

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041346**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.12

(21) Номер заявки
201892748

(22) Дата подачи заявки
2017.06.13

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К PD-L1 И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 201610414226.5; PCT/CN2017/072566

(32) 2016.06.13; 2017.01.25

(33) CN

(43) 2019.11.29

(86) PCT/CN2017/088033

(87) WO 2017/215590 2017.12.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АЙ-МАБ БИОФАРМА ЮЭС
ЛИМИТЕД (US)**

(72) Изобретатель:
**Фан Лэй, Ван Чжэнъи, Гуо Бинши,
Цзан Цзинъю (CN)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) ZHOU, Y. "Preparation and characterization of three novel monoclonal antibodies against human PD-L1." Chinese Master's Theses Full-text Database Medicine and Health Sciences., 15 June 2012 (2012-06-15), E059-189

SUN, J. "Preparation and characterization of three novel monoclonal antibodies against human PD-L1." Chinese Doctoral Dissertations & Master's Theses Full-text Database (Master) Medicine and Health Sciences., 15 December 2006 (2006-12-15), E059-242

WO-A2-2007005874

WO-A1-2016024228

CN-A-105461808

BOYERINAS, B. et al. "Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Activity of a Novel Anti-PD-L1 Antibody Avelumab (MSB0010718C) on Human Tumor Cells." Cancer Immunology Research., Vol. 3, No. 10, 26 May 2015 (2015-05-26), Pages 1148-1157

LI, B. et al. "Cloning, prokaryotic expression of human PD-L1 and preparation of its antibody." MedJ Chin PLA., Vol. 35, No. 8, 01 August 2010 (2010-08-01), Pages 997-999

(57) Предложены к PD-L1 или их фрагменты. Антитела или их фрагменты специфически связываются с иммуноглобулиновым С-доменом белка PD-L1. Согласно различным примерам антитела или их фрагменты содержат CDR1 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2, CDR3 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 3, CDR1 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 6, или вариантов каждой из них. Настоящее изобретение также относится к способам применения антител или их фрагментов для лечения и диагностики заболеваний, таких как рак и инфекционные заболевания.

041346 B1

041346 B1

Уровень техники

Лиганд запрограммированный гибели клеток 1 (PD-L1), также известный как кластер дифференцировки 274 (CD274) или гомолог 1 B7 (B7-H1), представляет собой трансмембранный белок 1 типа с молекулярной массой 40 кДа, который, как полагают, играет основную роль в подавлении иммунной системы во время конкретных событий, таких как беременность, пересадка аллотрансплантатов тканей, аутоиммунное заболевание и другие патологические состояния, такие как гепатит. Связывание PD-L1 с PD-1 или B7.1 передает ингибирующий сигнал, который уменьшает пролиферацию CD8⁺ Т-клеток в лимфатических узлах, и помимо этого PD-1 также способен контролировать накопление Т-клеток, специфических в отношении чужеродных антигенов, в лимфатических узлах за счет апоптоза, который дополнительно опосредуется подавлением активности гена Bcl-2.

