабатывают антитела настоящего изобретения.

Примеры клеток-хозяев включают дрожжевые, бактериальные клетки, растительные и клетки млекопитающих, как-то клетки CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6 или NS0 или лимфоцитарные клетки. Предпочтительными клетками хозяина являются клетки CHO-K1.

Например, в одном воплощении клетки хозяина могут содержать первую и вторую конструкцию из нуклеиновой кислоты, стабильно встроенные в клеточный геном. В другом воплощении настоящего изобретения предусмотрены клетки, содержащие не встроенную нуклеиновую кислоту типа плазмиды, космиды, фагемиды или линейного экспрессирующего элемента, которые содержат первую и вторую конструкцию из нуклеиновой кислоты, как указано выше.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены гибридомы, которые вырабатывают антитела к PD-L1, как определено здесь.

Fc-области

В некоторых воплощениях антитела по настоящему изобретению, наряду с антигенсвязывающими участками, содержат Fc-область, состоящую из последовательностей Fc двух тяжелых цепей.

Первые и вторые последовательности Fc могут быть любого изотипа, включая, без ограничения, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и могут содержать одну или несколько мутаций или модификаций. В одном воплощении и первая, и вторая последовательность Fc имеет изотип IgG4 или его производное, необязательно с одной или несколькими мутациями или модификациями. В другом воплощении и первая, и вторая последовательность Fc имеет изотип IgG1 или его производное, необязательно с одной или несколькими мутациями или модификациями. В другом воплощении одна из последовательностей Fc имеет изотип IgG1, а другая – изотип IgG4, или же это производные таких соответствующих изотипов, необязательно с одной или несколькими мутациями или модификациями.

В одном воплощении одна или обе последовательности Fc дефектны по эффекторной функции. Например, последовательности Fc могут иметь изотип IgG4 или другой изотип, напр., IgG1, IgG2 или IgG3, который подвергнулся мутации с тем, чтобы уменьшить или даже устранить способность опосредовать эффекторные функции типа ADCC. Такие мутации, напр., описаны в Dall'Acqua WF et al., *J. Immunol.* 177(2): 1129-1138 (2006); и Hezareh M, *J. Virol.* 75(24): 12161-12168 (2001). В другом воплощении одна или обе последовательности Fc содержат последовательность IgG1 дикого типа.

Антитела по настоящему изобретению могут содержать модификации в области Fc. Когда антитело содержит такие модификации, оно может стать инертным или неактивирующим антителом. При этом термин “инертность”, “инертный” или “неактивирующий” относится к такой Fc-области, которая по меньшей мере неспособна связываться с любым Fcγ-рецептором, индуцировать Fc-опосредованное сшивание FcR или индуцировать FcR-опосредованное перекрестное сшивание целевых антигенов через две Fc-области индивидуальных антител или не способно связывать C1q. Инертность Fc-области антител, напр., гуманизованных или химерных антител против CD3, предпочтительно проверяется с использованием антител в моноспецифичном формате.

Можно сконструировать несколько вариантов, чтобы сделать Fc-область антитела неактивной для взаимодействий с Fcγ-рецепторами (гамма) и C1q для разработки терапевтических антител. Примеры таких вариантов описаны здесь.

Так, в одном воплощении антител по изобретению антитело содержит первую и

вторую тяжелую цепь, причем одна или обе тяжелые цепи модифицированы с тем, чтобы антитело индуцировало Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с таким антителом, которое идентично за исключением того, что содержит немодифицированную первую и вторую тяжелую цепь. Такая Fc-опосредованная эффекторная функция может быть измерена по опосредованной Fc экспрессии CD69, по связыванию с Fc γ -рецепторами, по связыванию с C1q или по индукции Fc-опосредованного перекрестного сшивания FcR.

В одном таком воплощении константные последовательности тяжелой цепи подвергаются модификации таким образом, чтобы у данного антитела Fc-опосредованная экспрессия CD69 снижалась по меньшей мере на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90%, на 99% или 100% по сравнению с антителом дикого типа (немодифицированным), при этом такая Fc-опосредованная экспрессия CD69 определяется при функциональном анализе на основе PBMC, напр., как описано в примере 3 из WO 2015/001085.

В другом таком воплощении константные последовательности тяжелой и легкой цепи подвергаются модификации таким образом, чтобы связывание C1q с антителом снижалось по сравнению с немодифицированным антителом по меньшей мере на 70%, на 80%, на 90%, на 95%, на 97% или на 100%, при этом связывание C1q определяется методом ELISA.

В другом воплощении антитело содержит Fc-область, которая подвергалась модификации с тем, чтобы у данного антитела Fc-опосредованная пролиферация Т-клеток по сравнению с немодифицированным антителом снижалась по меньшей мере на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90%, на 99% или на 100%, при этом пролиферацию Т-клеток измеряют при функциональном анализе на основе мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

Таким образом, аминокислоты в Fc-области, которые играют доминирующую роль во взаимодействиях с C1q и Fc γ -рецепторами, могут подвергаться модификации.

Примеры положений аминокислот, которые могут подвергаться модификации, напр., в антителах изотипа IgG1, включают положения L234, L235 и P331. Их комбинации типа L234F/L235E/P331S могут вызывать сильное снижение связывания с CD64, CD32, CD16 и C1q человека.

Так, в одном воплощении аминокислоты по меньшей мере в одном положении, соответствующем L234, L235 и P331, могут быть представлены A, A и S, соответственно (Xu et al., 2000, Cell Immunol. 200(1): 16-26; Oganessian et al., 2008, Acta Cryst. (D64):700-4). Кроме того, при аминокислотных заменах L234F и L235E могут происходить нарушения взаимодействий Fc-области с Fc γ -рецепторами и C1q (Canfield et al., 1991, J. Exp. Med.

(173): 1483-91; Duncan et al., 1988, *Nature* (332):738-40). Поэтому в одном воплощении аминокислоты в положениях, соответствующих L234 и L235, могут быть представлены F и E, соответственно. При аминокислотной замене D265A может уменьшиться связывание со всеми Fcγ-рецепторами и предотвращается ADCC (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* (276): 6591-604). Поэтому в одном воплощении аминокислота в положении, соответствующем D265, может быть представлена A. Связывание с C1q может устраняться при введении мутаций в положения D270, K322, P329 и P331. Мутации в этих положениях типа D270A или K322A или P329A или P331A могут сделать антитело дефектным по активности CDC (Idusogie EE et al., 2000, *J. Immunol.* 164: 4178-84). Поэтому в одном воплощении аминокислоты по меньшей мере в одном положении, соответствующем D270, K322, P329 и P331, могут быть представлены A, A, A и A, соответственно.

Альтернативный подход к минимизации взаимодействия Fc-области с Fcγ-рецепторами и C1q заключается в удалении сайта гликозилирования антитела. При мутации положения N297, напр., в Q, A или E удаляется сайт гликозилирования, который важен для взаимодействий IgG с Fcγ-рецепторами. Поэтому в одном воплощении аминокислота в положении, соответствующем N297, может быть представлена G, Q, A или E (Leabman et al., 2013, *MAbs* 5(6): 896-903). Другой альтернативный подход к минимизации взаимодействия Fc-области с Fcγ-рецепторами может заключаться в следующих мутациях: P238A, A327Q, P329A или E233P/L234V/L235A/G236del (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* (276):6591-604).

С другой стороны, считается, что у подклассов IgG2 и IgG4 человека по природе ослаблены взаимодействия с C1q и Fcγ-рецепторами, хотя и отмечались взаимодействия с Fcγ-рецепторами (Parren et al., 1992, *J. Clin Invest.* 90: 1537-1546; Bruhns et al., 2009, *Blood* 113: 3716-3725). У обоих изотипов можно проделать мутации, устраняющие эти остаточные взаимодействия, что приводит к уменьшению нежелательных побочных эффектов, связанных со связыванием FcR. Для IgG2 они включают L234A и G237A, а для IgG4 – L235E. Поэтому в одном воплощении аминокислоты в положениях, соответствующих L234 и G237 в тяжелой цепи IgG2 человека, могут быть представлены A и A, соответственно. В одном воплощении аминокислота в положении, соответствующем L235 в тяжелой цепи IgG4 человека, может быть представлена E.

Другие подходы к дальнейшей минимизации взаимодействия с Fcγ-рецепторами и C1q у антител IgG2 включают подходы, описанные в WO 2011/066501 и Lightle S. et al., 2010, *Protein Science* (19): 753-62.

Шарнирная область антител также может иметь значение в отношении

взаимодействий с Fc γ -рецепторами и комплементом (Brekke et al., 2006, J Immunol. 177: 1129-1138; Dall'Acqua WF et al., 2006, J Immunol 177: 1129-1138). Соответственно, мутации или делеции в шарнирной области могут влиять на эффекторные функции антител.

Так, в одном воплощении антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь иммуноглобулина, причем по меньшей мере в одной из данных первой и второй тяжелых цепей иммуноглобулина одна или несколько аминокислот в положениях, соответствующих положениям L234, L235, D265, N297 и P331 в тяжелой цепи IgG1 человека, не представлены L, L, D, N и P, соответственно.

В одном воплощении и в первой, и во второй тяжелой цепи одна или несколько аминокислот в положениях, соответствующих положениям L234, L235, D265, N297 и P331 в тяжелой цепи IgG1 человека, не представлены L, L, D, N и P, соответственно.

В одном воплощении и в первой, и во второй тяжелой цепи аминокислота в положении, соответствующем положению D265 в тяжелой цепи IgG1 человека, не представлена D.

Так, в одном воплощении и в первой, и во второй тяжелой цепи аминокислота в положении, соответствующем положению D265 в тяжелой цепи IgG1 человека, выбрана из группы, состоящей из A и E.

В другом воплощении по меньшей мере в одной из данных первой и второй тяжелой цепи аминокислоты в положениях, соответствующих положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека, не представлены L и L, соответственно.

В предпочтительном воплощении по меньшей мере в одной из данных первой и второй тяжелой цепи аминокислоты в положениях, соответствующих положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека, представлены F и E, соответственно.

В одном воплощении и в первой, и во второй тяжелой цепи аминокислоты в положениях, соответствующих положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека, представлены F и E, соответственно.

В предпочтительном воплощении по меньшей мере в одной из данных первой и второй тяжелой цепи аминокислоты в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека, представлены F, E и A, соответственно.

В особенно предпочтительном воплощении и в первой, и во второй тяжелой цепи аминокислоты в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека, представлены F, E и A, соответственно.

В другом особенно предпочтительном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее первую и вторую тяжелую цепь, причем

положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU и в первой тяжелой цепи, и во второй тяжелой цепи представлены F и E, соответственно, при этом (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, в первой тяжелой цепи представлено L, а положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, во второй тяжелой цепи представлено R, или же (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, в первой тяжелой цепи представлено R, а положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, во второй тяжелой цепи представлено L.

В другом особенно предпочтительном воплощении антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее первую и вторую тяжелую цепь, причем положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU и в первой тяжелой цепи, и во второй тяжелой цепи представлены F, E и A, соответственно, при этом (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, в первой тяжелой цепи представлено L, а положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, во второй тяжелой цепи представлено R, или же (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, в первой тяжелой цепи представлено R, а положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, во второй тяжелой цепи представлено L.

Варианты антител, содержащие комбинацию трех аминокислотных замен L234F, L235E и D265A наряду с мутацией K409R или F405L, обозначаются здесь суффиксом “FEAR” или “FEAL”, соответственно.

При этом huCD3-H1L1 означает гуманизованное антитело SP34 против CD3, у которого последовательности V_H и V_L приведены в SEQ ID NOs: 25 и 29.

В предпочтительном воплощении биспецифичные антитела по изобретению содержат:

(i) половинку молекулы антитела, происходящую из IgG1-huCD3-H1L1-FEAL, и половинку молекулы антитела, происходящую из IgG1-PDL1-338-FEAR, IgG1-PDL1-511-FEAR или IgG1-PDL1-547-FEAR, либо

(ii) половинку молекулы антитела, происходящую из IgG1-huCD3-H1L1-FEAR, и половинку молекулы антитела, происходящую из IgG1-PDL1-338-FEAL, IgG1-PDL1-511-FEAL или IgG1-PDL1-547-FEAL.

В следующем воплощении первая тяжелая цепь или половинка молекулы содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 90, а вторая тяжелая цепь содержит

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 89.

В следующем воплощении изобретения одно или оба антитела, входящие в состав биспецифичного антитела, подвергались инженерии для снижения или повышения связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) с целью изменения времени полужизни биспецифичного антитела в сыворотке. Способы увеличения или уменьшения времени полужизни в сыворотке хорошо известны в данной области. К примеру, см. Dall'Acqua et al., 2006, J. Biol. Chem., 281:23514-24; Hinton et al., 2006, J. Immunol., 176:346-56; и Zalevsky et al., 2010, Nat. Biotechnol., 28:157-9.

Конъюгаты

В следующем аспекте настоящего изобретения предусмотрены антитела, которые связаны или конъюгированы с одной или несколькими терапевтическими молекулами типа цитокинов, иммунодепрессантов, иммуностимуляторов и/или радиоизотопов. Такие конъюгаты приводятся здесь как “иммуноконъюгаты” или “лекарственные конъюгаты”. Иммуноконъюгаты, включающие в себя один или несколько цитотоксинов, именуются “иммунотоксинами”.

В одном воплощении первая и/или вторая последовательность Fc конъюгирована с лекарственным препаратом или пролекарством либо содержит акцепторную группу для него. Такой акцепторной группой, напр., может быть природная аминокислота.

Композиции

В следующем аспекте изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие антитело согласно любому из приведенных здесь воплощений и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения могут содержать одно антитело по настоящему изобретению или комбинацию различных антител по настоящему изобретению.

Фармацевтические композиции могут быть составлены по традиционным методикам типа приведенных в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать в себя, напр., разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (напр., неионные детергенты типа Tween-20 или Tween-80), стабилизаторы (напр., сахара или лишенные белков аминокислоты), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизаторы и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтические композиции.

Фармацевтически приемлемые носители включают всевозможные подходящие растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые

средства, средства для поддержания изотоничности, антиоксиданты и средства, замедляющие всасывание, и т.п., которые физиологически совместимы с антителами настоящего изобретения. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях настоящего изобретения, включают воду, солевой раствор, физраствор с фосфатным буфером, этанол, декстрозу, полиолы (как-то глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и др.) и подходящие смеси из них, растительные масла, коллоидные растворы карбоксиметилцеллюлозы, трагакантовую камедь и органические сложные эфиры для инъекций типа этилолеата и/или различные буферы. Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления ex tempore стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Надлежащую текучесть можно поддерживать, к примеру, с помощью материалов для покрытия типа лецитина, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и использования поверхностно-активных веществ.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут содержать фармацевтически приемлемые антиоксиданты, к примеру: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеин гидрохлорид, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и др.; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, лецитин, пропилгаллат, α -токоферол и др.; и (3) хелаторы металлов, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и др.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут содержать в своем составе средства для поддержания изотоничности типа сахаров, полиспиртов, как-то маннит, сорбит, глицерин или хлорид натрия.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут содержать одно или несколько вспомогательных веществ, подходящих для выбранного способа введения, как-то консерванты, смачивающие вещества, эмульгирующие, диспергирующие вещества, консерванты или буферы, которые могут увеличить срок годности или эффективность фармацевтической композиции. Антитела по настоящему изобретению могут быть составлены с носителями, которые будут защищать антитело от быстрого высвобождения, типа состава с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать желатин, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды,

полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота, сами по себе или же с воском либо с другими материалами, хорошо известными в данной области. Способы получения таких составов в общем известны специалистам в данной области.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного соединения в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, напр., перечисленных выше, как потребуется, с последующей стерилизацией микрофильтрованием. Дисперсии обычно получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты, напр., из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций примеры способов получения включают вакуумную сушку и сублимационную сушку (лиофилизацию), которые дают порошок активного ингредиента плюс любых требуемых дополнительных ингредиентов из предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях могут варьироваться с тем, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения требуемого терапевтического ответа для данного пациента, композиции и способа введения без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от многих фармакокинетических факторов, включая активность конкретной композиции по настоящему изобретению либо её амида, способа введения, времени введения, скорости выведения данного соединения, продолжительности лечения, других лекарств, соединений и/или материалов, используемых в сочетании с данной композицией, возраста, пола, веса, заболевания, общего состояния здоровья, истории болезни данного пациента и тому подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Фармацевтические композиции можно вводить любым подходящим способом и по любой схеме. В одном воплощении фармацевтические композиции настоящего изобретения вводятся парентерально. При этом “вводится парентерально” означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включает эпидермальные, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, интракапсулярные, внутриглазные, внутрисердечные, интрадермальные, внутрибрюшинные, интратендонные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, интраспинальные, внутричерепные, внутригрудные, эпидуральные и интрастернальные инъекции и инфузии.

В одном воплощении такие фармацевтические композиции вводятся посредством внутривенной или подкожной инъекции или инфузии.

Применения

В одном аспекте изобретения предусмотрены антитела согласно любому из приведенных здесь воплощений или приведенные здесь фармацевтические композиции для применения в качестве лекарственных средств.

В другом аспекте изобретения предусмотрены антитела согласно любому из приведенных здесь воплощений или приведенные здесь фармацевтические композиции для применения при лечении заболеваний типа рака.

В следующем аспекте изобретения предусмотрен способ лечения заболеваний, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества антитела согласно любому из приведенных здесь воплощений или приведенной здесь фармацевтической композиции.

В частности, биспецифичные антитела по изобретению могут быть полезными в терапевтических условиях, при которых требуется специфическое наведение и опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих PD-L1, причем при некоторых таких показаниях и условиях они могут быть более эффективными по сравнению с обычными антителами против PD-L1.

Антитела по изобретению также имеют дополнительное применение в терапии и диагностике различных заболеваний, связанных с PD-L1. Например, антитела можно использовать для выявления *in vivo* или *in vitro* одной или нескольких из следующих биологических активностей: ингибирования роста и/или дифференцировки клеток, экспрессирующих PD-L1; уничтожения клеток, экспрессирующих PD-L1; опосредования фагоцитоза или ADCC клеток, экспрессирующих PD-L1, в присутствии эффекторных клеток человека; опосредования CDC клеток, экспрессирующих PD-L1, в присутствии комплемента; опосредования апоптоза клеток, экспрессирующих PD-L1; и/или индуцирования транслокации в липидные островки при связывании PD-L1.

В одном аспекте изобретения предусмотрены антитела согласно любому из приведенных здесь воплощений или приведенные здесь фармацевтические композиции для применения при лечении рака.

В другом аспекте изобретения предусмотрены антитела согласно любому из приведенных здесь воплощений или приведенные здесь фармацевтические композиции для применения при лечении раковых заболеваний, характеризующихся наличием солидных опухолей.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены антитела согласно любому из

приведенных здесь воплощений или приведенные здесь фармацевтические композиции для применения при лечении раковых заболеваний, выбранных из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака легких, колоректального рака, рака головы и шеи, рака желудка, рака молочной железы, рака почек, рака мочевого пузыря, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака печени, тимомы и карциномы тимуса, рака мозга, глиомы, аденокарциномы рака, рака щитовидной железы, различных раков кожи, саркомы, множественной миеломы, лейкемии, лимфомы, миелодиспластических синдромов, рака яичников, рака эндометрия, рака простаты, рака полового члена, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, карциномы клеток Меркеля и мезотелиомы.

В следующем аспекте изобретения предусмотрено применение антител согласно любому из приведенных здесь воплощений для изготовления лекарственных средств типа лекарственных средств для лечения рака, напр., раковых заболеваний, характеризующихся наличием солидных опухолей, или раковых заболеваний, выбранных из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака легких, рака толстой кишки и рака головы и шеи.

Настоящим изобретением также предусмотрен способ ингибирования роста и/или пролиферации одной или нескольких опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1, включающий введение нуждающемуся в этом лицу антитела по настоящему изобретению.

Настоящим изобретением также предусмотрен способ лечения рака, включающий:

- a) выбор субъекта, страдающего раком, включающим опухолевые клетки, экспрессирующие PD-L1, и
- b) введение субъекту антитела по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Схемы дозировки в вышеприведенных способах лечения и применения подбираются так, чтобы обеспечить оптимальный желательный ответ (напр., терапевтический ответ). Например, можно вводить одним болюсом, можно вводить несколько дробных доз по времени или же пропорционально снижать или повышать дозу в зависимости от требований терапевтической ситуации. Парентеральные композиции могут быть составлены в виде стандартной дозовой формы для легкости введения и однородности дозировки.

Эффективные дозировки и схемы дозировки антител зависят от заболевания или подлежащего лечению состояния и могут быть определены специалистами в данной области. Типичный неограничительный диапазон для терапевтически эффективного количества соединений настоящего изобретения составляет от 0,001 до 10 мг/кг, как-то от 0,001 до 5 мг/кг, к примеру, от 0,001 до 2 мг/кг, как-то от 0,001 до 1 мг/кг, например,

примерно 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 или 10 мг/кг. Другой типичный неограничительный диапазон для терапевтически эффективного количества антител настоящего изобретения составляет от 0,1 до 100 мг/кг, как-то от 0,1 до 50 мг/кг, к примеру, от 0,1 до 20 мг/кг, как-то от 0,1 до 10 мг/кг, например, примерно 0,5, 0,3, 1,0, 3, 5 или 8 мг/кг.

Врач или ветеринар с рядовой квалификацией в данной области может легко определить и назначить эффективное количество требуемой фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать дозировку антитела, используемого в фармацевтической композиции, с меньшего уровня, чем требуется для достижения требуемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку до тех пор, пока не будет достигнут требуемый эффект. В общем, подходящей суточной дозой антител настоящего изобретения будет такое количество соединения, которое составляет наименьшую дозу, эффективную для получения терапевтического эффекта. Введение может осуществляться, напр., парентерально, как-то внутривенно, внутримышечно или подкожно. В одном воплощении антитела можно вводить вливанием по еженедельной схеме в пересчете на мг/м². Такие дозировки, к примеру, могут основываться на приведенных выше дозировках в мг/кг по следующему правилу: доза (мг/кг) \times 70:1,8. Такое введение может повторяться, напр., от 1 до 8 раз, как-то от 3 до 5 раз. Введение может проводиться путем непрерывной инфузии на протяжении от 2 до 24 часов, как-то от 2 до 12 часов. В одном воплощении антитела можно вводить путем медленного непрерывного вливания на протяжении длительного времени типа более 24 часов, чтобы уменьшить токсические побочные эффекты.

В одном воплощении антитела можно вводить по еженедельной схеме в пересчете на фиксированную дозу вплоть до 8 раз, как-то от 4 до 6 раз при введении 1 раз в неделю. Такой режим можно повторять один или несколько раз по мере необходимости, к примеру, через 6 месяцев или 12 месяцев. Такие фиксированные дозировки, к примеру, могут основываться на приведенных выше дозировках в мг/кг, с оценкой массы тела 70 кг. Дозировки можно определять или подбирать путем измерения количества антител настоящего изобретения в крови после введения, например, путем отбора биологических образцов и использования антиидиотипических антител, направленных на антигенсвязывающую область антител настоящего изобретения, связывающих антиген PD-L1.

В одном воплощении антитела можно вводить в качестве поддерживающей терапии, как-то, напр., один раз в неделю на протяжении 6 месяцев или больше.

Антитела также можно вводить профилактически для снижения риска возникновения рака, задержки начала возникновения события при прогрессировании рака

и/или снижения риска рецидива, если рак находится в стадии ремиссии.

Антитела по изобретению также можно вводить при комбинированной терапии, то есть в сочетании с другими терапевтическими средствами, относящимися к заболеванию или подлежащему лечению состоянию. Соответственно, в одном воплощении содержащее антитело лекарственное средство назначается в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами типа цитотоксических, химиотерапевтических или антиангиогенных средств.

В следующем аспекте изобретения предусмотрены антиидиотипические антитела, которые связываются с участком связывания PD-L1, как определено в любом из приведенных здесь воплощений.

Дополнительные пункты настоящего описания

1. Антитело, содержащее антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем антитело ингибирует связывание PD-L1 человека с PD-1 человека и

(i) конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15 [511], но не конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22 [547], или

(ii) конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22 [547], но не конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15 [511].

2. Антитело по п. 1, при этом данное антитело конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5 [338].

3. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом связывание данного антитела с PD-L1 человека не смещается антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:53, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:57 [476].

4. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом связывание данного антитела с PD-L1 человека не блокируется при связывании антитела, содержащего последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:106, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:110 [625].

5. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом связывание данного антитела с PD-L1 человека блокируется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO: 18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 22 [547].

6. Антитело по п. 1, при этом данное антитело:

(i) способно связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5 [338], или

(ii) способно связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15 [511], или

(iii) способно связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22 [547].

7. Антитело по любому из пп. 1-4 и 6, при этом связывание антитела с мутантным PD-L1, в котором один или несколько аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям 113 (R113), 123 (Y123) и 125 (R125) в SEQ ID NO: 94, заменены на аланин, снижается по сравнению со связыванием с PD-L1 дикого типа, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94; причем снижение связывания определяется как кратность изменения в связывании данного антитела, которая меньше средней кратности изменений в связывании по всем аланиновым мутантам $- 1,5 \times SD$, где SD означает стандартное отклонение по всем рассчитанным изменениям для связывания антитела с мутантным PD-L1, а кратность изменений в связывании рассчитывается, как описано в Примере 13 [338].