Было показано, что активация PD-L1 может приводить к ускользанию разных видов рака от иммунной системы хозяина. Исследование образцов опухолей пациентов с карциномой почек выявило, что высокая экспрессия PD-L1 опухолью была связана с повышенной агрессивностью опухоли и повышенным риском смерти. Многие ингибиторы PD-L1 разрабатываются в качестве средств иммунной онкологической терапии и показывают хорошие результаты в клинических исследованиях. Помимо лечения разных видов рака ингибирование PD-L1 дает перспективы для лечения инфекционных заболеваний. В модели внутриклеточной инфекции на мышах *L. monocytogenes* индуцировали экспрессию белка PD-L1 в Т-клетках, NK-клетках и макрофагах. Блокада PD-L1 (например, с использованием блокирующих антител) привела к увеличению смертности инфицированных мышей. Блокада уменьшала выработку ФНО- α и оксида азота макрофагами, снижала выработку гранзима В NK-клетками и снижала пролиферацию CD8 Т-клеток, специфических в отношении антигена *L. monocytogenes* (но не CD4 Т-клеток). Это свидетельствует о том, что PD-L1 действует как положительная костимулирующая молекула при внутриклеточной инфекции.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к антителу к PD-L1, обладающему высокой аффинностью связывания с белками PD-L1 человека и способному эффективно блокировать взаимодействие PD-L1 с его рецептором PD-1. Также важно отметить, что примеры демонстрируют, что эти антитела к PD-L1 стимулируют иммунный ответ Т-клеток и ингибируют рост опухоли. В отличие от известных антител к PD-L1, которые связываются с V-доменом иммуноглобулина внеклеточной части белка PD-L1, эти антитела связываются с C-доменом иммуноглобулина, в частности, с остатками аминокислот Y134, K162 и N183. Такие антитела к PD-L1 можно применять для терапевтических целей, таких как лечение различных типов рака, а также инфекций, и также можно применять в диагностических и прогностических целях. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело к PD-L1 или его фрагмент, причем указанное антитело или его фрагмент могут специфически связываться с C-доменом иммуноглобулина (Ig C) белка лиганда запрограммированной гибели клеток 1 человека (PD-L1). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения домен Ig C состоит из остатков аминокислот 133-225. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент может связываться с по меньшей мере одним из остатков аминокислот Y134, K162 или N183 белка PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент может связываться с по меньшей мере одним из остатков аминокислот Y134, K162 и N183 белка PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент не связывается с V-доменом иммуноглобулина (Ig V) белка PD-L1, причем указанный домен Ig V состоит из остатков аминокислот 19-127.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело к PD-L1 или его фрагмент, причем указанное антитело или его фрагмент обладает специфичностью в отношении белка лиганда рецептора запрограммированной гибели клеток 1 человека (PD-L1) и содержит гипервариабельный участок (CDR) 1 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2, CDR3 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 3, CDR1 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 6. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент дополнительно содержит константную область тяжелой цепи, константную область легкой цепи, область Fc или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения константная область легкой цепи представляет собой константную область каппа-цепи или лямбда-цепи. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент относится к изотипу IgG, IgM, IgA, IgE или IgD. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения изотип представляет собой IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄. Антитело или его фрагмент представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело, но не ограничивается ими. Согласно одному аспекту антитело или его фрагмент представляет собой гуманизированное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую один или более остатков аминокислот, выбранных из группы, состоящей из (a) Ser в положении 44, (b) Ala в положении 49, (c) Ala в положении 53, (d) Ile в положении 91, (e) Glu в положении 1, (f) Val в по-

ложении 37, (g) Thr в положении 40, (h) Val в положении 53, (i) Glu в положении 54, (j) Asn в положении 77, (k) Arg в положении 94 и (l) Thr в положении 108 в соответствии с нумерацией по Kabat (Kabat) и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент содержит вариательную область тяжелой цепи, содержащую (a) Ser в положении 44, (b) Ala в положении 49, (c) Ala в положении 53 и/или (d) Ile в положении 91 в соответствии с нумерацией по Kabat и их комбинации.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент содержит вариательную область легкой цепи, содержащую один или более остатков аминокислот, выбранных из группы, состоящей из: (a) Ser в положении 22, (b) Gln в положении 42, (c) Ser в положении 43, (d) Asp в положении 60 и (e) Thr в положении 63 в соответствии с нумерацией по Kabat и их комбинаций.

Неограничивающие примеры антитела или его фрагмента включают те, которые содержат вариательную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-26, или пептид, последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-26. Неограничивающие примеры антитела или его фрагмента включают те, которые содержат вариательную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27-33, или пептид, последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27-33. Неограничивающие примеры антитела или его фрагмента включают те, которые содержат вариательную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и вариательную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

Также описаны биологически эквивалентные варианты антител и их фрагментов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело или его фрагмент, причем указанное антитело или его фрагмент обладает специфичностью в отношении белка PD-L1 человека и содержит: (a) CDR1 V_H , имеющий последовательность SEQ ID NO: 1 или варианта SEQ ID NO: 1, содержащего одну замену, делецию или вставку в положении 1, 2 или 5 в SEQ ID NO: 1; (b) CDR2 V_H , имеющий последовательность SEQ ID NO: 2 или варианта SEQ ID NO: 2, содержащего одну замену, делецию или вставку в положении 7, 8, 14 или 15 в SEQ ID NO: 2; (c) CDR3 V_H , имеющий последовательность SEQ ID NO: 3 или варианта SEQ ID NO: 3, содержащего одну замену, делецию или вставку в положении 1, 2, 3, 4, 5 или 6 в SEQ ID NO: 3; (d) CDR1 V_L , имеющий последовательность SEQ ID NO: 4 или варианта SEQ ID NO: 4, содержащего одну замену, делецию или вставку в положении 3 в SEQ ID NO: 4; (e) CDR2 V_L , имеющий последовательность SEQ ID NO: 5 или варианта SEQ ID NO: 5, содержащего одну замену, делецию или вставку в положении 1, 2, 3, 4, 5 или 6 в SEQ ID NO: 5, и (f) CDR3 V_L , имеющий последовательность SEQ ID NO: 6 или варианта SEQ ID NO: 6, содержащего одну замену, делецию или вставку в положении 11 или 2 в SEQ ID NO: 6.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вариант SEQ ID NO: 1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 61-67. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вариант SEQ ID NO: 2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 68-77. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вариант SEQ ID NO: 3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 78-90. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вариант SEQ ID NO: 4 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 91-92. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вариант SEQ ID NO: 5 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 93-105. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вариант SEQ ID NO: 6 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 106-111.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент содержит вариательную область тяжелой цепи, содержащую один или более остатков аминокислот, выбранных из группы, состоящей из (a) Ser в положении 44, (b) Ala в положении 49, (c) Ala в положении 53, (d) Ile в положении 91, (e) Glu в положении 1, (f) Val в положении 37, (g) Thr в положении 40, (h) Val в положении 53, (i) Glu в положении 54, (j) Asn в положении 77, (k) Arg в положении 94 и (l) Thr в положении 108 в соответствии с нумерацией по Kabat и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент содержит вариательную область тяжелой цепи, содержащую (a) Ser в положении 44, (b) Ala в положении 49, (c) Ala в положении 53 и/или (d) Ile в положении 91 в соответствии с нумерацией по Kabat и их комбинации.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент содержит вариательную область легкой цепи, содержащую один или более остатков аминокислот, выбранных из группы, состоящей из: (a) Ser в положении 22, (b) Gln в положении 42, (c) Ser в положении 43, (d) Asp в положении 60 и (e) Thr в положении 63 в соответствии с нумерацией по Kabat и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения также предложена композиция, содержащая антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения также предложена выделенная клетка, содержащая один или более полинуклеотидов, кодирующих антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения и вариантам применения. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения рака или инфекции у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту эффективного количества антитела или его фрагмента согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак представляет собой солидную опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака печени, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака эндометрия, лейкоза, лимфомы, рака поджелудочной железы, мелкоклеточного рака легких, немелкоклеточного рака легких, рака молочной железы, рака уретры, рака головы и шеи, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака пищевода, рака яичников, рака почек, меланомы, рака предстательной железы и рака щитовидной железы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака печени, рака поджелудочной железы, немелкоклеточного рака легких, рака молочной железы, рака уретры, колоректального рака, рака головы и шеи, плоскоклеточного рака, карциномы из клеток Меркеля, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака пищевода, рака яичников, рака почек и мелкоклеточного рака легких. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает введение пациенту второго противоракового терапевтического агента. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения инфекция представляет собой вирусную инфекцию, бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инфекцию.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения рака или инфекции у пациента, нуждающегося в этом, включающий: (а) обработку клетки антителом или его фрагментом согласно настоящему изобретению в условиях *in vitro*; и (b) введение обработанной клетки пациенту. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает, перед этапом (а), выделение клетки у индивидуума. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка выделена у пациента. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка выделена у индивидуума-донора, отличного от пациента. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка представляет собой Т-клетку, неограничивающие примеры которой включают инфильтрирующий опухоль Т-лимфоцит, $CD4^+$ Т-клетку, $CD8^+$ Т-клетку или их комбинацию.