8. Антитело по любому из пп. 1-2 и 6, при этом данное антитело связывается с эпитопом на PD-L1 (SEQ ID NO: 94), причем данный эпитоп содержит аминокислотный остаток в положении 113 (R113), аминокислотный остаток в положении 123 (Y123) и/или аминокислотный остаток в положении 125 (R125) SEQ ID NO: 94.

9. Антитело по любому из пп. 1, 3, 4 и 6, при этом связывание антитела с мутантным PD-L1, в котором один или несколько аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям 19 (F19), 42 (F42), 45 (E45), 46 (K46), 94 (L94) и 116 (I116) в SEQ ID NO: 94, заменены на аланин, снижается по сравнению с PD-L1 дикого типа, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94; причем снижение связывания определяется как кратность изменения в связывании данного антитела, которая меньше средней кратности изменений в связывании по всем

аланиновым мутантам – $1,5 \times SD$, где SD означает стандартное отклонение по всем рассчитанным изменениям для связывания антитела с мутантным PD-L1, а кратность изменений в связывании рассчитывается, как описано в Примере 13 [511].

10. Антитело по любому из пп. 1, 3, 4 и 6, при этом данное антитело связывается с эпитопом на PD-L1 (SEQ ID NO: 94), причем данный эпитоп содержит аминокислотный остаток в положении 45 (E45), аминокислотный остаток в положении 46 (K46) и/или аминокислотный остаток в положении 94 (L94) SEQ ID NO: 94.

11. Антитело по любому из пп. 1, 5 и 6, при этом связывание антитела с мутантным PD-L1, в котором один или несколько аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям 58 (E58) и 113 (R113) в SEQ ID NO: 94, заменены на аланин, снижается по сравнению с PD-L1 дикого типа, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94; причем снижение связывания определяется как кратность изменения в связывании данного антитела, которая меньше средней кратности изменений в связывании по всем аланиновым мутантам – $1,5 \times SD$, где SD означает стандартное отклонение по всем рассчитанным изменениям для связывания антитела с мутантным PD-L1, а кратность изменений в связывании рассчитывается, как описано в Примере 13 [547].

12. Антитело по любому из пп. 1, 5 и 6, при этом данное антитело связывается с эпитопом на PD-L1 (SEQ ID NO: 94), причем данный эпитоп содержит аминокислотный остаток в положении 58 (E58) и/или аминокислотный остаток в положении 113 (R113) SEQ ID NO: 94.

13. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем последовательность CDR3 V_H выбрана из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 21.

14. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6, последовательность KAS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7, соответственно [338], или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности

CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 9, 10 и 11, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:16, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:17, соответственно [511], или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 19, 20 и 21, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:23, последовательность DDN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:24, соответственно [547].

15. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:18.

16. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:22.

17. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:5 [338], или

(ii) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:15 [511], или

(iii) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:22 [547].

18. Антитело по п. 17, при этом каждая из последовательностей V_H и V_L содержит три последовательности CDR: CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности: FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно, причем соответствующие совокупные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 из V_H по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичны по аминокислотной последовательности соответствующим совокупным каркасным последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 из данных последовательностей V_H , а последовательности CDR V_H не мутированы, при этом соответствующие совокупные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 из V_L по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичны по аминокислотной последовательности соответствующим совокупным каркасным последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 из данных последовательностей V_L , а последовательности CDR V_L не мутированы.

19. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом данное антитело способно индуцировать дозозависимый лизис эпителиальных клеток аденокарциномы типа MDA-MB-231 посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

20. Антитело по п. 19, при этом данное антитело способно уменьшить количество клеток в культуре данных эпителиальных клеток по меньшей мере на 5%, как-то по меньшей мере на 6%, 7%, 8%, 9% или по меньшей мере на 10% в результате лизиса клеток.

21. Антитело по п. 19 или 20, при этом ADCC определяется *in vitro* по высвобождению ^{51}Cr типа методики, приведенной в примере 14.

22. Антитело по любому из пп. 19-20, при этом ADCC определяется *in vitro* путем инкубации эпителиальных клеток с композицией, содержащей антитело и эффекторные клетки типа мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), в течение 4 часов при 37°C, 5% CO_2 , при этом содержание антител в композиции находится в пределах 0,1-1 мкг/мл, а соотношение эффекторных клеток к эпителиальным клеткам составляет 100:1.

23. Антитело по п. 19 или 20, при этом лизис эпителиальных клеток определяется *in vitro* методом анализа репортера-люциферазы в качестве показателя ADCC типа

люминесцентного биоанализа репортера ADCC, изложенного в примере 14.

24. Антитело по п. 23, при этом ADCC определяется *in vitro* путем:

(i) контактирования культуры эпителиальных клеток с композицией, содержащей антитело и Т-клетки Jurkat человека, стабильно экспрессирующие FcγRIIIa (CD16) и люциферазу светлячка (эффекторные клетки), при соотношении эффекторные клетки:эпителиальные клетки 1:1,

(ii) доведения культуры эпителиальных клеток и эффекторных клеток до комнатной температуры в течение 15 минут,

(iii) инкубирования культуры эпителиальных клеток и эффекторных клеток с субстратом люциферазы,

(iv) определения продукции люциферазы в данной культуре клеток;

при этом содержание антител в композиции находится в пределах 0,5-250 нг/мл, а соотношение эффекторных клеток к эпителиальным клеткам составляет 1:1.

25. Антитело по любому из пп. 19, 20, 23 и 24, при этом ADCC эпителиальных клеток определяется методом анализа репортера-люциферазы типа репортерного анализа по п. 23 или 24, при этом ADCC, которая наблюдается после инкубации культуры эпителиальных клеток с исследуемой композицией, содержащей данное антитело, по меньшей мере в 1,5 раза больше той ADCC, которая наблюдается после инкубации культуры эпителиальных клеток с композицией, содержащей контрольное антитело; ADCC определяется в относительных единицах люминесценции (RLU), причем концентрация антител в исследуемой композиции и в композиции, содержащей контрольное антитело, одинакова и находится в пределах от 20 до 250 нг/мл, а контрольное антитело выбрано из:

a) антитела, содержащего последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO: 74, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 78; и

b) антитела, содержащего последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO: 81, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 85.

26. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5 [338], или

(ii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15 [511], или

(iii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22 [547].

27. Антитело, содержащее антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем данное антитело включает:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 33, 34 и 35, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:37, последовательность KAS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:38, соответственно [321], или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 47, 48 и 49, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:51, последовательность DVI и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:52, соответственно [421], или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 54, 55 и 56, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:58, последовательность RDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:59, соответственно [476], или

(iv) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 61, 62 и 63, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:65, последовательность DDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:66, соответственно [516], или

(v) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 107, 108 и 109, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:111, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:113, соответственно [625], или

(vi) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 68, 69 и 70, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:72, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:73, соответственно [632].

28. Антитело по п. 27, при этом данное антитело включает:

(i) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:32, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:36 [321], или

(ii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:46, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:50 [421], или

(iii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:53, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:57 [476], или

(iv) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:60, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:64 [516], или

(v) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:106, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:110 [625], или

(vi) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:67, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:71 [632].

29. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом данное антитело является моновалентным.

30. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом данное антитело представляет собой бивалентное антитело, содержащее два антигенсвязывающих участка, способных связываться с PD-L1 человека, при этом данные два антигенсвязывающих участка имеют идентичные последовательности варибельной области.

31. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом данное антитело представляет собой бивалентное биспецифичное антитело, которое в дополнение к первому антигенсвязывающему участку, способному связываться с PD-L1 человека, содержит второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем вторым антигеном не является CD3ε человека.

32. Биспецифичное антитело, содержащее антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека, причем антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, имеет признаки, приведенные в любом из предыдущих пунктов.

33. Биспецифичное антитело по п. 32, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, включает варибельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 28, соответственно, и варибельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно.

34. Биспецифичное антитело по п. 32 или 33, включающее:

(i) антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включающий переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6, последовательность KAS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7 [338], соответственно, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3 ϵ человека, включающий переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 28, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(ii) антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включающий переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 9, 10 и 11, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:16, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:17 [338], соответственно, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3 ϵ человека, включающий переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 28, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(iii) антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включающий переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 19, 20 и 21, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:23, последовательность DDN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:24 [547], соответственно, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3 ϵ человека, включающий переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 28, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и

последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно.

35. Биспецифичное антитело по любому из пп. 32-34, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, включает последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:25, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29.

36. Биспецифичное антитело по п. 32, при этом данное биспецифичное антитело:

(i) имеет более низкое сродство связывания с CD3ε человека по сравнению с антителом, содержащим антигенсвязывающий участок, включающий последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO: 25, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 29, причем предпочтительно данное сродство по меньшей мере в 2 раза ниже, напр., по меньшей мере в 5 раз ниже, как-то по меньшей мере в 10 раз ниже, напр., по меньшей мере в 25 раз ниже, напр., по меньшей мере в 50 раз ниже, и

(ii) способно опосредовать зависимую от концентрации цитотоксичность для клеток MDA-MB-231, клеток PC-3 и/или клеток HELA при использовании PBMC или очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток, напр., при таком анализе, как описано здесь в Примере 11.

37. Биспецифичное антитело по п. 36, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, включает:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 99, 27 и 28, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 100, 27 и 28, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 101, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(iv) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 102, соответственно,

и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(v) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 103, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(vi) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 104, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(vii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 105, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно.

38. Биспецифичное антитело по п. 36 или 37, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, включает:

(i) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:39, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(ii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:40, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(iii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:41, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(iv) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:42, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(v) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:43, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(vi) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:44, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(vii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:45, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29.

39. Мультиспецифичное антитело, содержащее первый антигенсвязывающий

участок, способный связываться с PD-L1 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, имеет признаки, приведенные в любом из пунктов 1-31.

40. Мультиспецифичное антитело по п. 39, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем последовательность CDR3 V_H выбрана из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 4 [338], SEQ ID NO: 11 [511] и SEQ ID NO: 21 [547].

41. Мультиспецифичное антитело по п. 40, при этом первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6, последовательность KAS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7, соответственно [338], или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 9, 10 и 11, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:16, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:17, соответственно [511], или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 19, 20 и 21, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:23, последовательность DDN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:24, соответственно [547].

42. Мультиспецифичное антитело по п. 40 или 41, при этом первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:1 [338], SEQ ID NO:8 [511] и SEQ ID NO:18 [547].

43. Мультиспецифичное антитело по любому из пп. 40-42, при этом первый

антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:5 [338], SEQ ID NO:15 [511] и SEQ ID NO:22 [547].

44. Мультиспецифичное антитело по любому из пп. 40-43, при этом первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:5 [338], или

(ii) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:15 [511], или

(iii) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:22 [547].

45. Мультиспецифичное антитело по любому из пп. 40-44, при этом каждая из последовательностей V_H и V_L содержит три последовательности CDR: CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности: FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно, причем соответствующие совокупные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 из V_H по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичны по аминокислотной последовательности соответствующим совокупным каркасным последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 из данных последовательностей V_H , а последовательности CDR V_H не мутированы, при этом соответствующие совокупные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 из V_L по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей

мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичны по аминокислотной последовательности соответствующим совокупным каркасным последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 из данных последовательностей V_L , а последовательности CDR V_L не мутированы.

46. Мультиспецифичное антитело по любому из пп. 40-45, при этом первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5 [338], или

(ii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15 [511], или

(iii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22 [547].

47. Мультиспецифичное антитело, содержащее первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем данное антитело:

(i) конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15, но не конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22, или

(ii) конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22, но не конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15.

48. Мультиспецифичное антитело по п. 47, при этом данное антитело конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5.

49. Мультиспецифичное антитело, содержащее первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем связывание данного антитела с PD-L1 человека не вытесняется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:53, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:57.

50. Мультиспецифичное антитело по п. 49, при этом антитело ингибирует связывание PD-L1 человека с PD-1 человека.

51. Мультиспецифичное антитело по п. 49 или 50, при этом антитело конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22.

52. Мультиспецифичное антитело по любому из пп. 49-51, при этом связывание данного антитела с PD-L1 человека блокируется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 22.

53. Мультиспецифичное антитело, содержащее первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем первый антигенсвязывающий участок:

(i) способен связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5 [338], или

(ii) способен связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15 [511], или

(iii) способен связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22 [547].

54. Мультиспецифичное антитело по любому из пп. 40-53, при этом антитело является биспецифичным.

55. Мультиспецифичное антитело по п. 54, при этом антитело является бивалентным.

56. Мультиспецифичное антитело по любому из пп. 40-55, при этом антитело способно связываться со вторым антигеном, причем второй антиген не представлен CD3ε человека.

57. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело представляет собой полноразмерное антитело.

58. Антитело по п. 57, при этом антитело представляет собой полноразмерное антитело IgG1.

59. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело представляет собой фрагмент антитела.

60. Антитело по любому из пп. 32-59, при этом антитело содержит две половинки молекулы, каждая из которых содержит антигенсвязывающий участок, причем:

(i) половинка молекулы, содержащая антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, является химерной, и/или

(ii) половинка молекулы, содержащая антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека, если она присутствует, является химерной.

61. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом:

(i) антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, является гуманизованным, и/или

(ii) антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека, если он присутствует, является гуманизованным.

62. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом:

(i) антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, является человеческим, и/или

(ii) антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека, если он присутствует, является человеческим.

63. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом каждый антигенсвязывающий участок включает переменную область тяжелой цепи (V_H) и переменную область легкой цепи (V_L), причем каждая из данных переменных областей содержит три последовательности CDR: CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности: FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно.

64. Антитело по п. 63, при этом антитело содержит две константные области тяжелой цепи (C_H) и две константные области легкой цепи (C_L).

65. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, причем каждая из данных первой и второй тяжелых цепей включает по меньшей мере шарнирный участок и участки C_{H2} и C_{H3} , причем у первой тяжелой цепи была заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 (по нумерации EU), и у второй тяжелой цепи была заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 (по нумерации EU), при этом у данных первой и второй тяжелой цепи замены находятся не в одинаковых положениях.

66. Антитело по п. 65, при этом (i) аминокислота в положении, соответствующем F405 (по нумерации EU), представлена L в данной первой тяжелой цепи, а аминокислота в

положении, соответствующем K409 (по нумерации EU), представлена R в данной второй тяжелой цепи, или же (ii) аминокислота в положении, соответствующем K409 (по нумерации EU), представлена R в данной первой тяжелой цепи, а аминокислота в положении, соответствующем F405 (по нумерации EU), представлена L в данной второй тяжелой цепи.

67. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом данное антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, причем одна или обе тяжелые цепи модифицированы с тем, чтобы антитело индуцировало Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с таким антителом, которое идентично за исключением того, что содержит немодифицированную первую и вторую тяжелую цепь.

68. Антитело по п. 67, при этом Fc-опосредованная эффекторная функция измеряется по опосредованной Fc экспрессии CD69, по связыванию с Fc γ -рецепторами, по связыванию с C1q или по индукции Fc-опосредованного перекрестного сшивания FcR.

69. Антитело по п. 67 или 68, при этом константные последовательности тяжелой и легкой цепи были модифицированы с тем, чтобы у данного антитела Fc-опосредованная экспрессия CD69 снижалась по меньшей мере на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90%, на 99% или 100% по сравнению с антителом дикого типа, при этом такая Fc-опосредованная экспрессия CD69 определяется при функциональном анализе на основе РВМС.

70. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом данное антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, причем по меньшей мере в одной из данных первой и второй тяжелых цепей одна или несколько аминокислот в положениях, соответствующих положениям L234, L235, D265, N297 и P331 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, не представлены L, L, D, N и P, соответственно.

71. Антитело по п. 70, при этом положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, представлены F и E, соответственно, в данных первой и второй тяжелых цепях.

72. Антитело по п. 71, при этом антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее первую и вторую тяжелую цепь, причем положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, и в первой тяжелой цепи, и во второй тяжелой цепи представлены F и E, соответственно, при этом (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, в первой тяжелой цепи представлено L, а положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, во второй тяжелой цепи представлено R, или же (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, в первой тяжелой цепи представлено R, а

положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, во второй тяжелой цепи представлено L.

73. Антитело по п. 70, при этом положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, представлены F, E и A, соответственно, в данных первой и второй тяжелых цепях.

74. Антитело по п. 73, при этом антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее первую и вторую тяжелую цепь, причем положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, и в первой тяжелой цепи, и во второй тяжелой цепи представлены F и E, соответственно, при этом (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, в первой тяжелой цепи представлено L, а положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, во второй тяжелой цепи представлено R, или же (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, в первой тяжелой цепи представлено R, а положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, во второй тяжелой цепи представлено L.

75. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело не связывается с PD-L2 человека.

76. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело связывается с PD-L1 человека со значением K_D 10^{-8} М или меньше, как-то 10^{-9} М или меньше, напр., 10^{-10} М или меньше при таком определении, как описано здесь в Примере 8.

77. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело опосредует зависимость от концентрации цитотоксичность для клеток MDA-MB-231, клеток PC-3 и/или клеток HELA при использовании очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток при таком анализе, как описано здесь в Примере 11.

78. Конструкция из нуклеиновой кислоты, включающая:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, содержащего антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, как определено в любом из пп. 1-31, и/или

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, содержащего антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, как определено в любом из пп. 1-31.

79. Конструкция из нуклеиновой кислоты по п. 78, дополнительно включающая:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, содержащего антигенсвязывающий участок, способный

связываться с CD3ε человека, как определено в любом из пп. 33-38, и/или

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, содержащего антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, как определено в любом из пп. 33-38.

80. Экспрессирующий вектор, содержащий конструкцию из нуклеиновой кислоты по п. 78 или 79.

81. Клетка-хозяин, содержащая конструкцию из нуклеиновой кислоты по п. 78 или 79 либо экспрессирующий вектор по п. 80.

82. Клетка-хозяин по п. 81, которые представляет собой клетки млекопитающих типа клеток яичников китайского хомяка.

83. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-77 и фармацевтически приемлемый носитель.

84. Антитело по любому из пп. 1-77 или фармацевтическая композиция по п. 83 для применения в качестве лекарственного средства.

85. Антитело по любому из пп. 1-80 или фармацевтическая композиция по п. 70 для применения при лечении рака.

86. Антитело по любому из пп. 1-77 или фармацевтическая композиция по п. 70 для применения при лечении раковых заболеваний, характеризующихся наличием солидных опухолей.

87. Антитело по любому из пп. 1-78 или фармацевтическая композиция по п. 70 для применения при лечении ракового заболевания, выбранного из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака легких, рака толстой кишки и рака головы и шеи.

88. Способ лечения заболеваний, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту антитела по любому из пп. 1-75 или фармацевтической композиции по п. 83.

89. Применение антитела по любому из пп. 1-77 для изготовления лекарственного средства типа лекарственного средства для лечения рака, напр., ракового заболевания, характеризующегося наличием солидных опухолей, или ракового заболевания, выбранного из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака легких, рака толстой кишки и рака головы и шеи.

90. Способ или применение по любому из пп. 83-89, при этом способ или применение включает комбинирование с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами типа химиотерапевтических средств.

91. Способ получения антитела по любому из пп. 1-77, включающий стадии:

а) культивирования клеток-хозяев, вырабатывающих первое антитело, содержащее антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, как

определено в любом из пп. 1-13, и очистка данного первого антитела из культуры;

b) культивирования клеток-хозяев, вырабатывающих второе антитело, содержащее антигенсвязывающий участок, способный связываться с другим эпитопом PD-L1 или с другим антигеном, напр., участок связывания CD3ε человека, как определено в любом из пп. 14-19, и очистка данного второго антитела из культуры;

c) инкубации данного первого антитела вместе со вторым антителом в восстановительных условиях, достаточных для того, чтобы цистеины в шарнирной области подверглись изомеризации в дисульфидную связь; и

d) получения данного биспецифического антитела.

92. Антиидиотипическое антитело, которое связывается с антигенсвязывающим участком, способным связываться с PD-L1 человека, как определено в любом из пп. 1-77.

Далее настоящее изобретение раскрывается на следующих примерах, которые не следует воспринимать как ограничивающие объем изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение антител к PD-L1

Иммунизация животных OmniRat и получение гибридомы

Иммунизацию и получение гибридомы проводили на фирме Aldevron GmbH (Freiburg, Германия). кДНК, кодирующую аминокислоты 19-238 PD-L1 человека, клонировали в экспрессирующие плазмиды фирмы Aldevron. Группы животных OmniRat (трансгенных крыс, экспрессирующих разнообразный репертуар антител с полностью человеческими идиотипами; Ligand Pharmaceuticals Inc., San Diego, США) иммунизировали путем внутрикожного введения покрытых ДНК частиц золота с помощью ручного устройства для бомбардировки частицами (“генной пушки”). Экспрессию на клеточной поверхности кратковременно трансфицированных клеток НЕК проверяли с помощью антитела против PD-L1 на основе MPDL3280A фирмы Genentech. Собирали образцы сыворотки после серии иммунизаций и тестировали методом проточной цитометрии на клетках НЕК, временно трансфицированных вышеупомянутыми экспрессирующими плазмидами. Выделяли вырабатывающие антитела клетки и сливали с клетками миеломы мыши (Ag8) по стандартным методикам. Идентифицировали гибридомы, вырабатывающие антитела, специфичные к PD-L1, при скрининге таким же методом, как описано выше. Получали клеточные осадки положительных клеток гибридом с помощью защищающего РНК реагента (RNAlater, ThermoFisher Scientific, кат. № AM7020), а затем обрабатывали их для секвенирования переменных доменов антител.

Анализ последовательностей переменных доменов антител к PD-L1 и клонирование в экспрессирующих векторах

Выделяли тотальную РНК из $0,2-5 \times 10^6$ клеток гибридомы и получали из неё 5'-RACE-комплементарную ДНК (кДНК) с помощью набора для амплификации кДНК Smart RACE (Clontech) в соответствии с инструкциями производителя. Кодированные области V_H и V_L амплифицировали методом ПЦР и клонировали в одной рамке считывания прямо в экспрессирующие векторы pOMTG1f-FEAR-LIC (IgG1 человека) и pEFC33D-Карра (каппа человека) или pOMTL-LIC (лямбда человека) методом независимого от клонирования лигирования (Aslanidis C. and PJ de Jong, *Nucleic Acids Res* 1990, 18(20): 6069-74). В этих плаزمидях последовательности антител экспрессируются при помощи промотора CMV. Для каждого антитела секвенировали 8 клонов V_L и 8 клонов V_H . Последовательности CDR определяли согласно определениям IMGT [Lefranc MP. et al., *Nucleic Acids Research*, 27, 209-212, 1999; Brochet X., *Nucl. Acids Res.* 36, W503-508 (2008)]. Отбирали клоны с правильной открытой рамкой считывания (ORF) для дальнейшего изучения и экспрессии. Продукты LEE PCR от всех комбинаций тяжелых цепей и легких цепей, которые были обнаружены в каждой культуре гибридом, подвергали краткосрочной совместной экспрессии в клетках Expi293F с помощью ExpiFectamine. Для каждой гибридомы отбирали пару HC/LC, проявляющую наилучшее связывание при скрининге методом гомогенной дозы-ответа, в качестве ведущего кандидата.

Три антитела против PD-L1 под номерами 338, 511 и 547, соответственно, были отобраны для дальнейших экспериментов. Последовательности их переменных областей представлены здесь в Перечне последовательностей.

Для антитела IgG1-PDL1-511-FEAR создавали вариант с точечной мутацией в переменных доменах для того, чтобы удалить остаток цистеина, который потенциально мог бы образовывать нежелательные дисульфидные мостики: IgG1-PDL1-511-FEAR-LC33S. Этот мутант получали путем синтеза генов (Geneart).

LEE PCR

Линейные элементы экспрессии (LEE) получали путем амплификации фрагмента, содержащего элементы, содержащие промотор CMV, кодирующие области HC или LC и сигнал поли-А из экспрессирующих плазмид. Для этого эти участки амплифицировали с помощью ДНК-полимеразы Accuprime Taq (Life Technologies) и праймеров CMVPf(BsaI)2 и TkrA(BsaI)r, выполняя 35 циклов по 45 секунд при 94°C, 30 секунд при 55°C и 2 (LC) или 3 (HC) минуты при 68°C, используя в качестве ДНК-матрицы разбавленный в 50 раз материал препаратов плазмид типа miniprep.

Краткосрочная экспрессия LEE-фрагментов в клетках Expi293F

Для экспрессии LEE антител смешивали 1,11 мкл продуктов реакции ПЦР для LEE НС и 1,11 мкл продуктов реакции ПЦР для LC и трансфецировали этой смесью клетки Expi293F в общем объеме 125 мкл с помощью ExpiFectamine 293 в качестве реагента для трансфекции согласно инструкциям производителя (Thermo Fisher Scientific, США), используя 96-луночные планшеты в качестве сосуда.

Экспрессия антител

Антитела экспрессировали в виде IgG1-каппа (для 338) или IgG1-лямбда (для 511 и 547). Смеси плазмидной ДНК, кодирующие тяжелые и легкие цепи антител, подвергали краткосрочной экспрессии на платформе для экспрессии Expi293F (Thermo Fisher Scientific, США), в основном как описано производителем.