Настоящее изобретение также относится к диагностическим способам и вариантам применения. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ детектирования экспрессии PD-L1 в образце, включающий приведение образца в контакт с антителом или его фрагментом в условиях, в которых антитело или его фрагмент связывается с PD-L1, и детектирование связывания, которое указывает на экспрессию PD-L1 в образце. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения образец содержит опухолевую клетку, опухолевую ткань, инфицированную ткань или образец крови.

Антитела и их фрагменты согласно настоящему изобретению можно применять для получения биспецифических антител. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено выделенное биспецифическое антитело, содержащее фрагмент согласно настоящему изобретению и второй антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью к молекуле на иммунной клетке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения молекула выбрана из группы, состоящей из PD-1, CTLA-4, LAG-3, CD28, CD122, 4-1BB, TIM3, OX-40, OX40L, CD40, CD40L, LIGHT, ICOS, ICOSL, GITR, GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVM или BTLA, CD47 и CD73. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения каждый из фрагмента и второго фрагмента независимо выбран из фрагмента Fab, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) или однодоменного антитела. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифическое антитело дополнительно содержит фрагмент Fc.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано, что HL1210-3 может связываться с PD-L1 человека с высокой аффинностью.

На фиг. 2 показано, что HL1210-3 может эффективно ингибировать связывание PD-L1 человека с PD1 человека.

На фиг. 3 показано, что антитело HL1210-3 может высокоэффективно ингибировать связывание PD-1 на PD-L1, который экспрессирован на клетках млекопитающих.

На фиг. 4 показано, что исследованные антитела к PD-L1 могут стимулировать ответ Т-клеток человека.

На фиг. 5 показана кинетика связывания HL1210-3 с рекомбинантным PD-L1.

На фиг. 6 показано, что все исследованные гуманизированные антитела имели эффективность связывания с PD-L1 человека, сопоставимую с эффективностью химерного антитела.

На фиг. 7 показано, что все исследованные гуманизированные антитела могут связываться с PD-L1, экспрессированным на клетках млекопитающих, так же высокоэффективно как и химерное антитело.

На фиг. 8 показано, что гуманизированное антитело Hu1210-41 может связываться с PD-L1 макаки-резуса с более низкой аффинностью и не может связываться с PD-L1 крысы и PD-L1 мыши.

На фиг. 9 показано, что антитело Hu1210-41 может специфически связываться только с B7-H1 (PD-L1), но не с B7-DC, B7-1, B7-2, B7-H2, PD-1, CD28, CTLA4, ICOS и BTLA.

На фиг. 10 показано, что Hu1210-41 может эффективно ингибировать связывание PD-L1 человека с PD1 человека и B7-1 человека.

На фиг. 11 показано, что Hu1210-41 может эффективно ингибировать связывание PD-L1 человека с PD1 человека и B7-1 человека.

На фиг. 12 показано, что гуманизированные антитела Hu1210-8, Hu1210-9, Hu1210-16, Hu1210-17, Hu1210-21 и Hu1210-36 могут дозозависимым образом стимулировать выработку ИФН- γ и ИЛ-2 в реакции смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ-реакции).

На фиг. 13 показано, что гуманизированные антитела Hu1210-40, Hu1210-41 и Hu1210-17 могут дозозависимым образом стимулировать выработку ИФН- γ в количественном исследовании вторичного иммунного ответа на ЦМВ.

На фиг. 14 показано, что Hu1210-31 в дозе 5 мг/кг может ингибировать рост опухоли на 30% в ксенотрансплантатной модели HCC827-NSG.