Гомогенный анализ связывания

Антитела тестировали на связывание гомогенным методом скрининга доза-ответ, используя клетки CHO, трансфецированные PDL1, PDL1mm или PDL1Mf (также см. пример 2). В качестве отрицательного контроля использовали нетрансфецированные клетки CHO.

Клетки ($2,5 \times 10^5$ клеток/мл) смешивали с козьим антителом против IgG человека с Alexa 647, специфичным для Fc γ -фрагмента (0,2 мкг/мл; Jackson ImmunoResearch Laboratories, 109-605-098). Готовили серийные разведения исследуемых и контрольных антител (от 0,001 до 3 мкг/мл при 2-кратных разведениях) и по 2 мкл разведений антител добавляли к 5 мкл смеси клеток с конъюгатом в 1536-луночных планшетах (Greiner, 789866). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 9 часов, после чего определяли интенсивность флуоресценции на лазерном сканирующем цитометре ImageXpress Velos (Molecular Devices).

Очистка антител

Супернатанты культур фильтровали через заглушенные фильтры на 0,2 мкм, наносили на колонки MabSelect SuRe 5 мл (GE Healthcare) и элюировали 0,1 М цитратом натрия-NaOH, pH 3. Элюат сразу же нейтрализовали 2М трис-HCl, pH 9 и диализовали в течение ночи до 8,7 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ NaH₂PO₄, 140,3 мМ NaCl, pH 7,4 (B.Braun или GE Healthcare). В качестве альтернативы после очистки элюат наносили на колонку для обессоливания HiPrep и антитело переводили в буфер 8,7 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ NaH₂PO₄, 140,3 мМ NaCl, pH 7,4 (B.Braun или GE Healthcare). После диализа или замены буфера образцы стерилизовали фильтрованием через заглушенные фильтры на 0,2 мкм. Чистоту определяли методом CE-SDS при помощи LabChip GXII (Caliper Life Sciences, MA), а концентрацию IgG измеряли на спектрофотометре Nanodrop ND-1000 (Isogen Life Science, Maarssen, Нидерланды). Очищенные антитела хранили при 4°C.

Пример 2. Получение материала для скрининга

Экспрессирующие конструкции для PD-L1

Разработали следующие оптимизированные по кодонам конструкции для экспрессии полноразмерного PD-L1: PD-L1 человека (*Homo sapiens*) (№ доступа в Genbank NP_054862), PD-L1 макаки-крабоеда (*Macaca fascicularis*) (№ доступа в Genbank XP_005581836), PD-L1 мыши (*Mus musculus*) (№ доступа в Genbank NP_068693).

Кроме того, разработали следующие оптимизированные по кодонам конструкции для ECD PD-L1: внеклеточный домен (ECD) PD-L1 человека (а.к. 1-238) с С-концевой His-меткой и С-меткой (PDLoneECDHisCtag).

Конструкции содержали подходящие рестрикционные сайты для клонирования и оптимальную последовательность Kozak (GCCGCCACC) [Kozak et al. (1999) Gene 234: 187-208]. Конструкции клонировали в экспрессирующем векторе рМА для млекопитающих (Geneart).

Экспрессирующая конструкция для PD-L2

Также разработали следующую оптимизированную по кодомам конструкцию для экспрессии полноразмерного PD-L2: PD-L2 человека (*Homo sapiens*) (№ доступа в Genbank NP_079515).

Экспрессия в клетках CHO-S

Клетки CHO-S подвергали краткосрочной трансфекции вектором рМА, содержащим кодирующую последовательность для полного PD-L1 человека, макаки-крабоеда и мыши, соответственно.

Очистка PD-L1 с His-меткой

Экспрессировали PDLoneECDHisCtag в клетках HEK-293F. His-метка позволяет проводить очистку методом аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом. При этом хелатор, фиксированный на хроматографической смоле, заряжается катионами Co^{2+} . Супернатанты, содержащие белок с His-меткой, инкубировали со смолой в порционном режиме (т.е. в растворе). Белок с His-меткой прочно связывается с гранулами смолы, тогда как другие белки, присутствующие в супернатанте культуры, не связываются или слабо связываются по сравнению с белками, содержащими His-метку. После инкубации шарики извлекали из супернатанта и упаковывали в колонку. Колонку промывали для удаления слабосвязанных белков. Затем прочно связанные белки с His-меткой элюировали буфером, содержащим имидазол, который конкурирует за связывание His с Co^{2+} . Элюент удаляли из белка путем замены буфера на колонке для обессоливания.

Пример 3. Гуманизованное антитело к CD3 для получения биспецифичных антител к CD3×PDL1

Получение гуманизованного антитела IgG1-huCD3-H1L1 описано в примере 1 из WO 2015/001085. Антитело huCD3-H1L1-FEAL является его вариантом, содержащим следующие замены: L234F, L235E, D265A и F405L, как описано выше.

Пример 4. Получение биспецифичных антител методом индуцированного 2-МЕА обмена Fab-плеча

Биспецифичные антитела типа IgG1 получали путем обмена Fab-плеча в контролируемых восстановительных условиях. Основой этого метода является использование комплементарных доменов C_{H3} , которые способствуют образованию гетеродимеров при определенных условиях анализа, как описано в WO 2011/131746. В соответствующие антитела вводили мутации F405L и K409R (по нумерации EU) для получения пар антител с комплементарными доменами C_{H3} .

Для получения биспецифичных антител два исходных комплементарных антитела, каждое в конечной концентрации 0,5 мг/мл, инкубировали с 75 мМ 2-меркаптоэтиламин-HCl (2-МЕА) в общем объеме 100 мкл ТЕ при 31°C в течение 5 ч. Реакцию восстановления останавливали, удаляя восстановитель 2-МЕА на центрифужных колонках (центрифужные фильтры Microcon, 30k, Millipore) по методике производителя.

Следующие антитела использовали в примерах.

Антитела к CD3

IgG1-huCD3-H1L1-FEAL (содержит последовательности V_H и V_L , приведенные в SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:29, соответственно).

bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×b12-FEAR – биспецифичное антитело, в котором в качестве второго плеча используется антитело b12, которое представляет собой антитело, специфичное к gp120 (Barbas CF., J Mol Biol. 1993 Apr 5, 230(3):812-23).

Антитела к PDL1 и биспецифичные антитела к CD3×PDL1

IgG1-338-FEAR (содержит последовательности V_H и V_L , приведенные в SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:5, соответственно).

IgG1-338-F405L.

bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR.

bsIgG1-b12-FEAL×338-FEAR.

IgG1-511-LC33S-FEAR (содержит последовательности V_H и V_L , приведенные в SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:15, соответственно).

IgG1-511-F405L-LC33S.

bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR.

bsIgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR.

IgG1-547-FEAR (содержит последовательности V_H и V_L , приведенные в SEQ ID

NO:18 и SEQ ID NO:22, соответственно).

IgG1-547-F405L.

bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR.

bsIgG1-b12-FEAL×547-FEAR.

IgG1-321-FEAR (содержит последовательности V_H и V_L , приведенные в SEQ ID NO:32 и SEQ ID NO:36, соответственно).

IgG1-421-LC91S-FEAR (содержит последовательности V_H и V_L , приведенные в SEQ ID NO:46 и SEQ ID NO:50, соответственно).

IgG1-476-N101Q-LC33S-FEAR (содержит последовательности V_H и V_L , приведенные в SEQ ID NO:53 и SEQ ID NO:57, соответственно).

IgG1-625-FEAR (содержит последовательности V_H и V_L , приведенные в SEQ ID NO:106 и SEQ ID NO:110, соответственно).

IgG1-632-FEAR (содержит последовательности V_H и V_L , приведенные в SEQ ID NO:67 и SEQ ID NO:71, соответственно).

IgG1-516-FEAR (содержит последовательности V_H и V_L , приведенные в SEQ ID NO:60 и SEQ ID NO:64, соответственно).

IgG1-MPDL3280A-FEAR (на основе антитела к PDL1 MPDL3280A фирмы Genentech; содержит последовательности V_H и V_L , приведенные в SEQ ID NO:74 и SEQ ID NO:78, соответственно).

IgG1-MPDL3280A-K409R.

IgG1-MEDI4736-FEAR (на основе антитела к PDL1 MEDI4736 фирмы MedImmune; содержит последовательности V_H и V_L , приведенные в SEQ ID NO: 81 и SEQ ID NO: 85, соответственно).

IgG1-MEDI4736-F405L.

Пример 5. Связывание антител к PD-L1 либо биспецифичных антител CD3×PD-L1 или b12×PD-L1 с опухолевыми клетками

Анализировали связывание антител к PD-L1 и биспецифичных антител CD3×PD-L1 и b12×PD-L1 с клетками раковых линий человека SK-MES-1 (плоскоклеточная карцинома легких; ATCC; кат. № HTB-58), MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы; ATCC; кат. № HTB-26), PC-3 (аденокарцинома простаты; ATCC; кат. № CRL-1435) и HELA (аденокарцинома шейки матки; ATCC; кат. № CCL-2) методом проточной цитометрии.

Клетки ($3-5 \times 10^4$ клеток на лунку) инкубировали в полистироловых 96-луночных круглодонных планшетах (Greiner Bio-one, кат. № 650101) с серийными разведениями антител (от 0,0001 до 10 мкг/мл при 5-кратных разведениях) в 50 мкл PBS/0,1% BSA/0,02% азида (окрашивающий буфер) при 4°C в течение 30 мин.

После отмывки дважды в окрашивающем буфере клетки инкубировали в 50 мкл вторичного антитела при 4°C в течение 30 мин. В качестве вторичного антитела во всех экспериментах использовали конъюгированный с R-фикоэритрином (PE) козий F(ab')₂ против IgG человека (кат. № 109-116-098, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA), разведенный 1:500 в окрашивающем буфере. Затем клетки дважды отмывали в окрашивающем буфере, ресуспендировали в 20 мкл окрашивающего буфера и анализировали на приборе iQue Screener (Intellicyt Corporation, США). Кривые связывания анализировали методом нелинейной регрессии (сигмоидальные кривые доза-эффект с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism V75.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, США).

Проводили количественную проточную цитометрию (QIFIKIT[®], Dako; кат. № K0078), как описано (Ponlace and Carayon, 1985, J. Immunol. Meth. 85:65-74), для количественной оценки экспрессии мишени на плазматической мембране клеток MDA-MB-231, PC-3 и HELA, а также для определения количества связавшихся молекул PDL1. Было установлено, что клеточные линии имеют следующую плотность антигена PD-L1 (ABC, способность к связыванию антител):

- SK-MES-1: прибл. 30 000 ABC на клетку,
- MDA-MB-231: прибл. 21 000 ABC на клетку,
- клетки PC-3: прибл. 6 000 ABC на клетку,
- клетки HELA: прибл. 2 000 ABC на клетку.

Связывание с клетками MDA-MB-231

Из фиг. 1 видно, что bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR (A), bsIgG1-b12-FEAL×338-FEAR (D), bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR (B) и bsIgG1-b12-FEAL×547-FEAR (E) проявляли зависимое от дозы связывание с клетками MDA-MB-231 с большим максимальным уровнем связывания, чем у моноспецифичных, бивалентных антител к PD-L1 IgG1-338-FEAR и IgG1-547-FEAR. Максимальное связывание у bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR (C) и bsIgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR (F) было ниже, чем у бивалентного моноспецифичного антитела к PD-L1 IgG1-511-LC33S-FEAR.

Связывание с клетками PC-3

Из фиг. 2 видно, что bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR (A), bsIgG1-b12-FEAL×338-FEAR (D), bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR (B) и bsIgG1-b12-FEAL×547-FEAR (E) проявляли зависимое от дозы связывание с клетками PC3. Максимальное связывание у bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR (C) и bsIgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR (F) было ниже, чем у бивалентного моноспецифичного антитела к PD-L1 IgG1-511-LC33S-FEAR.

Связывание с клетками HELA

Из фиг. 3 видно, что bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR (A) и bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR (B) проявляли зависимое от дозы связывание с клетками HELA. Максимальное связывание у моноспецифичных, двухвалентных антител к PD-L1 IgG1-338-FEAR и IgG1-547-FEAR было невозможно определить в используемом диапазоне концентраций. (C) bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR и IgG1-511-LC33S-FEAR не связывались с клетками HELA.

Связывание с клетками SK-MES-1

Из фиг. 4 видно, что bsIgG1-b12-FEAL×338-FEAR (A) и bsIgG1-b12-FEAL×547-FEAR (B) проявляли зависимое от дозы связывание с клетками SK-MES-1 с большим максимальным уровнем связывания, чем у моноспецифичных бивалентных антител к PD-L1 IgG1-338-FEAR и IgG1-547-FEAR. Максимальное связывание у bsIgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR (C) было ниже, чем у бивалентного моноспецифичного антитела к PD-L1 IgG1-511-LC33S-FEAR.

Пример 6. Связывание с PD-L2 человека

Чтобы показать специфическое связывание с PD-L1, но не с PD-L2 человека, определяли связывание bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR и IgG1-338-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR и IgG1-547-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR и IgG1-511-LC33S-FEAR с клетками CHO, экспрессирующими PD-L2 человека, методом проточной цитометрии таким же способом, как описано выше. В качестве положительного контроля использовали конъюгированное с PE антитело, специфичное к PD-L2 (Mylteni, клон M1H18; кат. № 130-098-651). Ни одно из исследуемых антител не связывалось с клетками CHO-PD-L2.

Пример 7. Связывание антител к PD-L1 либо биспецифичных антител CD3×PD-L1 или b12×PD-L1 с PD-L1 макаки-крабоведа

Определяли связывание с клетками CHO, экспрессирующими PD-L1 макаки-крабоведа, методом проточной цитометрии таким же способом, как описано выше. Из фиг. 5 видно, что bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR (A), bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR (B), bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR (C), b8G-FEAR (D), bsIgG1-b12-FEAL×547-FEAR (E) и bsIgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR (F) проявляли зависимое от дозы связывание с клетками CHO, экспрессирующими PD-L1 макаки-крабоведа, с большим максимальным уровнем связывания, чем у моноспецифичных, бивалентных антител к PD-L1 IgG1-338-FEAR, IgG1-547-FEAR и IgG1-511-LC33S-FEAR.

Пример 8. Определение сродства к PD-L1 человека и макаки-крабоведа методом интерферометрии в биослое

В первой серии экспериментов определяли сродство к рекомбинантному белку PD-L1 человека методом интерферометрии в биослое (BLI) на приборе Octet HTX (ForteBio). Биосенсоры захвата Fc против IgG человека (АНС) (ForteBio) нагружали антителами (1 мкг/мл) в течение 900 с. После базового уровня (100 с) определяли ассоциацию (1000 с) и диссоциацию (2000 с) PDLoneECDHisCtag в разбавителе для образцов (ForteBio) в диапазоне концентраций от 2,67 мкг/мл до 0,14 мкг/мл (от 100 нМ до 1,56 нМ) при 2-кратных разведениях. Эксперименты проводили со встряхиванием при 1000 об/мин при 30°C. Данные анализировали с помощью программы для анализа данных v9.0.0.12 (ForteBio) на модели 1:1 с полной глобальной аппроксимацией со временем ассоциации 1000 с и временем диссоциации 200 или 1000 с. Записи данных подвергали коррекции путем вычитания контрольного буфера, ось Y совмещали с последними 10 с базовой линии и применяли межшаговую коррекцию, а также фильтрацию Savitzky-Golay. Записи данных с ответом <0,05 нм исключали из анализа. По умолчанию использовали аппроксимацию по времени диссоциации в 1000 с. Для IgG1-511-FEAR-LC33S использовали время диссоциации 200 с, исходя из значения R^2 и визуального осмотра аппроксимации.

Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Сродство связывания моноспецифичных бивалентных антител к PD-L1 человека при определении методом интерферометрии в биослое

Антитело	Ассоциация: k_a (1/М·сек)	Диссоциация: k_d (1/сек)	K_D (М)
IgG1-338-FEAR	7,3E+05	6,4E-05	8,8E-11
IgG1-547-FEAR	1,2E+06	3,6E-05	2,9E-11
IgG1-511-LC33S-FEAR	1,2E+06	4,5E-03	3,8E-09

Во второй серии экспериментов ($n = 3$) сравнивали сродство антител к PD-L1 человека и PD-L1 макаки-крабоеда при определении методом BLI. Постановка экспериментов была такая же, как описано выше, за исключением:

- время загрузки биосенсоров АНС антителами: 600 с;
- базовая линия: 300 с;
- в качестве антигена, наряду с PDLoneECD-HisCtag (PD-L1 человека, теоретическая молекулярная масса 29 кДа), использовали белок PD-L1/B7-H1 макаки-крабоеда (Acro Biosystems, кат. № PD1-C52H4-100, теоретическая молекулярная масса 27,1 кДа);
- диапазон концентраций антигена: 0,156-10 нМ (в первом эксперименте) или 0,39-25 нМ (во втором и третьем эксперименте).

Результаты представлены в табл. 2 (средние из 3 экспериментов). Сродство

связывания IgG1-338-FEAR, IgG1-547-FEAR и IgG1-511-LC33S-FEAR для PD-L1 человека было в том же диапазоне, что и в табл. 1, с отклонениями, вероятно, обусловленными изменчивостью условий анализа. Сродство связывания этих антител для PD-L1 макаки было очень близко таковому для PD-L1 человека. Также определяли сродство связывания у IgG1-MEDI4738-FEAR и IgG1-MPDL3280A-FEAR. IgG1-MEDI4738-FEAR проявляло близкое сродство связывания для PD-L1 человека и макаки. А IgG1-MPDL3280A-FEAR проявляло большое отличие в сродстве связывания, в среднем оно было в 19,7 раз ниже (более высокое значение K_D) для PD-L1 макаки, чем для PD-L1 человека.

Таблица 2. Сродство связывания (среднее из 3 независимых экспериментов) моноспецифичных бивалентных антител к PD-L1 человека и PD-L1 макаки-крабоеда при определении методом интерферометрии в биослое

Антитело	Биол. вид PD-L1	Ассоциация: k_a (1/М·сек)	Диссоциация: k_d (1/сек)	K_D (М)	Отличия по K_D (разы)
IgG1-338-FEAR	человек	8,0E+05	2,5E-04	3,1E-10	2,3
	макака	3,9E+05	2,8E-04	7,3E-10	
IgG1-547-FEAR	человек	9,7E+05	1,1E-04	1,2E-10	2,3
	макака	4,4E+05	1,2E-04	2,7E-10	
IgG1-511-LC33S-FEAR	человек	9,6E+05	4,8E-03	5,1E-09	2,3
	макака	4,5E+05	5,2E-03	1,2E-08	
IgG1-MEDI 4738-FEAR	человек	8,8E+05	3,3E-04	3,7E-10	2,3
	макака	4,3E+05	3,8E-04	8,6E-10	
IgG1-MPDL 3280A-FEAR	человек	7,2E+05	3,3E-04	4,6E-10	19,7
	макака	3,6E+05	3,0E-03	9,0E-09	

Пример 9. Классический сэндвич-анализ перекрестного блокирования PD-L1

Проводили проверку перекрестного блокирования антител методом интерферометрии в биослое (BLI) на приборе Octet HTX (ForteBio). Антитела (20 мкг/мл в 10 мМ Na-ацетатном буфере, pH 6,0 (ForteBio)) иммобилизовали на биосенсорах Amine-Reactive 2nd Generation (AR2G) (ForteBio) в соответствии с инструкциями производителя. После базовой линии (50 с) в разбавителе для образцов (ForteBio) биосенсоры, содержащие иммобилизованные антитела, нагружали в течение 500 с PDLoneECDHisCtag (100 нМ или 2,7 мкг/мл), после чего отслеживали реакцию ассоциации второго антитела (10 мкг/мл) в течение 500 с. Биосенсоры регенерировали 3 раза по 5 с поочередно в 10 мМ глицине pH 2,5 и разбавителе для образцов. Эксперимент повторяли с новым набором вторых антител, начиная с базовой линии. Каждый биосенсор использовали 6 раз. Эксперименты проводили при 30°C со встряхиванием при 1000 об/мин. Данные анализировали с помощью программы для анализа данных v9.0.0.12 (ForteBio). Ось Y совмещали со стадией ассоциации и применяли фильтрацию Savitzky-Golay. Из сигнала ассоциации второго антитела вычитали средний сигнал буфера для коррекции на

диссоциацию PDLoneECDHisCtag из иммобилизованного антитела. Скорректированные сигналы ассоциации наносили на графики в матричном формате. Сигналы $\geq 0,1$ нм считались не блокирующими парами антител (результаты указаны в виде простых чисел в таблице на фиг. 6), сигналы менее 0,1 считались блокирующими парами антител (результаты представлены жирным шрифтом в таблице на фиг. 6). Некоторые пары антител проявляли вытесняющее поведение (указаны звездочкой (*) в таблице на фиг. 6). Представлены типичные графики для вытесняющих (А), блокирующих (В) и неблокирующих (С) пар антител.

Эксперименты по перекрестной блокировке проводили для антител IgG1-338-FEAR, IgG1-547-FEAR, IgG1-511-LC33S-FEAR, IgG1-321-FEAR, IgG1-421-LC91S-FEAR, IgG1-476-N101Q-LC33S-FEAR, IgG1-632-FEAR, IgG1-516-FEAR, IgG1-MPDL3280A-FEAR и IgG1-MEDI4736-FEAR. Результаты представлены на фиг. 6.

Данные показывают, что антитело IgG1-511-LC33S-FEAR определяет уникальную группу перекрестной блокировки, так как оно блокирует IgG1-321-FEAR, IgG1-338-FEAR, IgG1-476-N101Q-LC33S-FEAR, IgG1-632-FEAR, IgG1-MPDL3280A-FEAR и IgG1-MEDI 4736-FEAR, но не блокирует связывание IgG1-547-FEAR, IgG1-421-LC91S-FEAR или IgG1-516-FEAR с PDL1 человека.

Антитело IgG1-547-FEAR также определяет уникальную группу перекрестной блокировки, так как оно блокирует IgG1-321-FEAR, IgG1-338-FEAR, IgG1-421-LC91S-FEAR, IgG1-MPDL3280A-FEAR и IgG1-MEDI4736-FEAR, но не блокирует связывание IgG1-511-LC33S-FEAR, IgG1-476-N101Q-LC33S-FEAR, IgG1-632-FEAR, IgG1-516-FEAR с PD1 человека.

Кроме того, антитело IgG1-476-N101Q-LC33S-FEAR проявляет вытесняющее поведение в сочетании с IgG1-321-FEAR, IgG1-338-FEAR, IgG1-MPDL3280A-FEAR и IgG1-MEDI4736-FEAR, указывая на то, что антитела IgG1-321-FEAR, IgG1-338-FEAR, IgG1-MEDI4736-FEAR и IgG1-MPDL3280A-FEAR связываются с PD-L1 человека иначе, чем IgG1-421-LC91S-FEAR, IgG1-547-FEAR, IgG1-LC33S-FEAR, IgG1- 632-FEAR и IgG1-516-FEAR.

Пример 10. Влияние антител к PD-L1 на взаимодействие PD-1/PD-L1

Определяли влияние бивалентных и моновалентных антител к PD-L1 на взаимодействие PD-1 и PD-L1 методом биоанализа блокирования PD-1/PD-L1, разработанным фирмой Promega (Madison, США). Это биолюминесцентный метод на клетках, состоящих из двух генно-инженерных линий клеток: эффекторных клеток PD-1, представляющих собой Т-клетки Jurkat, экспрессирующие PD-1 человека и репортер-люциферазу под управлением элемента отклика NFAT (NFAT-RE), и клеток PD-L1

aAPC/CHO-K1, представляющих собой клетки CHO-K1, экспрессирующие PD-L1 человека и инженерный белок клеточной поверхности, предназначенный для активации когнатных TCRs независимым от антигена образом. При совместном культивировании двух типов клеток взаимодействие PD-1/PD-L1 ингибирует сигнализацию TCR и опосредованную NFAT-RE люминесценцию. Добавление антител, блокирующих взаимодействие PD-1/PD-L1, высвобождает ингибирующий сигнал и ведет к активации TCR и опосредованной NFAT-RE люминесценции.

Клетки PD-L1 aAPC/CHO-K1 (Promega, кат. № J109A) оттаивали по методике производителя, ресуспендировали в среде Ham's F12 (Promega, кат. № J123A), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS; Promega, кат. № J121A) и вносили в 96-луночные плоскодонные планшеты для культивирования (CulturPlate-96, Perkin Elmer, кат. № 6005680). Планшеты инкубировали 16 часов при 37°C, 5% CO₂. Супернатанты удаляли и добавляли серийные разведения антител (конечные концентрации от 5 до 0,001 мкг/мл; 4-кратные разведения в среде RPMI 1640 [Lonza, кат. № BE12-115F], содержащей 1% фетальной телячьей сыворотки [FBS; Promega, кат. № J121A]). Добавляли эффекторные клетки PD-1 (Promega, кат. № J115A), оттаянные по методике производителя и ресуспендированные в RPMI/1% FBS. Планшеты инкубировали 6 часов при 37°C, 5% CO₂. После доведения до комнатной температуры в каждую лунку добавляли 40 мкл реагента Bio-Glo (субстрата для анализа люциферазы Bio-Glo [Promega, кат. № G720B], растворенного в буфере для анализа люциферазы Bio-Glo [Promega, кат. № G7198] по методике производителя). Планшеты инкубировали 5-10 мин при комнатной температуре и измеряли люминесценцию на приборе EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). Рассчитывали влияние на взаимодействие PD-1 с PD-L1 относительно контроля (без добавления антител) следующим образом:

кратность эффекта = RLU (эффект – фон) / RLU (контроль без антител – фон), где RLU – относительные единицы люминесценции.