На фиг. 15 показано, что антитело Hu1210-41 может дозозависимым образом ингибировать рост опухоли в ксенотрансплантатной модели HCC827-NSG, при этом антитело Hu1210-41 также дозозависимым образом подавляло увеличение массы опухоли.

На фиг. 16 среднее значение связывания представлено как функция экспрессии (в качестве контроля использовали реактивность моноклонального антитела (MAT) к PD-L1) для каждого мутанта PD-L1.

На фиг. 17 проиллюстрированы положения остатков Y134, K162 и N183 (круги), участвующих в связывании с антителом к PD-L1, Hu1210-41.

Подробное описание

Определения.

Следует отметить, что термин, обозначающий элемент в единственном числе, относится к одному или более этих элементов; например, следует понимать, что "антитело" обозначает одно или более антител. Соответственно, в настоящем документе термины в единственном числе, выражения "один или более" и "по меньшей мере один" могут использоваться взаимозаменяемо.

В настоящем документе термин "полипептид" предназначен для включения отдельного "полипептида", а также множества "полипептидов" и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно соединенных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот и не относится к конкретной длине продукта. Соответственно, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, включены в определение "полипептид", и термин "полипептид" можно использовать вместо любого из этих терминов или взаимозаменяемо с ним. Термин "полипептид" также предназначен для обозначения продуктов постэкспрессионных модификаций полипептида, включая, но не ограничиваясь ими, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификацию с применением неприродных аминокислот. Полипептид может происходить из природного биологического источника или может быть получен с помощью рекомбинантной технологии, но не обязательно транслирован с указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, в том числе путем химического синтеза.

В настоящем документе термин "выделенный" ("изолированный") в отношении клеток, нуклеиновых кислот, таких как ДНК или РНК, относится к молекулам, отделенным от других ДНК или РНК, соответственно, которые присутствуют в природном источнике макромолекулы. В настоящем документе термин "выделенный" также относится к нуклеиновой кислоте или пептиду, которые по существу не содержат клеточный материал, вирусный материал или культуральную среду, если они получены с помощью методик рекомбинантной ДНК, или химических предшественников или других химических веществ, если они синтезированы химически. Кроме того, подразумевается, что "выделенная нуклеиновая кислота" включает фрагменты нуклеиновой кислоты, которые не встречаются в природе в виде фрагментов и не будут обнаружены в природном состоянии. В настоящем документе термин "выделенный" также обозначает клетки или полипептиды, которые выделены из других клеточных белков или тканей. Подразумевается, что выделенные полипептиды включают как очищенные, так и рекомбинантные полипептиды.

В настоящем документе термин "рекомбинантный", поскольку он относится к полипептидам или полинуклеотидам, подразумевает форму полипептида или полинуклеотида, которая не встречается в природе, неограничивающий пример которой может быть создан путем комбинирования полинуклеотидов или полипептидов, которые обычно не встречаются вместе.

Термины "гомология" или "идентичность" или "сходство" относятся к сходству последовательностей двух пептидов или двух молекул нуклеиновых кислот. Гомология может быть определена путем сравнения положения в каждой последовательности, которая может быть сопоставлена для целей сравнения. Если положение в сравниваемой последовательности занято аналогичным основанием или аминокислотой, то молекулы являются гомологичными в этом положении. Степень гомологии между последо-

вательностями является функцией числа совпадающих или гомологичных положений, общих для последовательностей. "Неродственная" или "негомологичная" последовательность имеет идентичность менее 40%, хотя предпочтительно менее 25%, с одной из последовательностей согласно настоящему изобретению.