Из фиг. 7 видно, что бивалентные моноспецифичные антитела IgG1-338-FEAR, IgG1-547-FEAR и IgG1-511-LC33S-FEAR эффективно блокируют взаимодействие между PD1 и PD-L1 дозозависимым образом. Моновалентные антитела bsIgG1-b12-FEAL×338-FEAR и bsIgG1-b12-FEAL×547-FEAR также эффективно блокируют взаимодействие PD1-PD-L1. bsIgG1-b12-FEAL×511-LC33S-FEAR также блокировало это взаимодействие, хотя и менее эффективно.

Пример 11. Цитотоксичность биспецифичных антител CD3×PD-L1 in vitro

Проверяли биспецифичные антитела к CD3×PD-L1 на цитотоксичность in vitro, используя клетки раковых линий в качестве клеток мишени и очищенные Т-клетки или

моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) в качестве эффекторных клеток. Т-клетки выделяли из лейкоцитных пленок доноров (Sanquin, Amsterdam, Нидерланды) с помощью коктейля RosetteSep для обогащения Т-клеток человека (кат. № 15021С.1, Stemcell Technologies, Франция) в соответствии с инструкциями производителя. PBMCs выделяли из 40 мл лейкоцитной пленки (Sanquin) в градиенте фиколла (Lonza; среда для выделения лимфоцитов, кат. № 17-829Е) в соответствии с инструкциями производителя.

В плоскодонные 96-луночные планшеты (кат. № 655180, Greiner Bio-one, Нидерланды) высевали клетки MDA-MB-231 (16 000 клеток на лунку), клетки PC-3 (16 000 клеток на лунку) или клетки HELA (10 000 клеток на лунку) и культивировали в течение ночи при 37°C. К раковым клеткам добавляли Т-клетки при соотношении Е:Т = 4:1 для клеток MDA-MB-231 или PC-3 и Е:Т = 8:1 для клеток HELA. PBMC добавляли к раковым клеткам при соотношении Е:Т = 10:1. Добавляли серийные разведения антител (конечные концентрации от 1000 до 0,06 нг/мл; 4-кратные разведения) и инкубировали планшеты 48 часов при 37°C. Затем супернатанты отбрасывали, а адгезированные клетки дважды промывали PBS. В лунки добавляли 150 мкл 10% раствора Alamar Blue (кат. № DAL1100, Life Technologies, Нидерланды) в среде RPMI-1640 (кат. № BE12-115F, Lonza, Швейцария), содержащей 10% бычьей сыворотки с железом (кат. № 10371-029, Life Technologies, Нидерланды) и инкубировали 5 часов при 37°C. Измеряли поглощение на приборе EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, США). Жизнеспособность обработанных стауроспорином (кат. № S6942, Sigma-Aldrich, США) клеток принимали за 0%, а жизнеспособность необработанных клеток – за 100%. “Содержание жизнеспособных клеток” рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ жизнеспособных клеток} = \frac{(\text{поглощение образца} - \text{поглощение обработанных стауроспорином клеток мишени})}{(\text{поглощение необработанных клеток мишени} - \text{поглощение обработанных стауроспорином клеток мишени})} \times 100.$$

Цитотоксичность биспецифичных антител CD3×PD-L1 на клетках MDA-MB-231

Из фиг. 8 видно, что bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR и bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR индуцируют зависящую от концентрации цитотоксичность на клетках MDA-MB-231, экспрессирующих PD-L1 на сравнительно высоком уровне, при использовании как очищенных Т-клеток (А), так и PBMCs (В) в качестве эффекторных клеток.

Цитотоксичность биспецифичных антител CD3×PD-L1 на клетках PC-3

Из фиг. 9 видно, что bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR и bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR индуцируют зависящую от концентрации цитотоксичность на клетках PC-3 при использовании как очищенных Т-

клеток (А), так и PBMCs (В) в качестве эффекторных клеток. bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR наименее эффективно индуцирует цитотоксичность на клетках РС-3, экспрессирующих PD-L1 на умеренном уровне.

Цитотоксичность биспецифичных антител CD3×PD-L1 на клетках HELA

Из фиг. 10 видно, что bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR способно индуцировать цитотоксичность на клетках HELA, экспрессирующих PD-L1 на низком уровне, при использовании Т-клеток в качестве эффекторных клеток, а для одного донора также при использовании PBMCs. bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×338-FEAR было менее способно индуцировать цитотоксичность на клетках HELA, а bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR не индуцировало цитотоксичности на клетках HELA.

Пример 12. Активация и пролиферация Т-клеток биспецифичными антителами CD3×PD-L1

Проверяли биспецифичные антитела к CD3×PD-L1 на активацию и пролиферацию Т-клеток *in vitro*, используя клетки MDA-MB-231 в качестве клеток мишени и очищенные Т-клетки в качестве эффекторных клеток. В качестве отрицательного контроля использовали IgG1-b12 (с Fc-областью, способной взаимодействовать с Fcγ-рецепторами и C1q). PBMCs выделяли из 40 мл лейкоцитной пленки (Sanquin) в градиенте фиколла (Lonza; среда для выделения лимфоцитов, кат. № 17-829E) в соответствии с инструкциями производителя. Из очищенных PBMCs выделяли Т-клетки с помощью коктейля RosetteSep для обогащения Т-клеток человека (кат. № 15021C.1, Stemcell Technologies, Франция) в соответствии с инструкциями производителя.

Клетки MDA-MB-231 метили 0,07 мкМ CellTrace CFSE (ThermoFisher Scientific, кат. № C34554) в соответствии с инструкцией производителя и высевали (5000 клеток на лунку) в плоскодонные 96-луночные планшеты (Greiner Bio-one, Нидерланды, кат. № 655180) для адгезирования к лункам на 4 часа при 37°C. К раковым клеткам добавляли Т-клетки в соотношении Е:Т = 8:1, то есть 40 000 клеток на лунку. Добавляли серийные разведения антител (конечные концентрации от 10000 до 1,5 нг/мл; 3-кратные разведения) и инкубировали планшеты 4 дня при 37°C.

Затем супернатанты (содержащие неадгезированные клетки) переносили в 96-луночный планшет с U-образным дном (Greiner Bio-one), а оставшиеся клетки собирали путем обработки трипсином-ЭДТА (Lonza) и объединяли с супернатантом в 96-луночном планшете с U-образным дном. Клетки промывали PBS (B.Braun) и окрашивали в течение 30 мин при 4°C с помощью коктейля антител: 1:200 против huCD4 с PacificBlue (Biolegend, кат. № 300521), 1:50 против huCD8 с FITC (BD, кат. № 345772), 1:100 против huCD25 с PE-Cy7 (eBiosciences, кат. № 25-0259-42) и против huCD69 с PE (BD, кат. №

555531). Клетки промывали один раз ледяным буфером FACS и ресуспендировали в 80 мкл буфера FACS с добавлением разведенного 1:6000 Topro-3-йода (ThermoFisher Scientific, кат. № T3605).

Пролиферацию Т-клеток определяли путем подсчета общего числа Т-клеток CD4^{pos} и CD8^{pos} в фиксированном объеме 50 мкл на проточном цитометре. Активацию Т-клеток измеряли путем подсчета числа клеток CD69^{pos} (раннего маркера активации Т-клеток) и CD25^{pos} (поздней активации Т-клеток) в фиксированном объеме 50 мкл на проточном цитометре. Из фиг. 11 видно, что все биспецифичные антитела CD3×PD-L1 индуцировали пролиферацию Т-клеток (о чем свидетельствует увеличение общего числа Т-клеток). Однако наблюдались отличия по количеству активированных и общему числу Т-клеток между различными биспецифичными антителами к CD3×PD-L1, причем bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×511-LC33S-FEAR было менее эффективным, а bsIgG1-huCD3-H1L1-FEAL×547-FEAR было наиболее эффективным.

Пример 13. Определение вклада аминокислотных остатков PD-L1 в связывание антител методом аланинового сканирования

Конструирование библиотеки

Синтезировали библиотеку PD-L1 (Uniprot Q9NZQ7) с одиночными остатками аланина (Geneart), в которой все остатки аминокислот во внеклеточном домене PD-L1 человека были поодиночке мутированы на аланин, за исключением положений, уже содержащих аланин или цистеин. Цистеины не подвергали мутации, чтобы минимизировать вероятность разрушения структуры антигена. Библиотеку клонировали в экспрессирующем векторе рMAC, содержащем экспрессионную кассету CMV/TK-polyA, ген устойчивости к Amp и начало репликации рBR322.

Получение и скрининг библиотеки

PD-L1 дикого типа и аланиновые мутанты экспрессировали индивидуально в клетках HEK293 FreeStyle в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Scientific). Через день после трансфекции клетки собирали. Примерно 100 000 клеток инкубировали с 20 мкл конъюгированного с Alexa488 антитела в буфере FACS (табл. 3). Клетки инкубировали 1 час при комнатной температуре. Затем добавляли 150 мкл буфера FACS и промывали клетки центрифугированием. Клетки суспендировали в 20 мкл свежего буфера FACS (PBS [без Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ и Phenol Red]/1% BSA фракции V/0,02% NaN₃) и хранили при 4°C до анализа методом проточной цитометрии на приборе iQue Screener.

Весь эксперимент повторяли 4 раза.

Таблица 3. Антитела, использовавшиеся при определении вклада аминокислотных остатков PD-L1 в связывание антител методом аланинового сканирования

Антитело	Исходная концентрация	Конъюгат
BsG1-b12-FEAL×547-FEAR-A488	3 мкг/мл	Alexa488
BsG1-b12-FEAL×338-FEAR-A488		
IgG1-511-FEAR-LC33S-A488		
BsG1-b12-FEAL×MPDL3280A-FEAR-A488		
IgG1-MEDI4736-FEAR		
IgG1-625-FEAR-A488 (контрольное)		

Анализ данных

Для каждого образца определяли среднее связывание антител на 1 клетку в виде среднего геометрического значения интенсивности флуоресценции (gMFI) для нестробированной популяции клеток. На gMFI влияет сродство антитела к мутанту PD-L1 и уровень экспрессии мутанта PD-L1 на 1 клетку. Поскольку определенные аланиновые мутации могут влиять на уровень поверхностной экспрессии мутанта PD-L1 и для коррекции на различия в экспрессии для каждого мутанта PD-L1 вообще, данные подвергали нормированию по интенсивности связывания неблокирующего контрольного антитела к PD-L1 (IgG1-625-FEAR-A488; содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H), приведенную в SEQ ID NO: 106, и вариабельную область легкой цепи (V_L), приведенную в SEQ ID NO: 110) по следующему уравнению:

$$\text{нормализованное } gMFI_{\text{положение а.к.}} = \frac{gMFI_{\text{исслед. Аб}}}{gMFI_{\text{контрольное Аб}}}$$

где “положение а.к.” относится либо к определенному Ala-мутанту PD-L1, либо к PD-L1 дикого типа (wt).

Для выражения уменьшения или усиления связывания антител по линейной шкале кратности изменений использовали следующую формулу:

$$\text{кратность изменения} = \text{Log}_{10} \left(\frac{\text{нормализованное } gMFI_{\text{Ala-мутант}}}{\text{нормализованное } gMFI_{\text{дикий тип}}} \right)$$

Усиление связывания в большинстве случаев вызывается уменьшением связывания контрольного антитела с определенными Ala-мутантами.

После этих вычислений те положения аминокислот, у которых после замены аминокислоты на аланин отсутствует уменьшение или усиление связывания с определенным антителом, дают в результате “0”, усиление связывания дает “>0”, а уменьшение связывания дает “<0”. Для коррекции на изменчивость образцов только те

аминокислотные остатки PD-L1, у которых кратность изменений связывания была меньше, чем средняя кратность изменений – $1,5 \times SD$ (обозначено пунктирной линией на фиг. 12), где SD означает стандартное отклонение расчетной кратности изменений из четырех независимых экспериментов для данного антитела, считались “мутантами с потерей связывания”.

В том случае, если gMFI контрольного антитела для определенного мутанта PD-L1 было ниже, чем среднее значение gMFI – $2,5 \times SD$ среднего значения gMFI у контрольного антитела, данные исключались из анализа (типа тех мутантов PD-L1, у которых уровни экспрессии были недостаточны).

На фиг. 12 представлена кратность изменений в связывании антител к PD-L1 с вариантами PD-L1 с Ala-мутациями в положениях 42-131 (согласно SEQ ID No: 94). Результаты показывают, что:

- связывание антитела 338 зависит по меньшей мере от а.к. R113, Y123 и R125 в PD-L1 человека,
- связывание антитела 511 зависит по меньшей мере от а.к. F19, F42, E45, K46, L94 и I116 в PD-L1 человека; причем аминокислоты E45, K46 и L94 непосредственно участвуют в связывании антитела, а F19, F42 и I116 косвенно участвуют в связывании антитела из-за своих погруженных боковых цепей,
- связывание антитела 547 зависит по меньшей мере от а.к. E58 и R113 в PD-L1 человека,
- связывание антитела MEDI4736 зависит по меньшей мере от а.к. R113 и R125 в PD-L1 человека и
- связывание антитела MPDL3280A зависит по меньшей мере от а.к. R125 и I126 в PD-L1 человека, причем I126 из-за своей погруженной боковой цепи может лишь косвенно участвовать в связывании антитела.

Пример 14. Антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC)

Определение ADCC по высвобождению ^{51}Cr

Клетки MDA-MB-231 (ATCC, кат. № HTB-26) собирали (получая 7×10^6 клеток), промывали (дважды в PBS, 1500 об/мин, 5 мин) и вносили в 2 мл среды RPMI 1640 с добавлением 10% косметической телячьей сыворотки (CCS) (HyClone, Logan, UT, США), в которую добавляли 200 мкКи ^{51}Cr (хром-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, Нидерланды). Смесь инкубировали 1 час при 37°C со встряхиванием. После промывки (дважды в PBS, 1500 об/мин, 5 мин) клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640 с 10% CCS и подсчитывали по исключению трипанового синего. Клетки доводили до концентрации 1×10^5 клеток/мл.

В то же время выделяли мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) из свежей лейкоцитной пленки (Sanquin, Amsterdam, Нидерланды) стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла в соответствии с инструкциями производителя (среда для выделения лимфоцитов; Lonza, Verviers, Франция). После ресуспендирования клеток в среде RPMI 1640 с 10% CCS клетки подсчитывали по исключению трипанового синего и доводили до 1×10^7 клеток/мл.

В лунки микропланшета вносили 50 мкл меченных ^{51}Cr клеток мишени и добавляли 50 мкл антитела к PD-L1 при 30 мкг/мл (разведенного в RPMI/10% CCS). В качестве положительного контроля использовали антитело против посторонней мишени, экспрессированной на клетках MDA-MB-231. Клетки инкубировали 15 мин при комнатной температуре и добавляли 50 мкл эффекторных клеток (PBMC), получая соотношение эффектор:мишень = 100:1. Для определения максимальной степени лизиса клеток добавляли 100 мкл 5% Triton-X100 вместо эффекторных клеток. Для определения степени спонтанного лизиса добавляли 100 мкл RPMI 1640/10% CCS вместо эффекторных клеток и антител. Кроме того, для определения уровня независимого от антител лизиса клеток добавляли 50 мкл эффекторных клеток и 50 мкл среды (вместо антитела). Образцы инкубировали 4 часа при 37°C, 5% CO₂. Для определения степени лизиса клеток мишени образцы центрифугировали (1200 об/мин, 3 мин) и переносили 75 мкл супернатанта в микропробирки, после чего просчитывали высвобожденный ^{51}Cr на гамма-счетчике. Степень опосредованного антителами лизиса рассчитывали следующим образом:

$$\frac{(\text{импульсы в минуту [срм]} \text{ в образце} - \text{срм при независимом от антител лизисе})}{(\text{срм при максимальном лизисе} - \text{срм при спонтанном лизисе})} \times 100\%$$

Из фиг. 13 видно, что антитело IgG1-547-F405L вызывало дозозависимый лизис клеток MDA-MB-231 на ~10% посредством ADCC. Антитело положительного контроля вызывало лизис максимум лишь на 20%, свидетельствуя о том, что общий лизис в этом эксперименте был довольно низким. IgG1-511-F405L-LC33S и IgG1-338-F405L не вызывали лизиса MDA-MB-231.

Определение ADCC люминесцентным методом биоанализа репортера ADCC

Также определяли способность антител к PD-L1 индуцировать сшивание FcγRIIIa (CD16) в качестве показателя ADCC люминесцентным методом биоанализа репортера ADCC (Promega, кат. № G7018) на клетках MDA-MB-231 в соответствии с рекомендациями производителя. В качестве эффекторных клеток набор содержит Т-клетки Jurkat человека, настроенные на стабильную экспрессию высокоаффинного FcγRIIIa (V158) и элемента отклика на ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT),

управляющий экспрессией люциферазы светлячка. Вкратце, клетки MDA-MB-231 (по 12500 клеток на лунку) высевали в планшеты OptiPlates (Perkin Elmer) в буфере для анализа ADCC [среда RPMI-1640 (Lonza, кат. № BE12-115F) с добавлением 3,5% сыворотка с низким уровнем IgG] и инкубировали 6 часов при 37°C/5% CO₂ в общем объеме 75 мкл, содержащем серийные разведения антител (конечные концентрации 0,5-250 нг/мл в 3,5-кратных разведениях) и оттаянные эффекторные клетки для биоанализа ADCC. После доведения планшетов в течение 15 мин до комнатной температуры (RT) добавляли 75 мкл реагента Bio Glo для анализа люциферазы и инкубировали планшеты 5 мин при комнатной температуре. Определяли продукцию люциферазы по люминесценции на считывающем приборе EnVision Multilabel Reader (Perkin Elmer). Уровень фона определяли в тех лунках, в которые добавляли только клетки мишени и антитело (без эффекторных клеток). В качестве отрицательного контроля использовали лунки, содержащие только клетки мишени и эффекторные клетки (без антител).

Из фиг. 14 видно, что IgG1-547-F405L очень эффективно индуцирует ADCC при определении репортерным методом. IgG1-MEDI4736-F405L и IgG1-MPDL3280A-K409R тоже индуцировали ADCC, но не в такой же степени, как IgG1-547-F405L. IgG1-511-F405L-LC33S и IgG1-338-F405L не индуцировали ADCC.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
1	VH-338	EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRFWMSWVR QAPGKGLEWVANIKQDGGEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNLSLRGEDTAVYYCARDNWNHGFYWGQ GLVTVSS
2	VH-338-CDR1	GFTFSRFW
3	VH-338-CDR2	IKQDGGEK
4	VH-338-CDR3	ARDDNWNHGFY
5	VK-338	DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASQSISSWLAWYQQK PGKAPNLLIYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ PDDFATYYCQYYGSIYTFGQGRLEIK
6	VK-338-CDR1	QSISSW
	VK-338-CDR2	KAS
7	VK-338-CDR3	QYYGSIYTFGQGRLEIK
8	VH-511	QVQLVQSGSELKPKGASVMVSKASGYTFTSYVMNWW RQAPGQGLEWMGWINSYTGNTSAQGTGRFVFSFDTS VNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGYCTSTSCYLDYWGQ GLVTVSS
9	VH-511-CDR1	GYTFTSYV
10	VH-511-CDR2	INSYTGNT
11	VH-511-CDR3	ARGYCTSTSCYLDY
12	VL-511	SYELTQPPSVSVSPGHTARITCSGDALPKKYACWFQQKS GQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSTSGTMATLTISGAQV EDETYYCYASADTSGTHRVSFGGGTKLTVL
13	VL-511-CDR1	ALPKKY
	VL-511-CDR2	EDS
14	VL-511-CDR3	YSADTSGTHRVS
15	VL-511-LC33S	SYELTQPPSVSVSPGHTARITCSGDALPKKYASWFQQKS GQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSTSGTMATLTISGAQV EDETYYCYASADTSGTHRVSFGGGTKLTVL
16	VL-511-LC33S- CDR1	ALPKKY
	VL-511-LC33S- CDR2	EDS
17	VL-511-LC33S- CDR3	YSADTSGTHRVS
18	VH-547	EVQLLEPGGGLVQPGGSLRLSCEASGSTFSTYAMSWVR QAPGKGLEWVSGFSGGGFTFYADSVRGRFTISRDSK NLTFLQMSSLRAEDTAVYYCAIPARGYNYGSFQHWGQ GLVTVSS
19	VH-547-CDR1	GSTFSTYA
20	VH-547-CDR2	FSGSGGFT
21	VH-547-CDR3	AIPARGYNYGSFQH
22	VL-547	SYVLTQPPSVSVAPGQATARITCGGNNIGSKSVHWYQQK P GQAPVLVYDDNDRPSGLPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVL
23	VL-547-CDR1	NIGSKS
	VL-547-CDR2	DDN
24	VL-547-CDR3	QVWDSSSDHVV

25	VH-huCD3-H1	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGTLVTVSS
26	VH-huCD3-H1- CDR1	GFTFNTYA
27	VH-huCD3-H1- CDR2	IRSKYNNYAT
28	VH-huCD3-H1- CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
29	VL-huCD3-L1	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTIT GAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
30	VL-huCD3-L1- CDR1	TGAVTTSNY
	VL-huCD3-L1- CDR2	GTN
31	VL-huCD3-L1- CDR3	ALWYSNLWV
32	VH-321	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVR QAPGKGLEWVANIKQDGNEKYYVDSVKGRFTISRDNK NSLYVQMNSLRAEDTAVYYCARDLYYGSSTYPPFDYW GQGTLVTVSS
33	VH-321-CDR1	GFTFSSYW
34	VH-321-CDR2	IKQDGNEK
35	VH-321-CDR3	ARDLYYGSSTYPPFDY
36	VK-321	DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASQSISSWLAWYLQK PGKAPKLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP DDFATYYCQYHSSSYTFGQGTKLEIK
37	VK-321-CDR1	QSISSW
	VK-321-CDR2	KAS
38	VK-321-CDR3	QYHSSSYT
39	VH-huCD3-H1- T31P	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNPYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGTLVTVSS
40	VH-huCD3-H1- T31M	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNMYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLVTVSS
41	VH-huCD3-H1- Y114V	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFA YVWGQGTLVTVSS
42	VH-huCD3-H1- Y114M	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFA MWGQGTLVTVSS
43	VH-huCD3-H1- Y116R	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFA RWGQGTLVTVSS

44	VH-huCD3-H1-S110A	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVAWFA YWGQGTLLTVSS
45	VH-huCD3-H1-H101G	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRGGNFGNSYVSWFA YWGQGTLLTVSS
46	VH-421	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVR QGPQKGLEWVSGIRWNSGSMHYADSVKGRFTISRDNK SSLYLQMNSLRAEDTALYYCARAPWYSGAWHPDYWG QGTLLTVSS
47	VH-421-CDR1	GFTFDDYA
48	VH-421-CDR2	IRWNSGSM
49	VH-421-CDR3	ARAPWYSGAWHPDY
50	VL-421-C91S	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGTNYVSWYQ QHPGKAPKLMYDVIKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTL GLQAEDEADYYC <u>SS</u> YAGTYTLLFGGGTKLTVL
51	VL-421-C91S- CDR1	SSDVGTNY
	VL-421-C91S- CDR2	DVI
52	VL-421-C91S- CDR3	<u>SS</u> YAGTYTLL
53	VH-476-N101Q	EVQMLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYAMSWVR QAPGKGLEWVSGIGDSGGSTYHADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLG <u>Q</u> SSGWYDHYYYY GMDVWGQGTLLTVSS
54	VH-476-N101Q- CDR1	GFTFRSYA
55	VH-476-N101Q- CDR2	IGDSGGST
56	VH-476-N101Q- CDR3	AKLG <u>Q</u> SSGWYDHYYYYGMDV
57	VL-476-C33S	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKYV <u>SW</u> FQQKP GQSPVLVIYRDSERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAV DEADFYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL
58	VL-476-C33S- CDR1	KLGKNKY
	VL-476-C33S- CDR2	RDS
59	VL-476-C33S- CDR3	QAWDSSTVV
60	VH-516	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCVSDYSSNDWWGWIR QPPGKGLEWIGYIYSGTGYYNPSLKSRTISIDTSKNQF SLKLNVTAVDTAVYYCARTRVGARRAFDYWGQGTLL TVSS
61	VH-516-CDR1	DYSSNDW
62	VH-516-CDR2	IYSGTG
63	VH-516-CDR3	ARTRVGARRAFDY
64	VL-516	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKP

		GQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEA GDEADYYCQVWDSSSDHVVFVGGGKLTVL
65	VL-516-CDR1	NIGSKS
	VL-516-CDR2	DDS
66	VL-516-CDR3	QVWDSSSDHVV
67	VH-632	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIR QAPGKGLEWVSYIGSSSNTIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYSCARDRVKYGSPGSLFDYWG QGTLVTVSS
68	VH-632-CDR1	GFTFSDYY
69	VH-632-CDR2	IGSSSNTI
703	VH-632-CDR3	ARDRVKYGSPGSLFDY
71	VL-632	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAFWYQQKS GQAPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMTLTISGAQV EDEADYYCYSTASSGDHRVFGGGKLTVL
72	VL-632-CDR1	ALPKKY
	VL-632-CDR2	EDS
73	VL-632-CDR3	YSTASSGDHRV
74	VH-MPDL3280A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWYR QAPGKGLEWYAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSK NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT LTVSS
75	VH- MPDL3280A- CDR1	GFTFSDSW
76	VH- MPDL3280A- CDR2	ISPYGGST
77	VH- MPDL3280A- CDR3	ARRHWPGGFDY
78	VL-MPDL3280A	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIK
79	VL- MPDL3280A- CDR1	QDVSTA
	VL- MPDL3280A- CDR2	SAS
80	VL- MPDL3280A- CDR3	QQYLYHPAT
81	VH-MEDI4736B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVR QAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQ GTLVTVSS
82	VH-MEDI4736B- CDR1	GFTFSRYW
83	VH-MEDI4736B- CDR2	IKQDGSEK

84	VH-MEDI4736B-CDR3	AREGGWFGELAFDY
85	VL-MEDI4736B	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLE PEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIK
86	VL-MEDI4736B-CDR1	QRVSSSY
	VL-MEDI4736B-CDR2	DAS
88	VL-MEDI4736B-CDR3	QQYGSLPWT
89	IgG1-FEAR-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>FE</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA <u>V</u> SHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDFLYS <u>RL</u> TVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
90	IgG1-FEAL-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>FE</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA <u>V</u> SHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDFL <u>LL</u> YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
91	Каппа-С	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
92	Лямбда-С	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQ WKS <hr/> RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
93	IgG1m(f) - VH - а.к. 118-447 по нумерации EU	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>LL</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDFLYS <u>KL</u> TVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
94	PD-L1 (№ доступа в Genbank NP_054862.1)	MRIFAVFIFMTYWHLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIE CKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQ HSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCM ISYGGADYKRITVKVNPYNKINQRILVVDVPTSEHELT CQAEGYPKAEVIWTSDDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNV TSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPPLAHP PNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCG IQDTNSKKQSDTHLEET

95	Зрелый CD3ε человека	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQH NDKNIGGEDDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYP RGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDMVSVATIVIVDI CITGGLLLL VYYWSKNRKA KAKPVTRGAGAGGRQRGQ NKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDL YSGLNQRR I
96	IgG1m(a) участок C _H 3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
97	IgG1m(f) участок C _H 3	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
98	IgG1m(ax) участок C _H 3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK
99	VH-huCD3-H1- CDR1-T31P	GFTFNPYA
100	VH-huCD3-H1- CDR1-T31M	GFTFNMYA
101	VH-huCD3-H1- CDR3-Y114V	VRHGNFGNSYVSWFAV
102	VH-huCD3-H1- CDR3-Y114M	VRHGNFGNSYVSWFAM
103	VH-huCD3-H1- CDR3-Y116R	VRHGNFGNSYVSWFAR
104	VH-huCD3-H1- CDR3-S110A	VRHGNFGNSYVAWFAY
105	VH-huCD3-H1- CDR3-H101G	VRGGNFGNSYVSWFAY
106	VH-7717-625	HMQLVESGGGVAQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWV RQAPGRGLEWLA VMSYDGETKYYADSVKGRFTISRDN S ENTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKDTSNGWNYYFYGMD VWGQGT TTVTVSS
107	VH-7717- 625_CDR1	GFTFSNYG
108	VH-7717- 625_CDR2	MSYDGETK
109	VH-7717- 625_CDR3	AKDTSNGWNYYFYGMDV
110	VL-7717-625	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKFASWYQQKS GQAPVLVIYEDSKRPSGIPERVSGSSSGTMATLTISGAQT EDEADYYCYSTDRSGYHWVFGGGTKLTVL
111	VL-7717- 625_CDR1	ALPKKF
	VL-7717- 625_CDR2	EDS
112	VL-7717- 625_CDR3	YSTDRSGYHWV
113	IgG1m(f) константный домен	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

		<p>WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
114	IgG1-K409R_ константный домен	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGFFLYS<u>R</u>LTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
115	IgG1-F405L_ константный домен	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDG<u>S</u>FLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, содержащее антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем антитело ингибирует связывание PD-L1 человека с PD-1 человека и

(i) конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15 [511], но не конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22 [547], или

(ii) конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22 [547], но не конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15 [511].

2. Антитело по п. 1, при этом данное антитело конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5 [338].

3. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом связывание данного антитела с PD-L1 человека не смещается антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:53, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:57 [476].

4. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом связывание данного антитела с PD-L1 человека не блокируется при связывании антитела, содержащего последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:106, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:110 [625].

5. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом связывание данного антитела с PD-L1 человека блокируется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO: 18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 22 [547].

6. Антитело по п. 1, при этом данное антитело:

(i) способно связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5 [338], или

(ii) способно связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело,

содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15 [511], или

(iii) способно связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22 [547].

7. Антитело по любому из пп. 1-4 и 6, при этом связывание антитела с мутантным PD-L1, в котором один или несколько аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям 113 (R113), 123 (Y123) и 125 (R125) в SEQ ID NO: 94, заменены на аланин, снижается по сравнению со связыванием с PD-L1 дикого типа, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94; причем снижение связывания определяется как кратность изменения в связывании данного антитела, которая меньше средней кратности изменений в связывании по всем аланиновым мутантам $- 1,5 \times SD$, где SD означает стандартное отклонение по всем рассчитанным изменениям для связывания антитела с мутантным PD-L1, а кратность изменений в связывании рассчитывается, как описано в Примере 13 [338].

8. Антитело по любому из пп. 1-2 и 6, при этом данное антитело связывается с эпитопом на PD-L1 (SEQ ID NO: 94), причем данный эпитоп содержит аминокислотный остаток в положении 113 (R113), аминокислотный остаток в положении 123 (Y123) и/или аминокислотный остаток в положении 125 (R125) SEQ ID NO: 94.

9. Антитело по любому из пп. 1, 3, 4 и 6, при этом связывание антитела с мутантным PD-L1, в котором один или несколько аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям 19 (F19), 42 (F42), 45 (E45), 46 (K46), 94 (L94) и 116 (I116) в SEQ ID NO: 94, заменены на аланин, снижается по сравнению с PD-L1 дикого типа, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94; причем снижение связывания определяется как кратность изменения в связывании данного антитела, которая меньше средней кратности изменений в связывании по всем аланиновым мутантам $- 1,5 \times SD$, где SD означает стандартное отклонение по всем рассчитанным изменениям для связывания антитела с мутантным PD-L1, а кратность изменений в связывании рассчитывается, как описано в Примере 13 [511].

10. Антитело по любому из пп. 1, 3, 4 и 6, при этом данное антитело связывается с эпитопом на PD-L1 (SEQ ID NO: 94), причем данный эпитоп содержит аминокислотный остаток в положении 45 (E45), аминокислотный остаток в положении 46 (K46) и/или аминокислотный остаток в положении 94 (L94) SEQ ID NO: 94.

11. Антитело по любому из пп. 1, 5 и 6, при этом связывание антитела с мутантным PD-L1, в котором один или несколько аминокислотных остатков в

положениях, соответствующих положениям 58 (E58) и 113 (R113) в SEQ ID NO: 94, заменены на аланин, снижается по сравнению с PD-L1 дикого типа, имеющим аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94; причем снижение связывания определяется как кратность изменения в связывании данного антитела, которая меньше средней кратности изменений в связывании по всем аланиновым мутантам $- 1,5 \times SD$, где SD означает стандартное отклонение по всем рассчитанным изменениям для связывания антитела с мутантным PD-L1, а кратность изменений в связывании рассчитывается, как описано в Примере 13 [547].

12. Антитело по любому из пп. 1, 5 и 6, при этом данное антитело связывается с эпитопом на PD-L1 (SEQ ID NO: 94), причем данный эпитоп содержит аминокислотный остаток в положении 58 (E58) и/или аминокислотный остаток в положении 113 (R113) SEQ ID NO: 94.

13. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем последовательность CDR3 V_H выбрана из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 21.

14. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6, последовательность KAS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7, соответственно [338], или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 9, 10 и 11, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:16, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:17, соответственно [511], или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 19, 20 и 21, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:23, последовательность DDN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:24, соответственно [547].

15. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:18.

16. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:22.

17. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:5 [338], или

(ii) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:15 [511], или

(iii) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:22 [547].

18. Антитело по п. 17, при этом каждая из последовательностей V_H и V_L содержит три последовательности CDR: CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности: FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно, причем соответствующие

совокупные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 из V_H по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичны по аминокислотной последовательности соответствующим совокупным каркасным последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 из данных последовательностей V_H , а последовательности CDR V_H не мутированы, при этом соответствующие совокупные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 из V_L по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичны по аминокислотной последовательности соответствующим совокупным каркасным последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 из данных последовательностей V_L , а последовательности CDR V_L не мутированы.

19. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом данное антитело способно индуцировать дозозависимый лизис эпителиальных клеток аденокарциномы типа MDA-MB-231 посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC).

20. Антитело по п. 19, при этом данное антитело способно уменьшить количество клеток в культуре данных эпителиальных клеток по меньшей мере на 5%, как-то по меньшей мере на 6%, 7%, 8%, 9% или по меньшей мере на 10% в результате лизиса клеток.

21. Антитело по п. 19 или 20, при этом ADCC определяется *in vitro* по высвобождению ^{51}Cr типа методики, приведенной в примере 14.

22. Антитело по любому из пп. 19-20, при этом ADCC определяется *in vitro* путем инкубации эпителиальных клеток с композицией, содержащей антитело и эффекторные клетки типа мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), в течение 4 часов при 37°C, 5% CO_2 , при этом содержание антител в композиции находится в пределах 0,1-1 мкг/мл, а соотношение эффекторных клеток к эпителиальным клеткам составляет 100:1.

23. Антитело по п. 19 или 20, при этом лизис эпителиальных клеток определяется *in vitro* методом анализа репортера-люциферазы в качестве показателя ADCC типа люминесцентного биоанализа репортера ADCC, изложенного в примере 14.

24. Антитело по п. 23, при этом ADCC определяется *in vitro* путем:

(i) контактирования культуры эпителиальных клеток с композицией, содержащей антитело и Т-клетки Jurkat человека, стабильно экспрессирующие $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ (CD16) и люциферазу светлячка (эффекторные клетки), при соотношении эффекторные клетки:эпителиальные клетки 1:1,

(ii) доведения культуры эпителиальных клеток и эффекторных клеток до комнатной температуры в течение 15 минут,

(iii) инкубирования культуры эпителиальных клеток и эффекторных клеток с

субстратом люциферазы,

(iv) определения продукции люциферазы в данной культуре клеток;

при этом содержание антител в композиции находится в пределах 0,5-250 нг/мл, а соотношение эффекторных клеток к эпителиальным клеткам составляет 1:1.

25. Антитело по любому из пп. 19, 20, 23 и 24, при этом ADCC эпителиальных клеток определяется методом анализа репортера-люциферазы типа репортерного анализа по п. 23 или 24, при этом ADCC, которая наблюдается после инкубации культуры эпителиальных клеток с исследуемой композицией, содержащей данное антитело, по меньшей мере в 1,5 раза больше той ADCC, которая наблюдается после инкубации культуры эпителиальных клеток с композицией, содержащей контрольное антитело; ADCC определяется в относительных единицах люминесценции (RLU), причем концентрация антител в исследуемой композиции и в композиции, содержащей контрольное антитело, одинакова и находится в пределах от 20 до 250 нг/мл, а контрольное антитело выбрано из:

а) антитела, содержащего последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO: 74, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 78; и

б) антитела, содержащего последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO: 81, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 85.

26. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5 [338], или

(ii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15 [511], или

(iii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22 [547].

27. Антитело, содержащее антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, причем данное антитело включает:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 33, 34 и 35, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:37, последовательность KAS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:38, соответственно [321], или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 47, 48 и 49, соответственно, и

вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:51, последовательность DVI и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:52, соответственно [421], или

(iii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 54, 55 и 56, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:58, последовательность RDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:59, соответственно [476], или

(iv) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 61, 62 и 63, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:65, последовательность DDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:66, соответственно [516], или

(v) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 107, 108 и 109, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:111, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:113, соответственно [625], или

(vi) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 68, 69 и 70, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:72, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:73, соответственно [632].

28. Антитело по п. 27, при этом данное антитело включает:

(i) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:32, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:36 [321], или

(ii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:46, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:50 [421], или

(iii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:53, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:57 [476], или

(iv) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:60, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:64 [516], или

(v) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:106, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:110 [625], или

(vi) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:67, и последовательность

V_L , приведенную в SEQ ID NO:71 [632].

29. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом данное антитело является моновалентным.

30. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом данное антитело представляет собой бивалентное антитело, содержащее два антигенсвязывающих участка, способных связываться с PD-L1 человека, при этом данные два антигенсвязывающих участка имеют идентичные последовательности варибельной области.

31. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом данное антитело представляет собой бивалентное биспецифичное антитело, которое в дополнение к первому антигенсвязывающему участку, способному связываться с PD-L1 человека, содержит второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем вторым антигеном не является CD3 ϵ человека.

32. Биспецифичное антитело, содержащее антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3 ϵ (эпсилон) человека, причем антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, имеет признаки, приведенные в любом из предыдущих пунктов.

33. Биспецифичное антитело по п. 32, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3 ϵ человека, включает варибельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 28, соответственно, и варибельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно.

34. Биспецифичное антитело по п. 32 или 33, включающее:

(i) антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включающий варибельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 2, 3 и 4, соответственно, и варибельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6, последовательность KAS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7 [338], соответственно, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3 ϵ человека, включающий варибельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 28, соответственно, и

вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(ii) антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включающий вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 9, 10 и 11, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:16, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:17 [338], соответственно, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, включающий вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 28, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(iii) антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включающий вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 19, 20 и 21, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:23, последовательность DDN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:24 [547], соответственно, и антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, включающий вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 28, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно.

35. Биспецифичное антитело по любому из пп. 32-34, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, включает последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:25, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29.

36. Биспецифичное антитело по п. 32, при этом данное биспецифичное антитело:

(i) имеет более низкое сродство связывания с CD3ε человека по сравнению с антителом, содержащим антигенсвязывающий участок, включающий последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO: 25, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:

29, причем предпочтительно данное сродство по меньшей мере в 2 раза ниже, напр., по меньшей мере в 5 раз ниже, как-то по меньшей мере в 10 раз ниже, напр., по меньшей мере в 25 раз ниже, напр., по меньшей мере в 50 раз ниже, и

(ii) способно опосредовать зависимость от концентрации цитотоксичность для клеток MDA-MB-231, клеток PC-3 и/или клеток HELA при использовании PBMC или очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток, напр., при таком анализе, как описано здесь в Примере 11.

37. Биспецифичное антитело по п. 36, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, включает:

(i) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 99, 27 и 28, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(ii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 100, 27 и 28, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(iii) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 101, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(iv) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 102, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(v) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 103, соответственно, и вариабельную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(vi) вариабельную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3,

имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 104, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно, или

(vii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NOs: 26, 27 и 105, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:30, последовательность GTN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:31, соответственно.

38. Биспецифичное антитело по п. 36 или 37, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3 ϵ человека, включает:

(i) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:39, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(ii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:40, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(iii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:41, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(iv) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:42, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(v) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:43, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(vi) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:44, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29, или

(vii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:45, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:29.

39. Мультиспецифичное антитело, содержащее первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, имеет признаки, приведенные в любом из пунктов 1-31.

40. Мультиспецифичное антитело по п. 39, при этом антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем последовательность CDR3 V_H выбрана из группы, состоящей из

последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 4 [338], SEQ ID NO: 11 [511] и SEQ ID NO: 21 [547].

41. Мультиспецифичное антитело по п. 40, при этом первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 2, 3 и 4, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:6, последовательность KAS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:7, соответственно [338], или

(ii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 9, 10 и 11, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:16, последовательность EDS и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:17, соответственно [511], или

(iii) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, приведенные в SEQ ID NOs: 19, 20 и 21, соответственно, и переменную область легкой цепи (V_L), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие последовательность, приведенную в SEQ ID NO:23, последовательность DDN и последовательность, приведенную в SEQ ID NO:24, соответственно [547].

42. Мультиспецифичное антитело по п. 40 или 41, при этом первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:1 [338], SEQ ID NO:8 [511] и SEQ ID NO:18 [547].

43. Мультиспецифичное антитело по любому из пп. 40-42, при этом первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO:5 [338], SEQ ID NO:15 [511] и SEQ ID NO:22 [547].

44. Мультиспецифичное антитело по любому из пп. 40-43, при этом первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична

аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:5 [338], или

(ii) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:15 [511], или

(iii) последовательность V_H , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_H , приведенной в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , которая по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности V_L , приведенной в SEQ ID NO:22 [547].

45. Мультиспецифичное антитело по любому из пп. 40-44, при этом каждая из последовательностей V_H и V_L содержит три последовательности CDR: CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности: FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно, причем соответствующие совокупные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 из V_H по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичны по аминокислотной последовательности соответствующим совокупным каркасным последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 из данных последовательностей V_H , а последовательности CDR V_H не мутированы, при этом соответствующие совокупные каркасные последовательности FR1, FR2, FR3 и FR4 из V_L по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или по меньшей мере на 99% идентичны по аминокислотной последовательности соответствующим совокупным каркасным последовательностям FR1, FR2, FR3 и FR4 из данных последовательностей V_L , а последовательности CDR V_L не мутированы.

46. Мультиспецифичное антитело по любому из пп. 40-45, при этом первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, включает:

(i) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5 [338], или

(ii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность

V_L , приведенную в SEQ ID NO:15 [511], или

(iii) последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22 [547].

47. Мультиспецифичное антитело, содержащее первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем данное антитело:

(i) конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15, но не конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22, или

(ii) конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22, но не конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15.

48. Мультиспецифичное антитело по п. 47, при этом данное антитело конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5.

49. Мультиспецифичное антитело, содержащее первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем связывание данного антитела с PD-L1 человека не вытесняется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:53, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:57.

50. Мультиспецифичное антитело по п. 49, при этом антитело ингибирует связывание PD-L1 человека с PD-1 человека.

51. Мультиспецифичное антитело по п. 49 или 50, при этом антитело конкурирует за связывание с PD-L1 человека с антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22.

52. Мультиспецифичное антитело по любому из пп. 49-51, при этом связывание данного антитела с PD-L1 человека блокируется антителом, содержащим последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO: 22.

53. Мультиспецифичное антитело, содержащее первый антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, и второй антигенсвязывающий участок, способный связываться со вторым антигеном или с другим эпитопом PD-L1 человека, причем первый антигенсвязывающий участок:

(i) способен связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:1, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:5 [338], или

(ii) способен связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:8, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:15 [511], или

(iii) способен связываться с тем же эпитопом PD-L1 человека, что и антитело, содержащее последовательность V_H , приведенную в SEQ ID NO:18, и последовательность V_L , приведенную в SEQ ID NO:22 [547].

54. Мультиспецифичное антитело по любому из пп. 40-53, при этом антитело является биспецифичным.

55. Мультиспецифичное антитело по п. 54, при этом антитело является бивалентным.

56. Мультиспецифичное антитело по любому из пп. 40-55, при этом антитело способно связываться со вторым антигеном, причем второй антиген не представлен CD3ε человека.

57. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело представляет собой полноразмерное антитело.

58. Антитело по п. 57, при этом антитело представляет собой полноразмерное антитело IgG1.

59. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело представляет собой фрагмент антитела.

60. Антитело по любому из пп. 32-59, при этом антитело содержит две половинки молекулы, каждая из которых содержит антигенсвязывающий участок, причем:

(i) половинка молекулы, содержащая антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, является химерной, и/или

(ii) половинка молекулы, содержащая антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека, если она присутствует, является химерной.

61. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом:

(i) антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, является гуманизованным, и/или

(ii) антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека, если он присутствует, является гуманизованным.

62. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом:

(i) антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, является человеческим, и/или

(ii) антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε (эпсилон) человека, если он присутствует, является человеческим.

63. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом каждый антигенсвязывающий участок включает переменную область тяжелой цепи (V_H) и переменную область легкой цепи (V_L), причем каждая из данных переменных областей содержит три последовательности CDR: CDR1, CDR2 и CDR3, соответственно, и четыре каркасные последовательности: FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно.

64. Антитело по п. 63, при этом антитело содержит две константные области тяжелой цепи (C_H) и две константные области легкой цепи (C_L).

65. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, причем каждая из данных первой и второй тяжелых цепей включает по меньшей мере шарнирный участок и участки C_{H2} и C_{H3} , причем у первой тяжелой цепи была заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 (по нумерации EU), и у второй тяжелой цепи была заменена по меньшей мере одна из аминокислот в положении, соответствующем положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 (по нумерации EU), при этом у данных первой и второй тяжелой цепи замены находятся не в одинаковых положениях.

66. Антитело по п. 65, при этом (i) аминокислота в положении, соответствующем F405 (по нумерации EU), представлена L в данной первой тяжелой цепи, а аминокислота в положении, соответствующем K409 (по нумерации EU), представлена R в данной второй тяжелой цепи, или же (ii) аминокислота в положении, соответствующем K409 (по нумерации EU), представлена R в данной первой тяжелой цепи, а аминокислота в положении, соответствующем F405 (по нумерации EU), представлена L в данной второй тяжелой цепи.

67. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом данное антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, причем одна или обе тяжелые цепи модифицированы с тем, чтобы антитело индуцировало Fc-опосредованную эффекторную функцию в меньшей степени по сравнению с таким антителом, которое идентично за

исключением того, что содержит немодифицированную первую и вторую тяжелую цепь.

68. Антитело по п. 67, при этом Fc-опосредованная эффекторная функция измеряется по опосредованной Fc экспрессии CD69, по связыванию с Fcγ-рецепторами, по связыванию с C1q или по индукции Fc-опосредованного перекрестного сшивания FcR.

69. Антитело по п. 67 или 68, при этом константные последовательности тяжелой и легкой цепи были модифицированы с тем, чтобы у данного антитела Fc-опосредованная экспрессия CD69 снижалась по меньшей мере на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90%, на 99% или 100% по сравнению с антителом дикого типа, при этом такая Fc-опосредованная экспрессия CD69 определяется при функциональном анализе на основе РВМС.

70. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом данное антитело содержит первую и вторую тяжелую цепь, причем по меньшей мере в одной из данных первой и второй тяжелых цепей одна или несколько аминокислот в положениях, соответствующих положениям L234, L235, D265, N297 и P331 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, не представлены L, L, D, N и P, соответственно.

71. Антитело по п. 70, при этом положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, представлены F и E, соответственно, в данных первой и второй тяжелых цепях.

72. Антитело по п. 71, при этом антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее первую и вторую тяжелую цепь, причем положения, соответствующие положениям L234 и L235 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, и в первой тяжелой цепи, и во второй тяжелой цепи представлены F и E, соответственно, при этом (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, в первой тяжелой цепи представлено L, а положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, во второй тяжелой цепи представлено R, или же (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, в первой тяжелой цепи представлено R, а положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, во второй тяжелой цепи представлено L.

73. Антитело по п. 70, при этом положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, представлены F, E и A, соответственно, в данных первой и второй тяжелых цепях.

74. Антитело по п. 73, при этом антитело представляет собой биспецифичное антитело, содержащее первую и вторую тяжелую цепь, причем положения, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, и в первой тяжелой цепи, и во второй тяжелой цепи представлены F и E,

соответственно, при этом (i) положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, в первой тяжелой цепи представлено L, а положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, во второй тяжелой цепи представлено R, или же (ii) положение, соответствующее K409 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, в первой тяжелой цепи представлено R, а положение, соответствующее F405 в тяжелой цепи IgG1 человека по нумерации EU, во второй тяжелой цепи представлено L.

75. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело не связывается с PD-L2 человека.

76. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело связывается с PD-L1 человека со значением K_D 10^{-8} М или меньше, как-то 10^{-9} М или меньше, напр., 10^{-10} М или меньше при таком определении, как описано здесь в Примере 8.

77. Антитело по любому из предыдущих пунктов, при этом антитело опосредует зависимость от концентрации цитотоксичность для клеток MDA-MB-231, клеток PC-3 и/или клеток HELA при использовании очищенных Т-клеток в качестве эффекторных клеток при таком анализе, как описано здесь в Примере 11.

78. Конструкция из нуклеиновой кислоты, включающая:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, содержащего антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, как определено в любом из пп. 1-31, и/или

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, содержащего антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, как определено в любом из пп. 1-31.

79. Конструкция из нуклеиновой кислоты по п. 78, дополнительно включающая:

(i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела, содержащего антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, как определено в любом из пп. 33-38, и/или

(ii) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность легкой цепи антитела, содержащего антигенсвязывающий участок, способный связываться с CD3ε человека, как определено в любом из пп. 33-38.

80. Экспрессирующий вектор, содержащий конструкцию из нуклеиновой кислоты по п. 78 или 79.

81. Клетка-хозяин, содержащая конструкцию из нуклеиновой кислоты по п. 78 или 79 либо экспрессирующий вектор по п. 80.