Полинуклеотид или область полинуклеотида (или полипептид или область полипептида) имеет определенный процент (например, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%) "идентичности последовательности" с другой последовательностью, это означает, что в сопоставленных последовательностях этот процент оснований (или аминокислот) одинаков при сравнении двух последовательностей. Такое сопоставление и процент гомологии или идентичности последовательностей могут быть определены с использованием программ, известных в данной области техники, например, описанных в Ausubel et al., eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*. Предпочтительно для сопоставления используют параметры по умолчанию. Одной из программ сопоставления является BLAST с использованием параметров по умолчанию. В частности, программы включают BLASTN и BLASTP, использующие следующие параметры по умолчанию: генетический код=стандартный; фильтр=нет; цепь=обе; отсечение данных=60; ожидание=10; матрица=BLOSUM62; описания=50 последовательностей; сортировать по=наивысшей оценке; базы данных=не избыточные, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+трансляции GenBank CDS+SwissProtein+SPupdate+PIR. Биологически эквивалентные полинуклеотиды представляют собой те, которые имеют указанный выше процент гомологии и кодируют полипептид, имеющий аналогичную или сходную биологическую активность. Термин "эквивалентная нуклеиновая кислота или полинуклеотид" относится к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, имеющую определенную степень гомологии или идентичности последовательности с нуклеотидной последовательностью нуклеиновой кислоты или ее комплементарной цепи. Подразумевается, что гомолог двухцепочечной нуклеиновой кислоты включает нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидную последовательность, которая имеет определенную степень гомологии с нуклеиновой кислотой или ее комплементарной цепью. Согласно одному аспекту гомологи нуклеиновых кислот способны гибридизоваться с нуклеиновой кислотой или ее комплементарной цепью. Аналогичным образом, "эквивалентный полипептид" относится к полипептиду, имеющему определенную степень гомологии или идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью эталонного полипептида. Согласно некоторым аспектам идентичность последовательности составляет по меньшей мере приблизительно 70, 75, 80, 85, 90%, 95, 98 или 99%. Согласно некоторым аспектам эквивалентный полипептид или полинуклеотид имеет одно, два, три, четыре или пять добавлений, делеций, замен и их комбинаций по сравнению с эталонным полипептидом или полинуклеотидом. Согласно некоторым аспектам эквивалентная последовательность сохраняет активность (например, связывание с эпитопом) или структуру (например, солевой мостик) эталонной последовательности.

Реакции гибридизации могут проводиться в условиях различной "жесткости". Обычно реакцию гибридизации в условиях низкой жесткости осуществляют при температуре приблизительно 40°C в приблизительно 10× SSC или в растворе с эквивалентной ионной силой/температурой. Гибридизацию в условиях средней жесткости обычно проводят при приблизительно 50°C в приблизительно 6× SSC, и реакцию гибридизации в условиях высокой жесткости обычно выполняют при приблизительно 60°C в приблизительно 1× SSC. Реакции гибридизации также можно проводить в "физиологических условиях", что хорошо известно специалисту в данной области техники. Неограничивающим примером физиологического условия является температура, ионная сила, pH и концентрация Mg^{2+} , обычно обнаруживаемые в клетке.

Полинуклеотид состоит из конкретной последовательности из четырех нуклеотидных оснований: аденина (A), цитозина (C), гуанина (G), тимина (T) и урацила (U) вместо тимина, если полинуклеотид представляет собой РНК. Соответственно, термин "полинуклеотидная последовательность" является алфавитным представлением молекулы полинуклеотида. Такое алфавитное представление может быть введено в базы данных на компьютере, имеющем центральный процессор, и использовано для приложений биоинформатике, таких как функциональная геномика и поиск гомологии. Термин "полиморфизм" относится к сосуществованию более чем одной формы гена или его части. Часть гена, которая может существовать по меньшей мере в двух разных формах, т.е. в форме двух разных нуклеотидных последовательностей, называется "полиморфной областью гена". Полиморфная область может представлять собой один нуклеотид, значение которого отличается в разных аллелях.

Термины "полинуклеотид" и "олигонуклеотид" используются взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, как дезоксирибонуклеотидов, так и рибонуклеотидов, либо их аналогов. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: ген или фрагмент гена (например, зонд, праймер, метка EST или SAGE), экзоны, интроны, информационная РНК (иРНК), транспортная РНК, рибосомная РНК, рибозимы, к ДНК дцРНК, киРНК, миРНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, зонды и праймеры нуклеиновых кислот.

Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. Если присутствуют модификации нуклеотидной структуры, то они могут быть внесены до или после сборки полинуклеотида. Последовательность нуклеотидов может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, путем конъюгации с помечающим компонентом. Термин также относится как к двухцепочечным, так и к одноцепочечным молекулам. Если иное не указано или не требуется, любой вариант реализации настоящего изобретения, который представляет собой полинуклеотид, включает как двухцепочечную форму, так и каждую из двух комплементарных одноцепочечных форм, которые, как известно или прогнозируется, будут образовывать двухцепочечную форму. Термин "кодировать" применительно к полинуклеотидам, относится к полинуклеотиду, о котором говорят, что он "кодирует" полипептид, если, в своем нативном состоянии или при воздействии способами, хорошо известными специалистами в данной области техники, он может быть транскрибирован и/или транслирован с получением мРНК для полипептида и/или его фрагмента. Антисмысловая цепь является комплементарной цепью такой нуклеиновой кислоты, и на ее основании может быть установлена кодирующая последовательность.

В настоящем документе термин "антитело" или "антигенсвязывающий полипептид" относится к полипептиду или полипептидному комплексу, который специфически распознает и связывается с антигеном. Антитело может представлять собой целое антитело и любой его антигенсвязывающий фрагмент или отдельную цепь. Соответственно, термин "антитело" включает любую молекулу, содержащую белок или пептид, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, обладающую такой биологической активностью как связывание с антигеном. Примеры включают, но не ограничиваются ими, гипервариабельный участок (CDR) тяжелой цепи или легкой цепи или его лигандсвязывающую часть, вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи, константную область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасный участок (FR) или любую его часть, или по меньшей мере одну часть связывающего белка. В настоящем документе термины "фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" относятся к части антитела, такой как $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ и т.п. Независимо от структуры фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознается интактным антителом. Термин "фрагмент антитела" включает аптамеры, шпигельмеры (Spiegelmer®) и диатела. Термин "фрагмент антитела" также включает любой синтетический или генетически модифицированный белок, который действует как антитело, связываясь со специфическим антигеном с образованием комплекса.

"Одноцепочечный вариабельный фрагмент" или " $scFv$ " относится к гибриднему белку вариабельных областей тяжелой цепи (V_H) и легкой цепи (V_L) иммуноглобулинов. Согласно некоторым аспектам области соединены коротким линкерным пептидом, содержащим от 10 до приблизительно 25 аминокислот. Линкер может быть богат глицином для придания гибкости, а также серином или треонином для растворимости и может соединять либо N-конец V_H с C-концом V_L , либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и введение линкера. Молекулы $scFv$ известны в данной области техники и описаны, например, в патенте США № 5892019.

Термин "антитело" включает различные общие классы полипептидов, которые могут быть различены биохимически. Специалисты в данной области техники поймут, что тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ , μ , α , δ и ϵ), при этом среди них выделяют несколько подклассов (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Именно структура этой цепи определяет "класс" антитела как IgG , IgM , IgA , IgG или IgE , соответственно. Подклассы иммуноглобулинов (изотипы), например, IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , IgG_4 , IgG_5 и т.д., хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию. Специалист с данной области техники легко различит модифицированные варианты каждого из этих классов в контексте настоящего изобретения и, соответственно, они находятся в пределах объема настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов очевидным образом находятся в пределах объема настоящего изобретения, обсуждение ниже в целом будет направлено на класс IgG молекул иммуноглобулинов. Что касается IgG , стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 дальтон и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи обычно соединены дисульфидными связями в "Y"-конфигурации, в которой легкие цепи удерживают тяжелые цепи, начиная от устья "Y" и на всем протяжении вариабельной области.