82. Клетка-хозяин по п. 81, которые представляет собой клетки млекопитающих

типа клеток яичников китайского хомяка.

83. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-77 и фармацевтически приемлемый носитель.

84. Антитело по любому из пп. 1-77 или фармацевтическая композиция по п. 83 для применения в качестве лекарственного средства.

85. Антитело по любому из пп. 1-80 или фармацевтическая композиция по п. 70 для применения при лечении рака.

86. Антитело по любому из пп. 1-77 или фармацевтическая композиция по п. 70 для применения при лечении раковых заболеваний, характеризующихся наличием солидных опухолей.

87. Антитело по любому из пп. 1-78 или фармацевтическая композиция по п. 70 для применения при лечении ракового заболевания, выбранного из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака легких, рака толстой кишки и рака головы и шеи.

88. Способ лечения заболеваний, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту антитела по любому из пп. 1-75 или фармацевтической композиции по п. 83.

89. Применение антитела по любому из пп. 1-77 для изготовления лекарственного средства типа лекарственного средства для лечения рака, напр., ракового заболевания, характеризующегося наличием солидных опухолей, или ракового заболевания, выбранного из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака легких, рака толстой кишки и рака головы и шеи.

90. Способ или применение по любому из пп. 83-89, при этом способ или применение включает комбинирование с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами типа химиотерапевтических средств.

91. Способ получения антитела по любому из пп. 1-77, включающий стадии:

a) культивирования клеток-хозяев, вырабатывающих первое антитело, содержащее антигенсвязывающий участок, способный связываться с PD-L1 человека, как определено в любом из пп. 1-13, и очистка данного первого антитела из культуры;

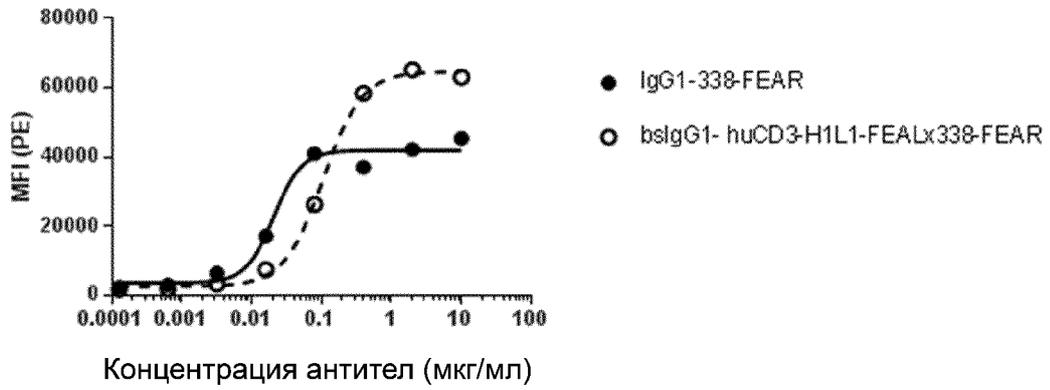
b) культивирования клеток-хозяев, вырабатывающих второе антитело, содержащее антигенсвязывающий участок, способный связываться с другим эпитопом PD-L1 или с другим антигеном, напр., участок связывания CD3ε человека, как определено в любом из пп. 14-19, и очистка данного второго антитела из культуры;

c) инкубации данного первого антитела вместе со вторым антителом в восстановительных условиях, достаточных для того, чтобы цистеины в шарнирной области подверглись изомеризации в дисульфидную связь; и

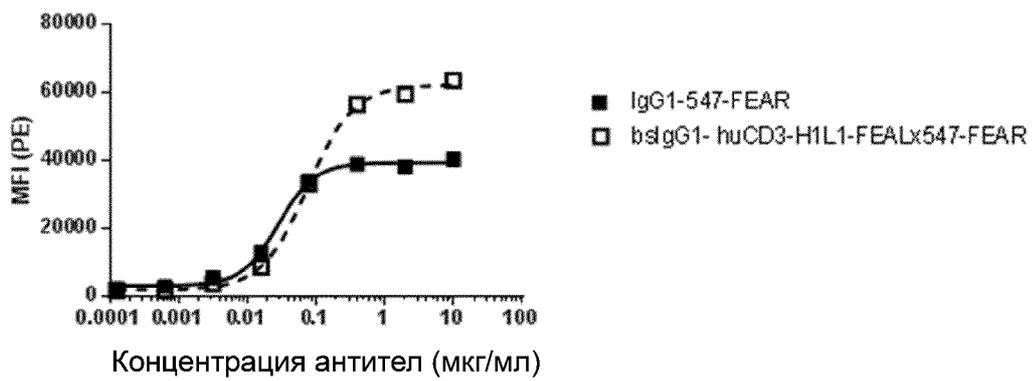
d) получения данного биспецифического антитела.

92. Антиидиотипическое антитело, которое связывается с антигенсвязывающим участком, способным связываться с PD-L1 человека, как определено в любом из пп. 1-77.

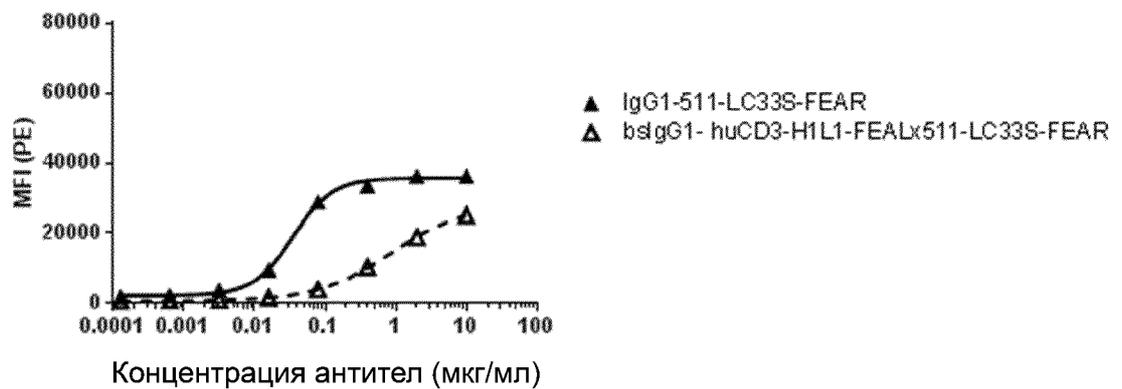
A



B

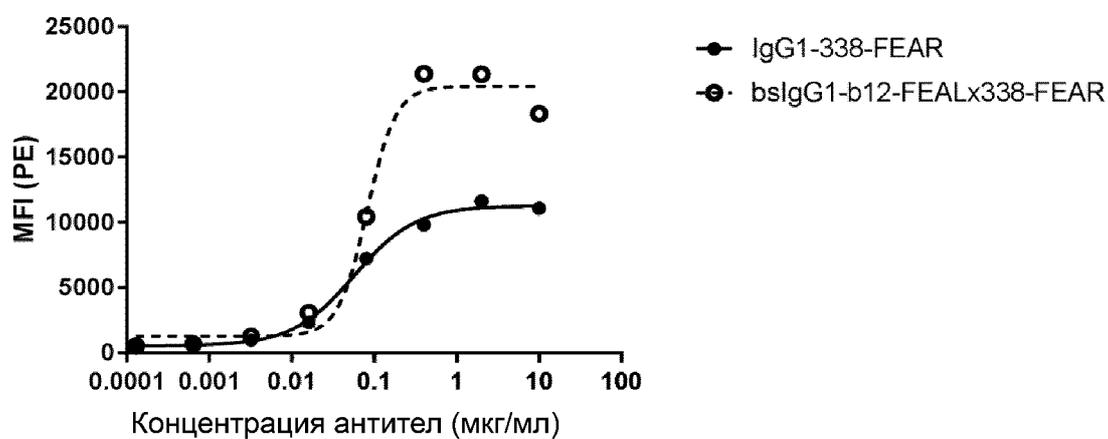


C

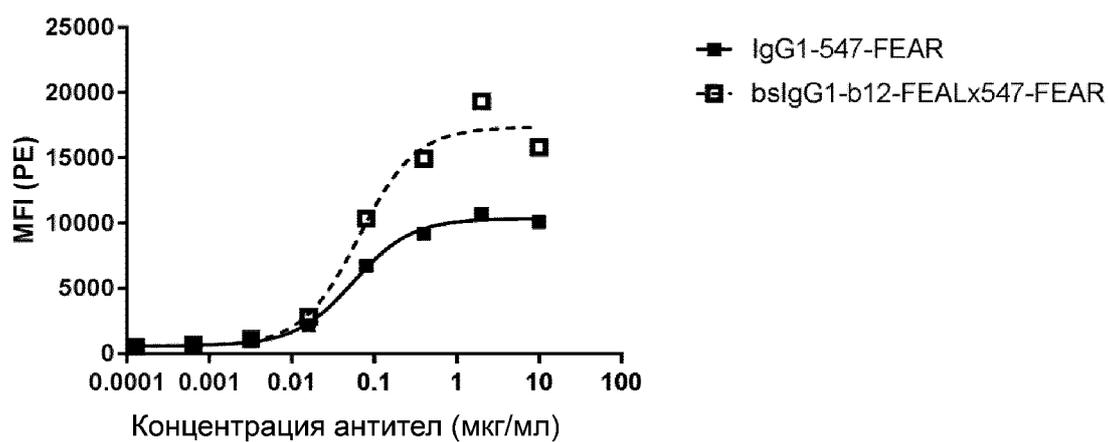


Фиг. 1

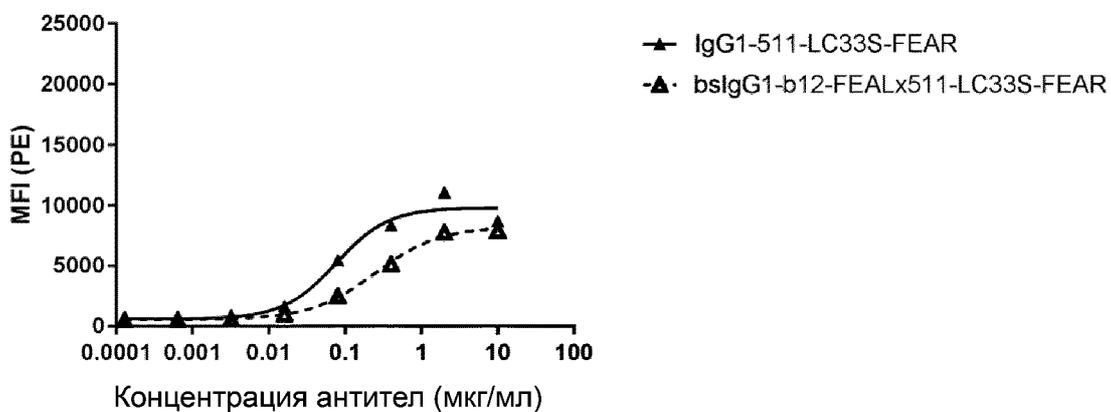
D



E

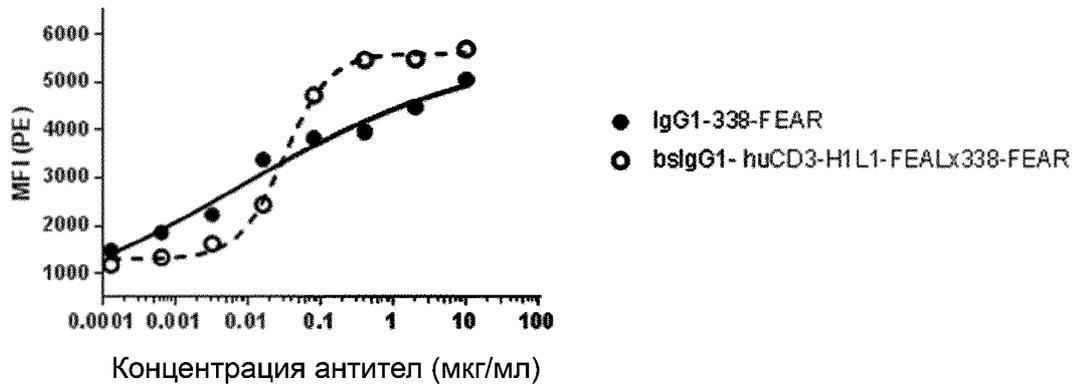


F

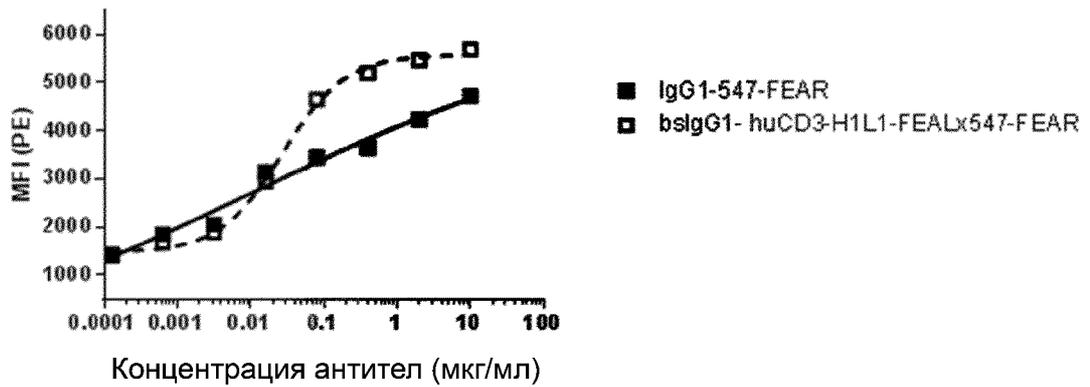


Фиг. 1 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

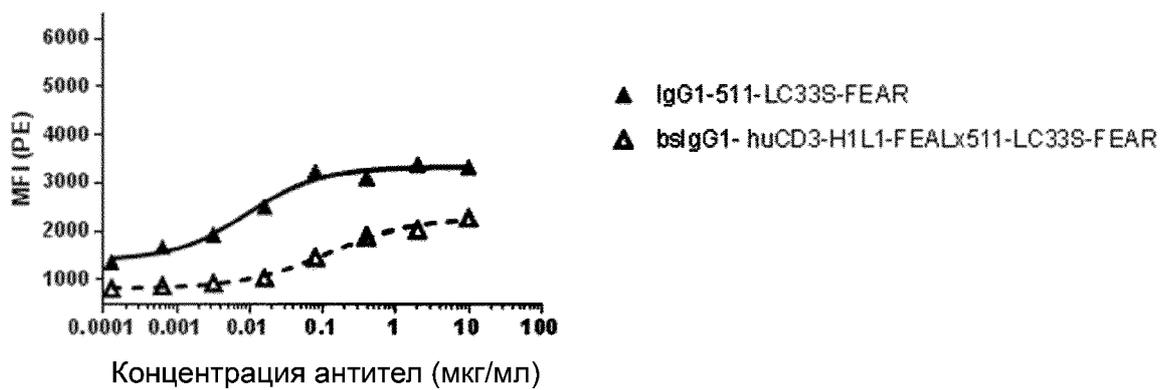
A



B

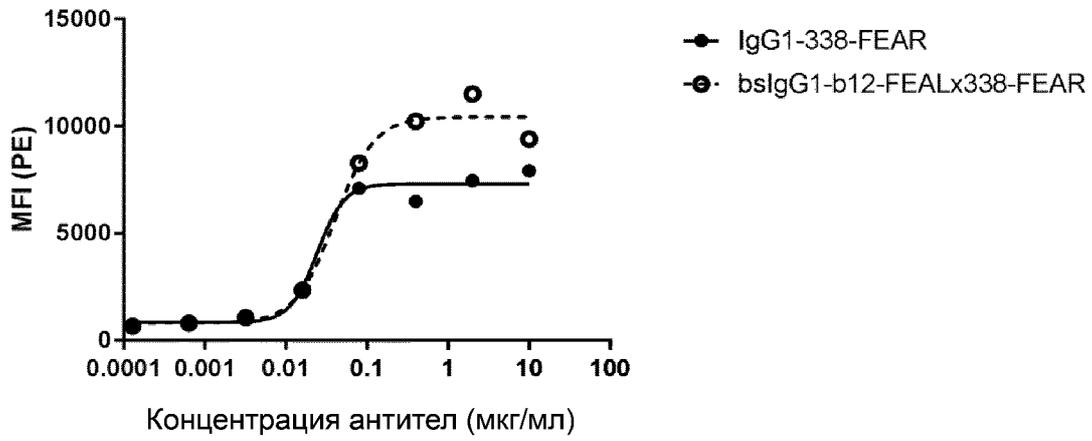


C

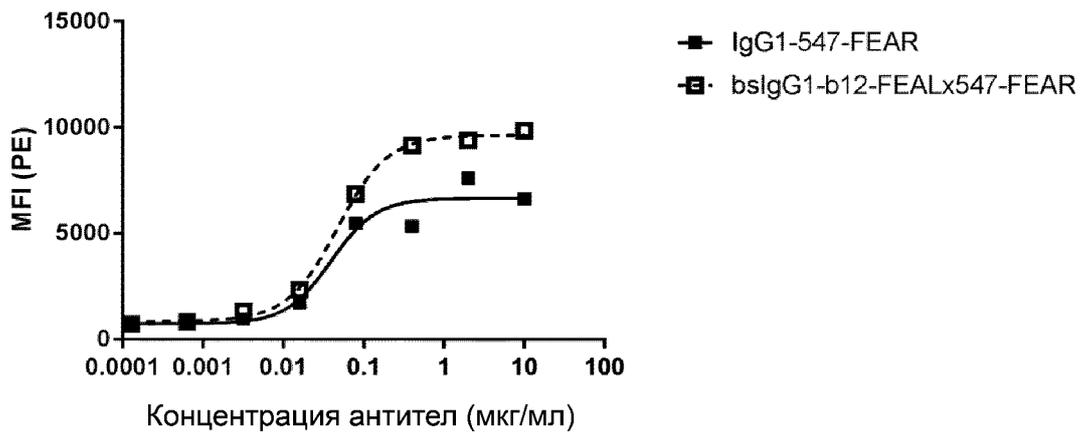


Фиг. 2

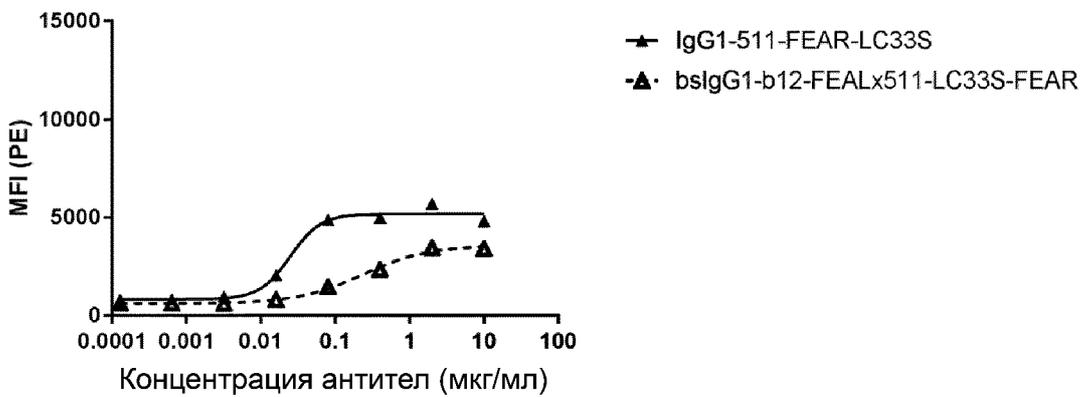
D



E

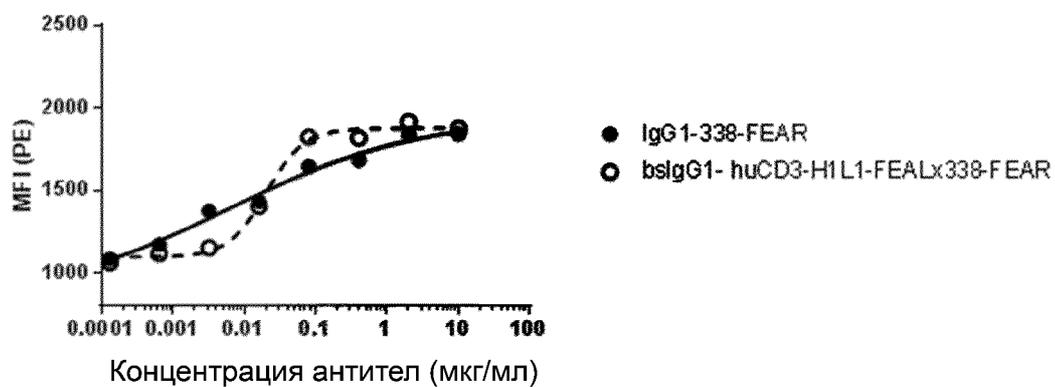


F

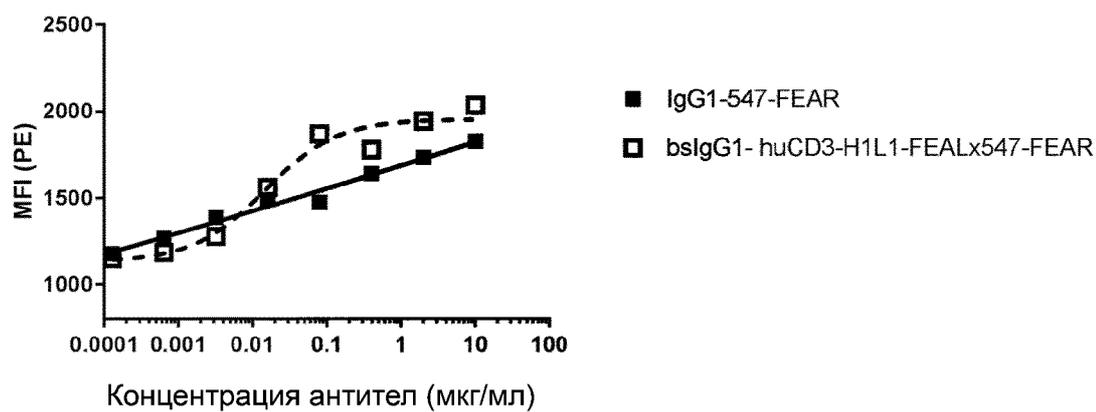


Фиг. 2 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

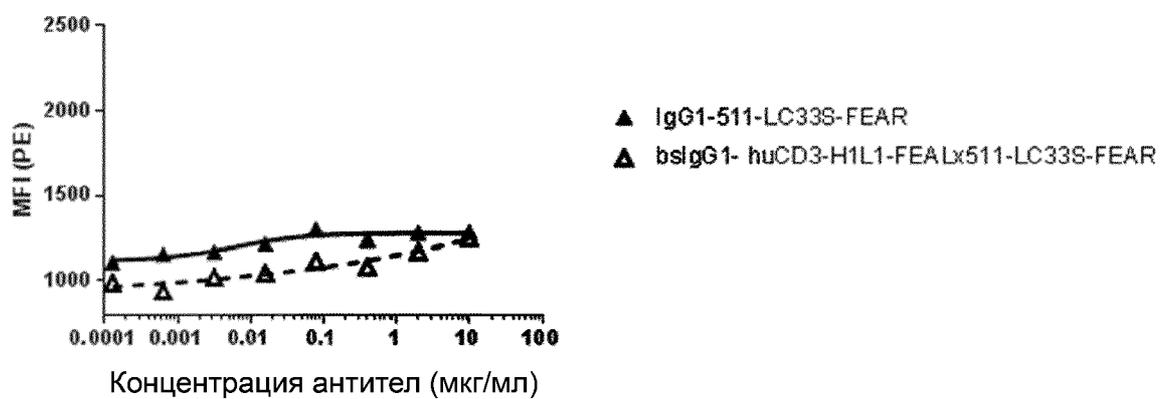
A



B



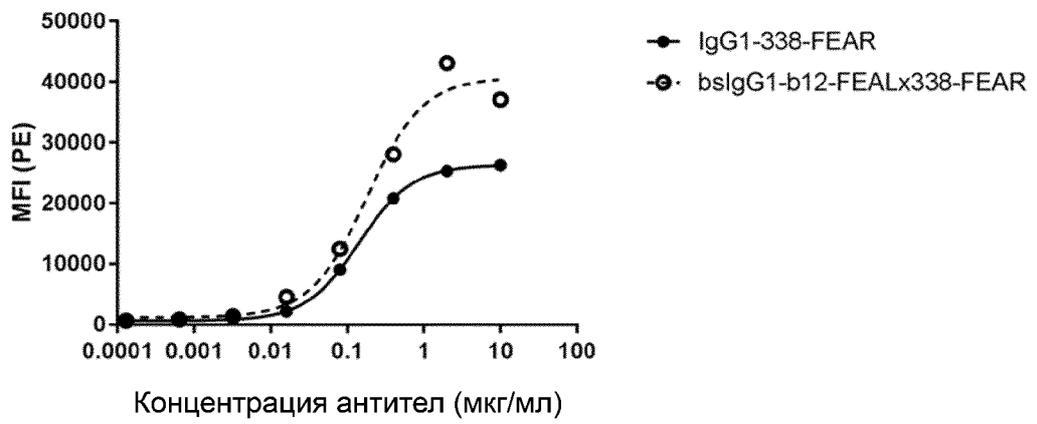
C



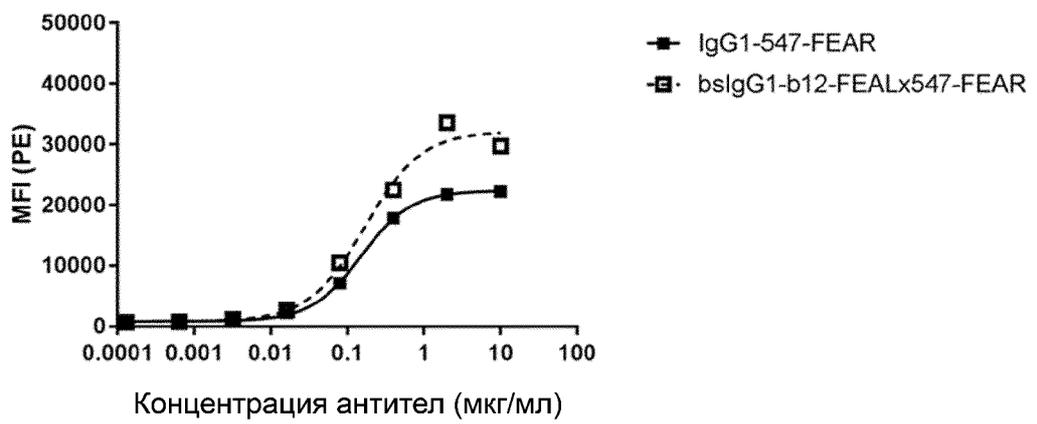
Фиг. 3

6/21

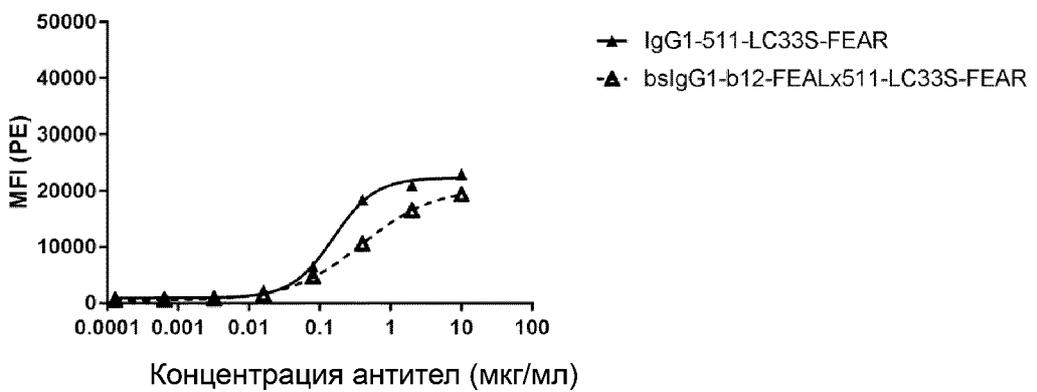
A



B

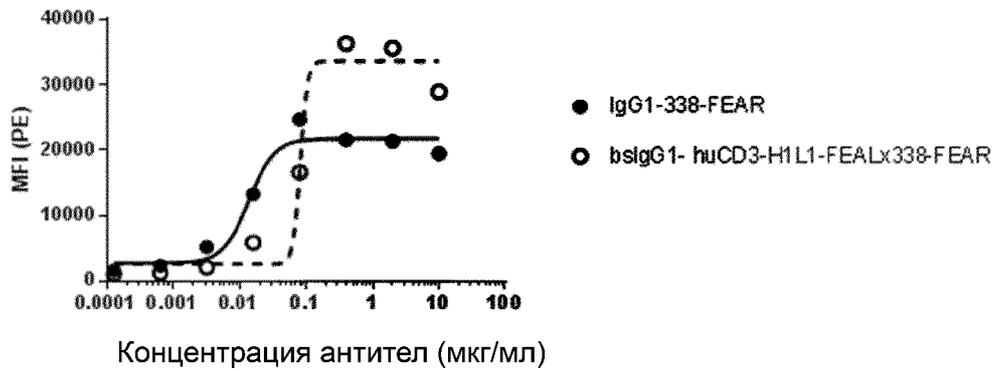


C

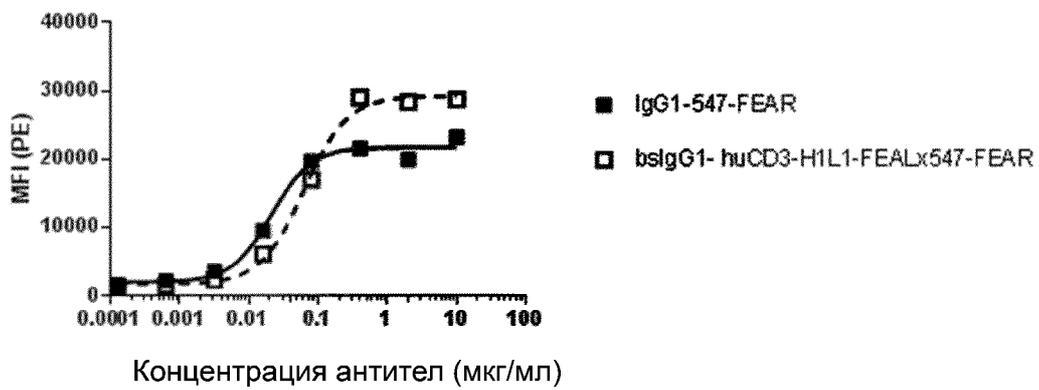


Фиг. 4

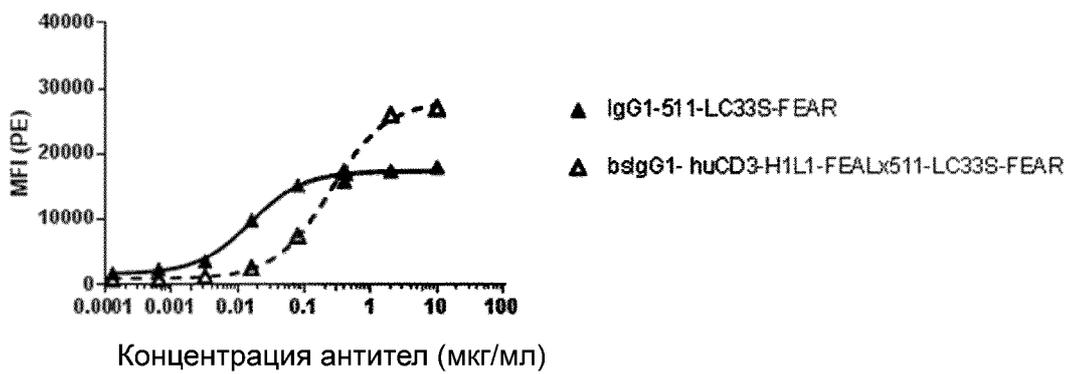
A



B

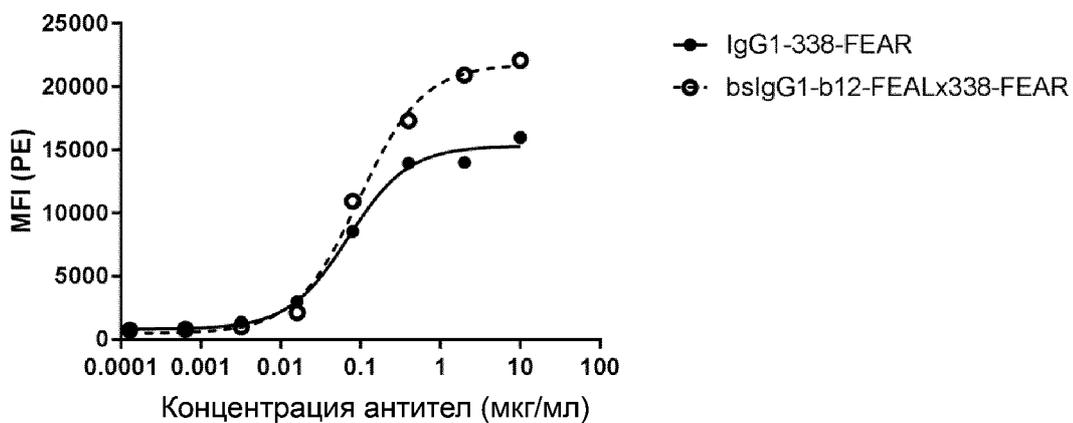


C

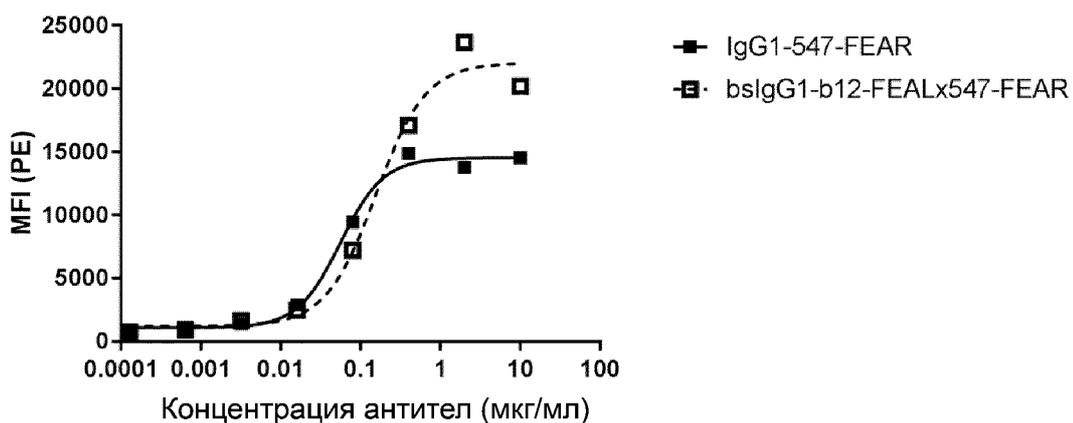


Фиг. 5

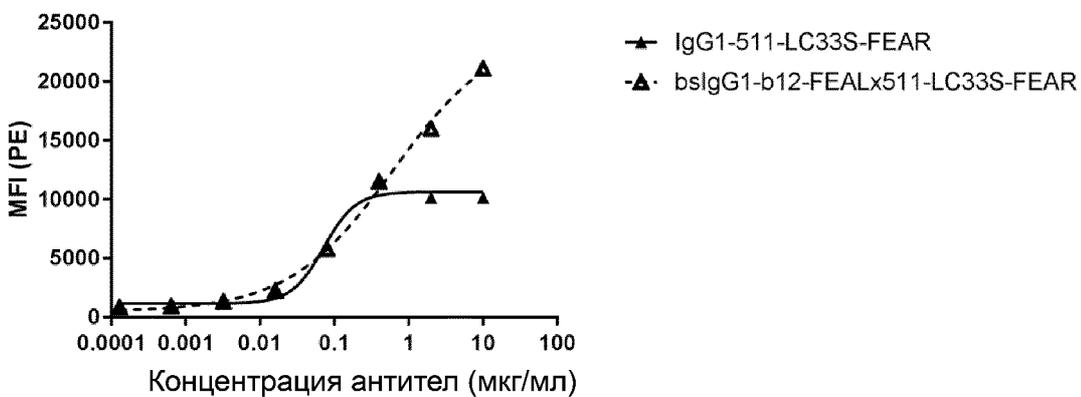
D



E



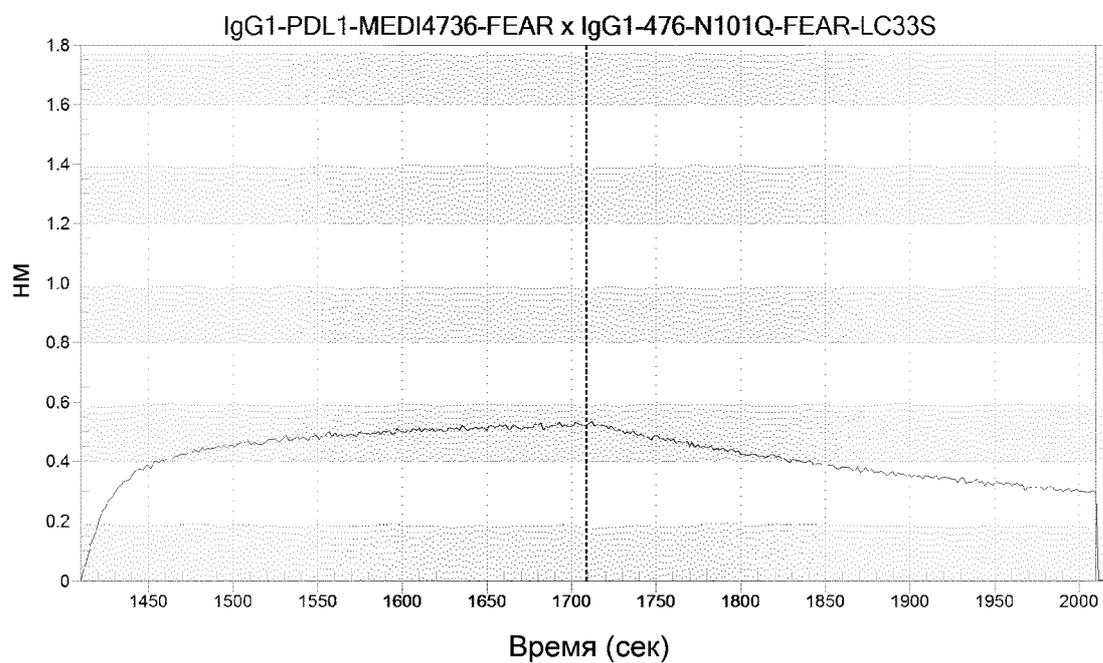
F



Фиг. 5 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

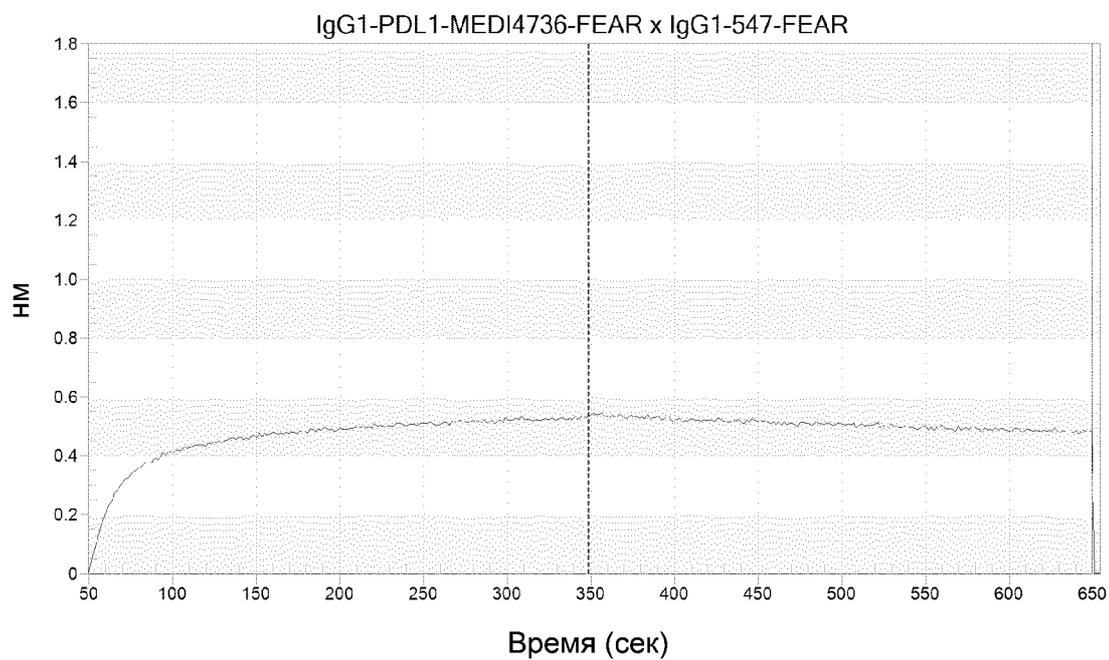
Антитело	321	MEDI	338	MPDL	421-LC19S	547	511-LC-33S	476-N101Q-LC33S	632	516
321	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	*	0.6	0.6
MEDI	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	*	1.2	1.2
338	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	*	0.6	0.6
MPDL	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	*	1.0	0.0
421-LC91S	-0.1	0.0	-0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.4	0.2	0.0
547	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.8	0.7	0.7
511-LC33S	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.6
476-N101Q-LC33S	*	*	*	*	0.8	0.7	0.0	0.0	0.0	0.7
632	0.6	0.5	0.6	0.4	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.6
516	1.1	1.0	1.1	0.0	-0.1	0.8	1.1	1.2	1.1	0.0

A

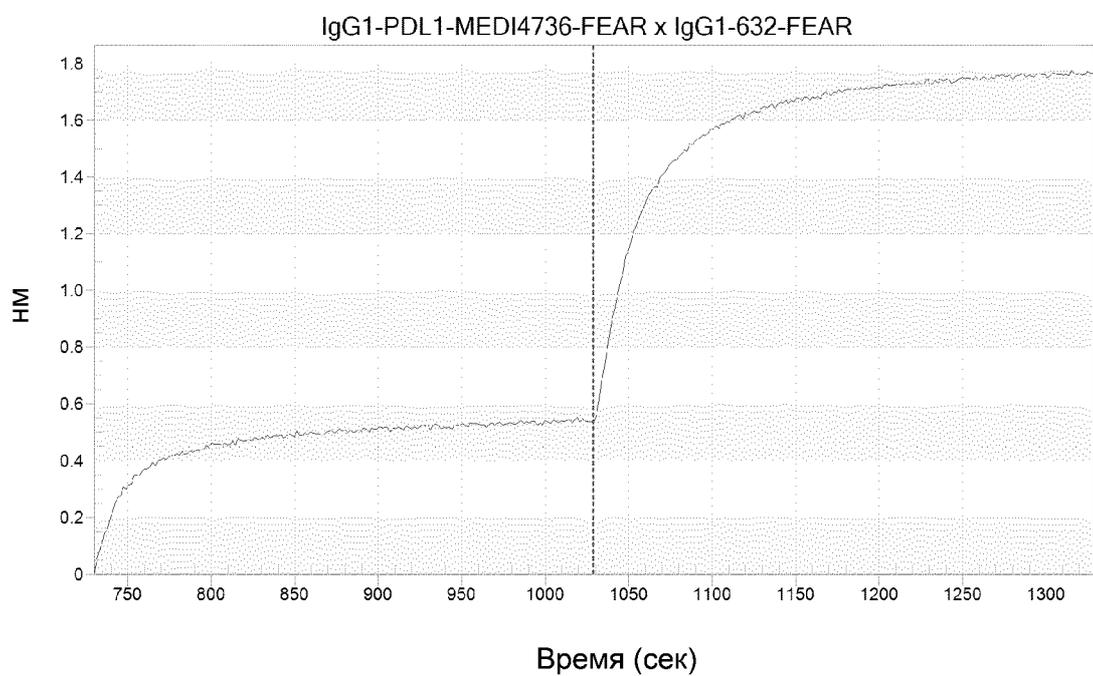


Фиг. 6

B

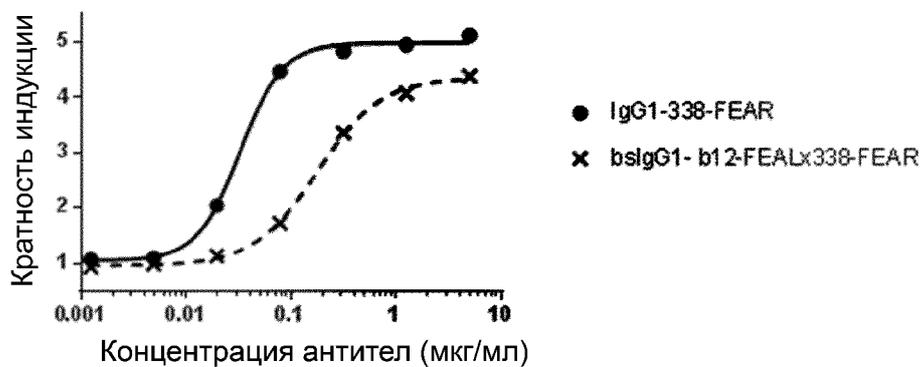


C

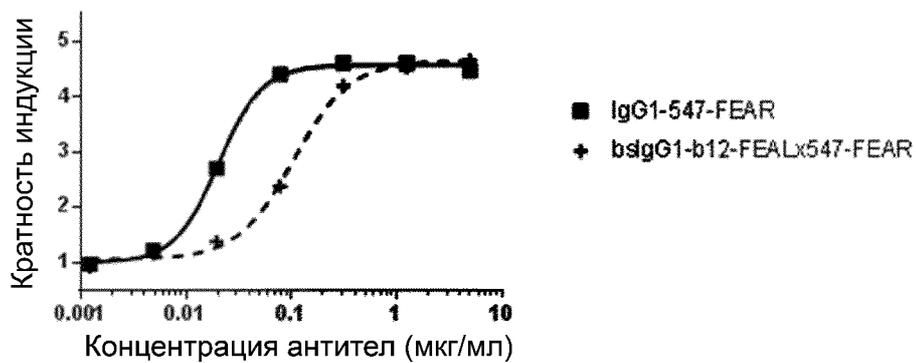


Фиг. 6 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

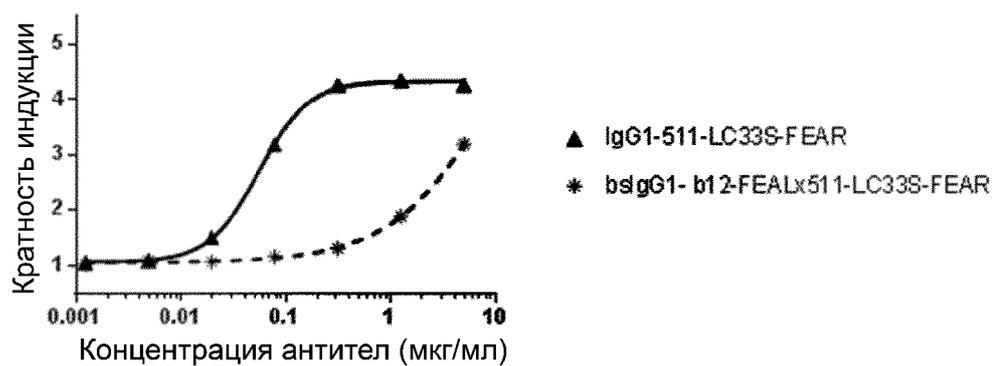
A



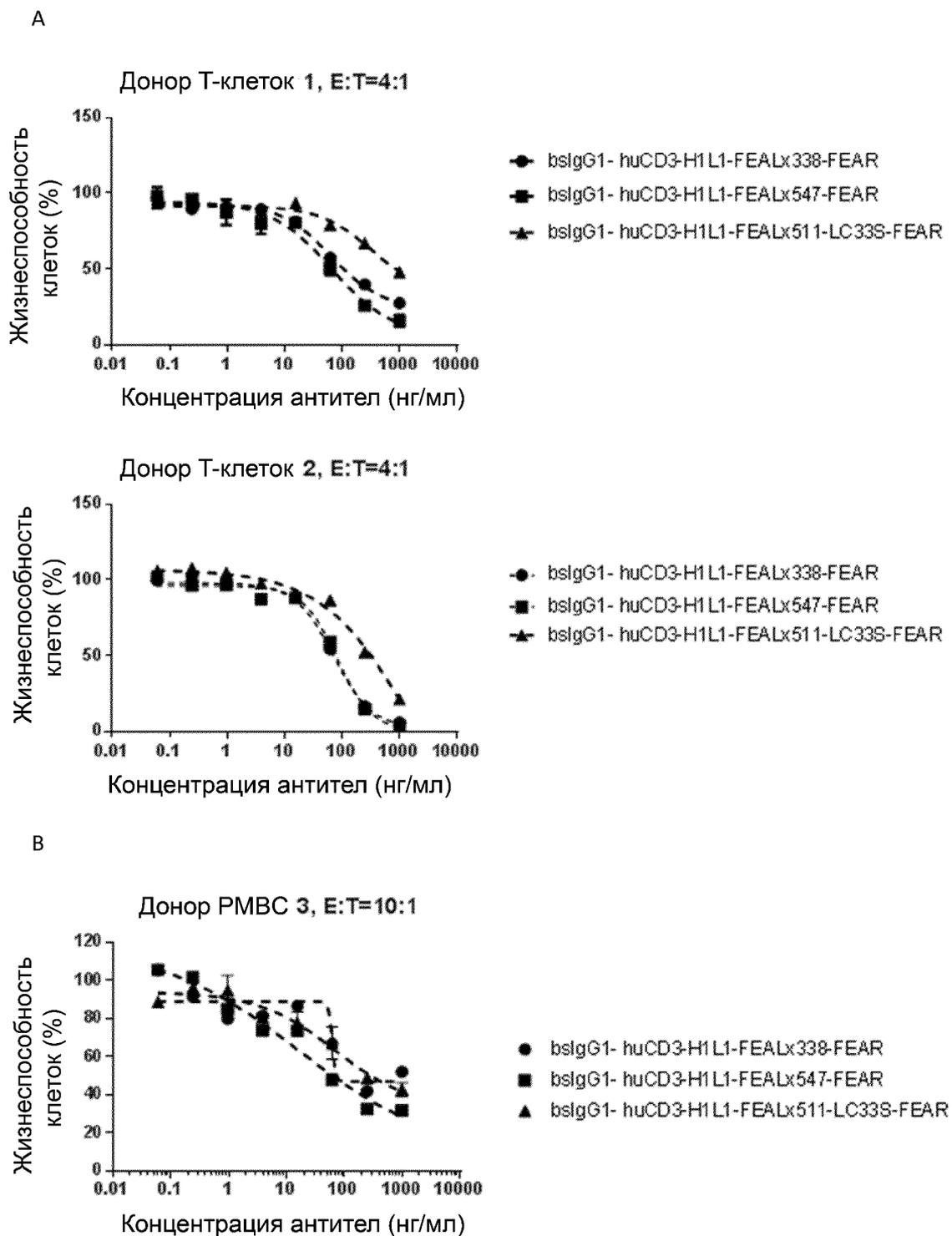
B



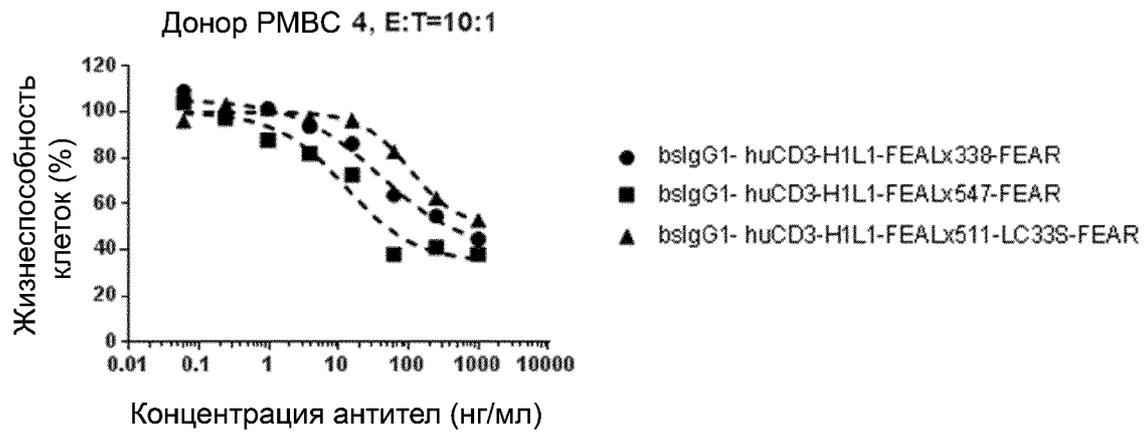
C



Фиг. 7

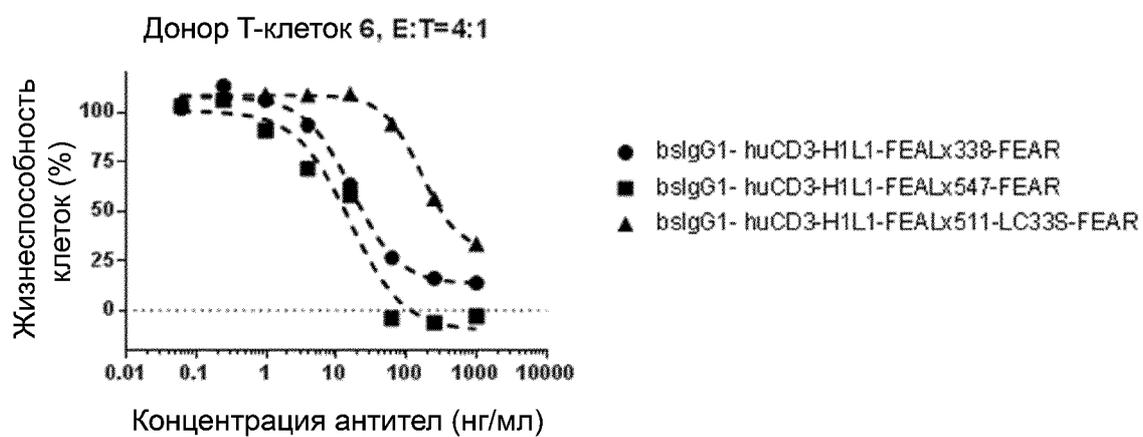
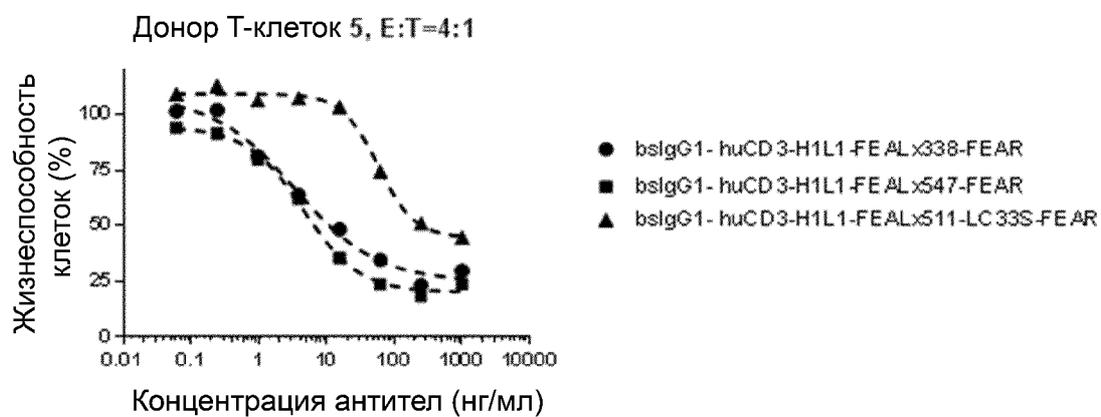


Фиг. 8

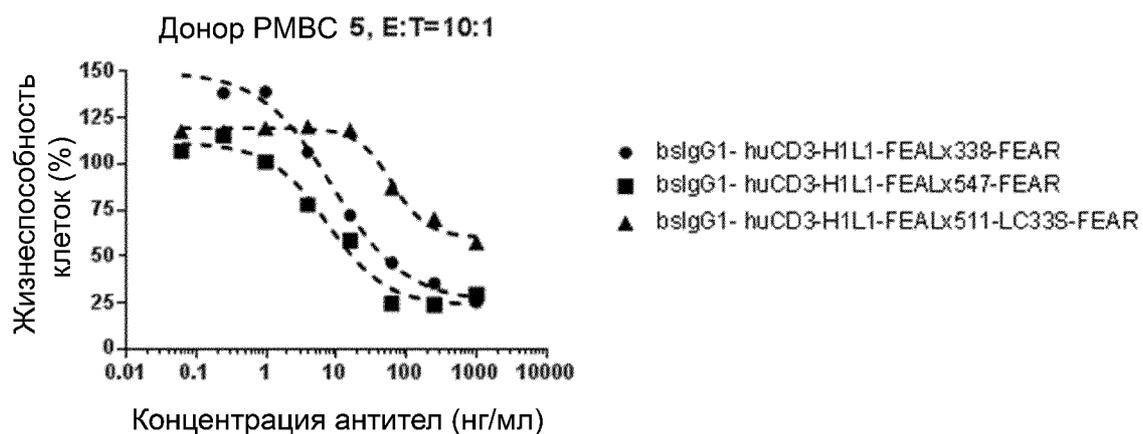


ФИГ. 8 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

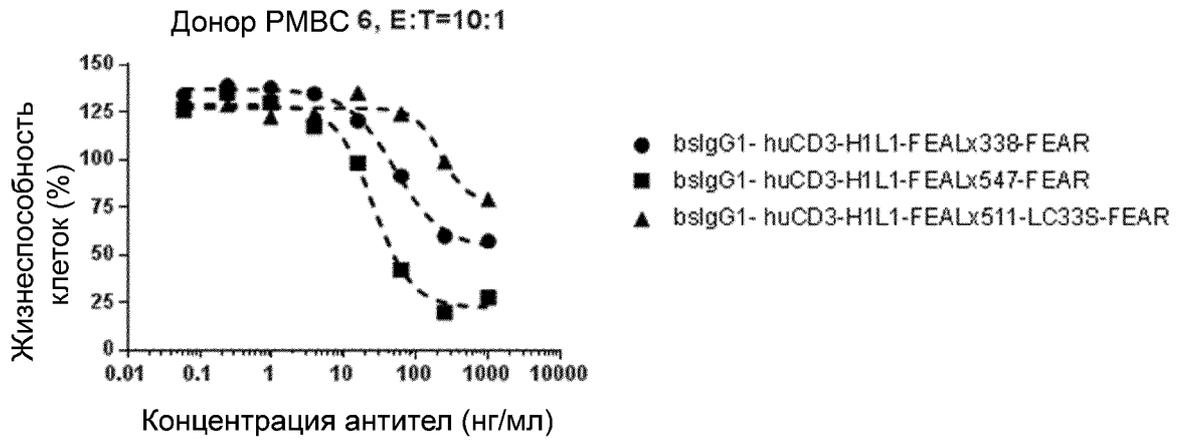
A



B

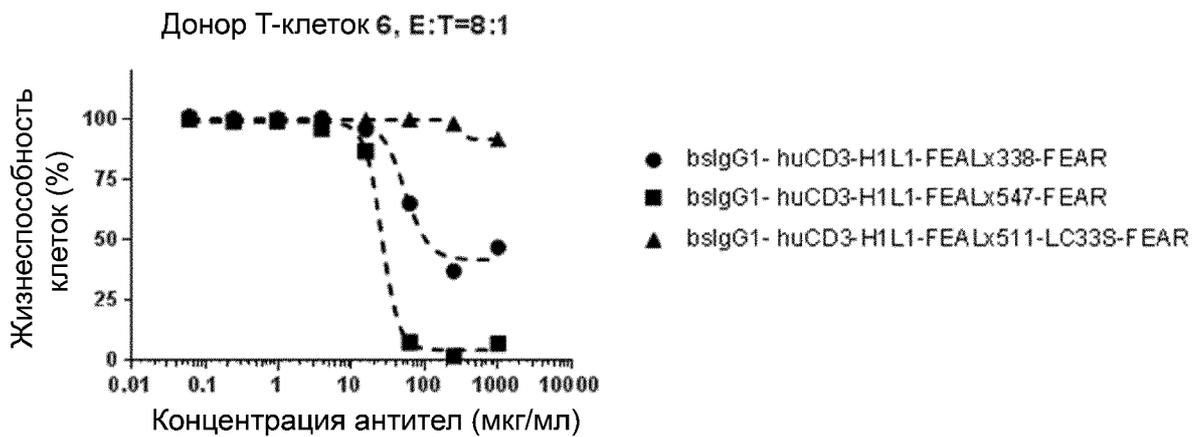
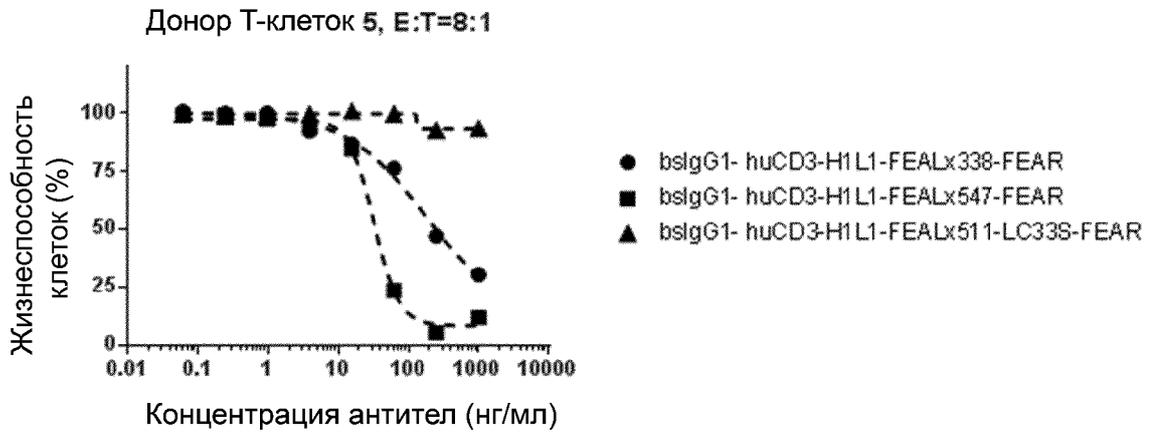


Фиг. 9

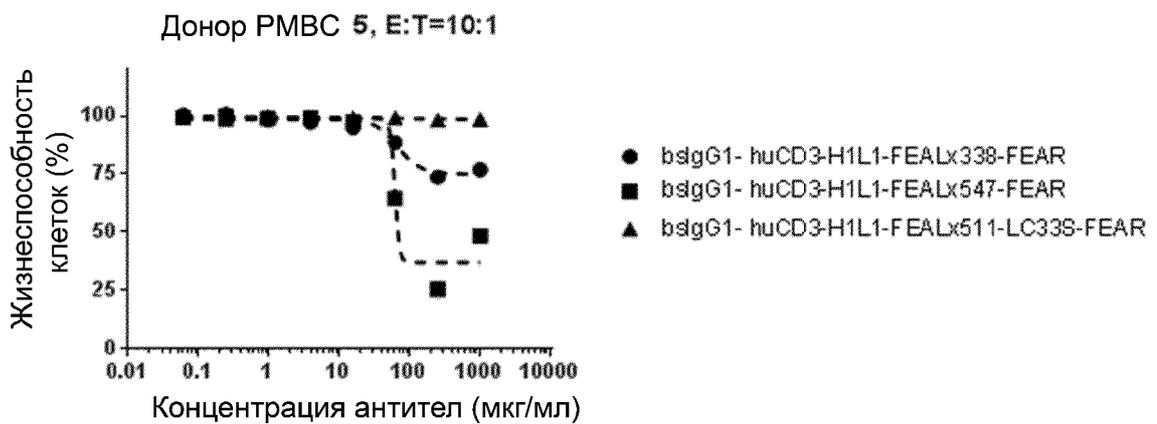


Фиг. 9 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)

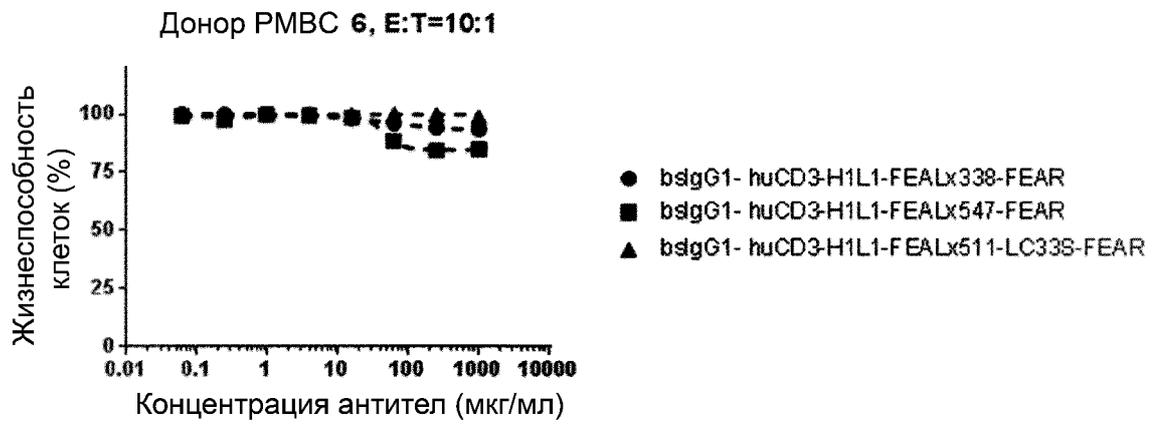
A



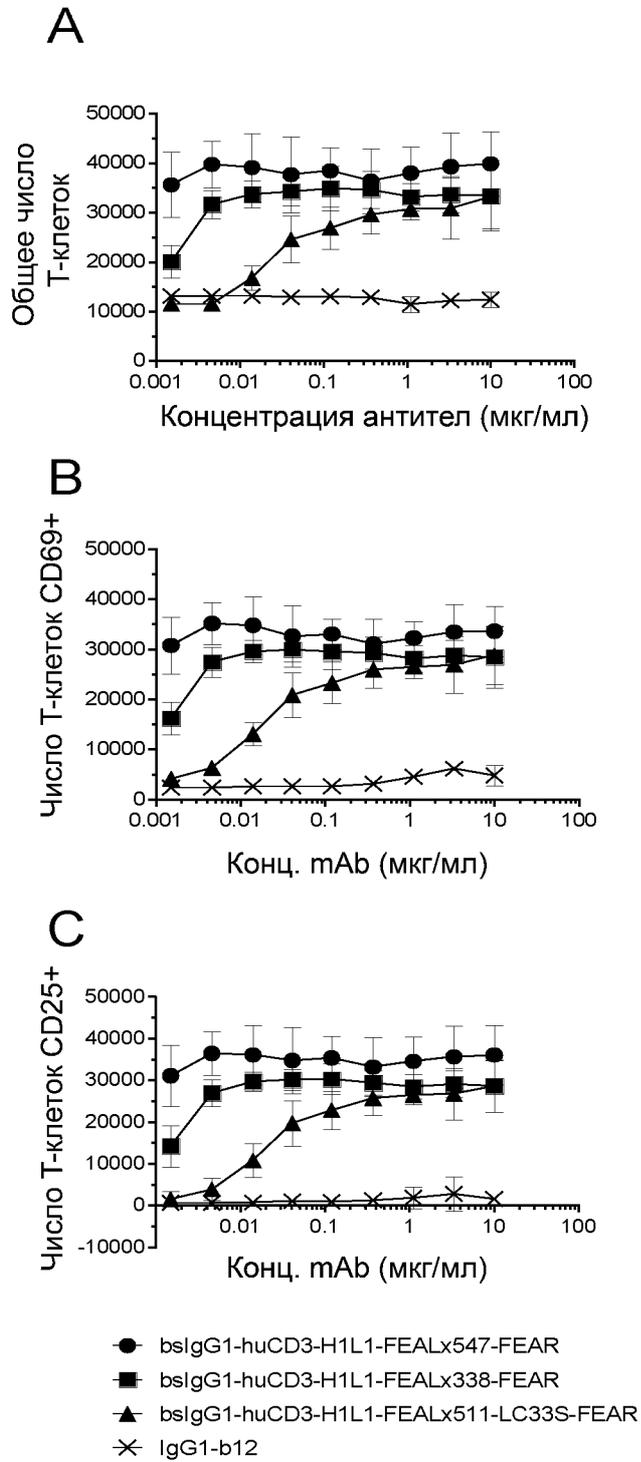
B



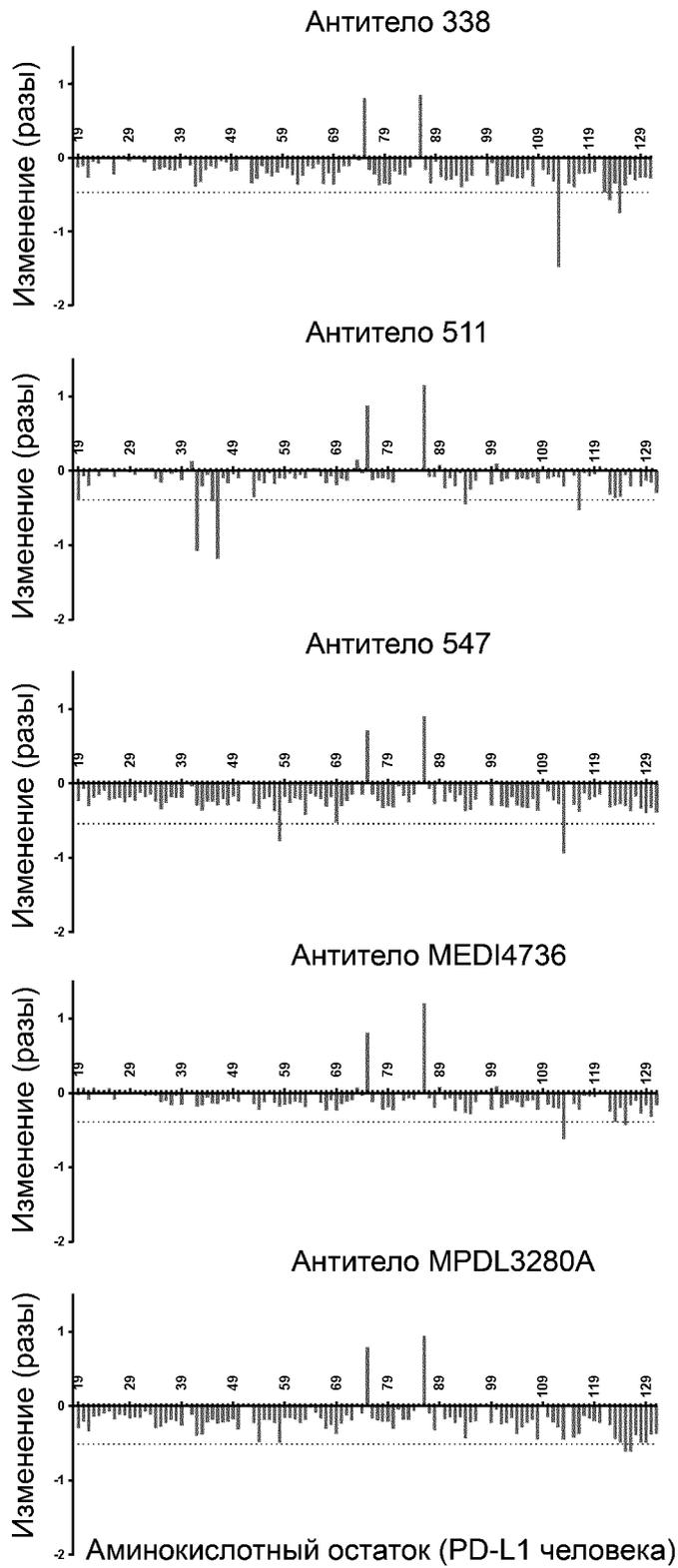
Фиг. 10



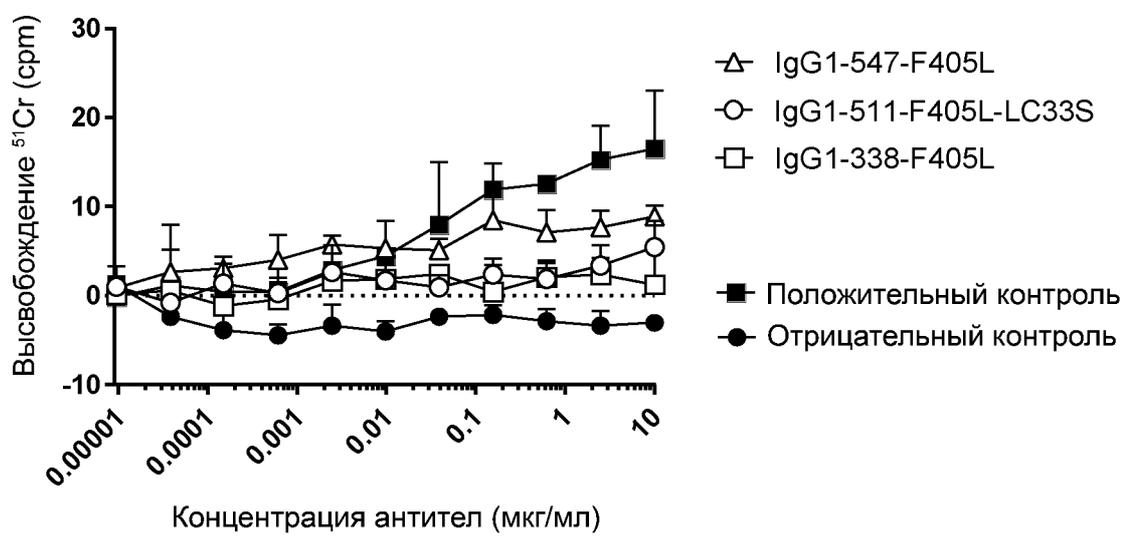
Фиг. 10 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



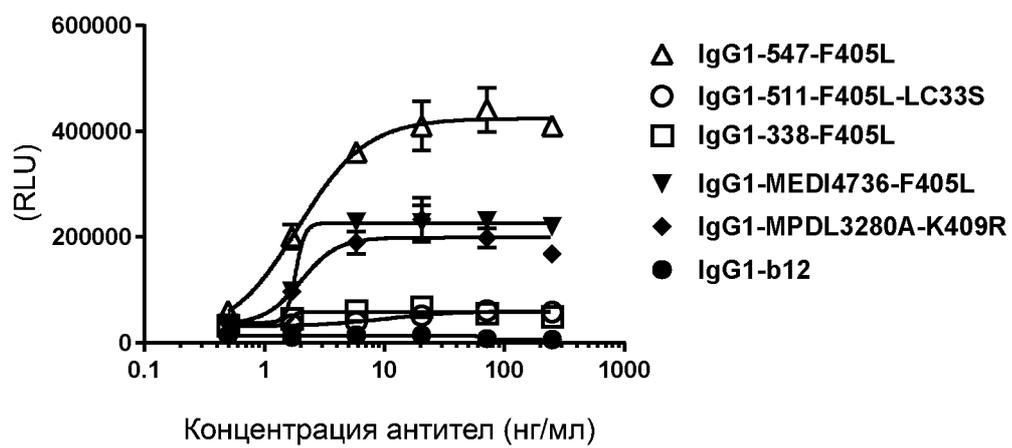
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14