Антитела, антигенсвязывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, полиспецифические, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитопсвязывающие фрагменты, например Fab , Fab' и $F(ab')_2$, Fd , Fv , одноцепочечные Fv ($scFv$), одноцепочечные антитела, дисульфидсоединенные Fv ($sdFv$), фрагменты, содержащие либо домен V_K , либо домен V_H , фрагменты, полученные с помощью библиотеки экспрессии Fab , и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-N-антитела к антителам к LIGHT, описанным в настоящем изобретении). Молекулы иммуноглобулинов или антител согласно настоящему изобретению могут относиться к любому типу (например, IgG , IgE , IgM , IgD , IgA и IgY), классу (например, IgG_1 , IgG_2 ,

IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂) или подклассу молекулы иммуноглобулина. Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда (κ , λ). Каждый класс тяжелой цепи может быть связан с легкой каппа-цепью или лямбда-цепью. В целом, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, и "хвостовые" части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, если иммуноглобулины получают с помощью гибридом, В-клеток или генетически модифицированных клеток-хозяев. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности простираются от N-конца на разветвленных концах Y-конфигурации до C-конца в нижней части каждой цепи.

Как легкие, так и тяжелые цепи делятся на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константный" и "вариабельный" используются функционально. В связи с этим следует понимать, что вариабельные домены частей легкой (V_L) и тяжелой (V_H) цепей определяют распознавание и специфичность в отношении антигена. Напротив, константные домены легкой цепи (C_L) и тяжелой цепи (C_{H1}, C_{H2} или C_{H3}) придают важные биологические свойства, такие как секреция, способность пересекать плаценту, связывание рецептора Fc, связывание комплемента и тому подобное. Общепринято, что нумерация доменов константной области увеличивается по мере удаления от антигенсвязывающего сайта или аминоконца антитела. N-концевая часть представляет собой вариабельную область, и C-концевая часть представляет собой константную область; домены C_{H3} и C_L фактически содержат карбокси-конец тяжелой и легкой цепей, соответственно.

Как указано выше, вариабельная область позволяет антителу селективно распознавать и специфически связывать эпитопы на антигенах. Иными словами, домен V_L и домен V_H , или подгруппа гипервариабельных участков (CDR), антитела объединяются с образованием вариабельной области, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Такая четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно, антигенсвязывающий сайт определяется тремя CDR на каждой из цепей V_H и V_L (т.е. CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). В некоторых случаях, например, в определенных молекулах иммуноглобулинов, происходящих из видов верблюдовых или созданных на основе иммуноглобулинов верблюдовых, полная молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей без легких цепей. См., например, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993).

В природных антителах шесть "гипервариабельных участков" или "CDR", присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот, которые специфично расположены для образования антигенсвязывающего домена, поскольку в водной среде антитело принимает трехмерную конфигурацию. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые "каркасными" участками, проявляют меньшую межмолекулярную изменчивость. Каркасные участки в основном принимают конформацию β -слоя, и CDR образуют петли, которые соединяют, и в некоторых случаях образуют ее часть, структуру β -листа. Соответственно, каркасные участки образуют каркас, который обеспечивает расположение CDR в правильной ориентации за счет межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный правильно расположенными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Такая комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с его когнатным эпитопом. Средний специалист в данной области техники легко сможет осуществить выравнивание аминокислот, составляющих CDR и каркасные участки, соответственно, для любой данной вариабельной области тяжелой цепи или легкой цепи, поскольку они были точно определены (см. "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); и Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)).

В том случае, если есть два или более определений термина, который используется и/или принят в данной области техники, определение термина, используемое в настоящем документе, предназначено для включения всех таких значений, если явно не указано иное. Конкретным примером является использование термина "участок, определяющий комплементарность" ("CDR") для описания несмежных антигенсвязывающих сайтов, обнаруженных в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепей. Этот конкретный участок был описан Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) и Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Определения CDR в соответствии с Kabat и Chothia включают перекрывающиеся или подгруппы остатков аминокислот при сравнении друг с другом. Тем не менее, подразумевается, что применение любого определения для обозначения CDR антитела или его вариантов находится в пределах объема термина, определенного и используемого в настоящем документе. Соответствующие остатки аминокислот, которые включают CDR, определенные в каждом из цитируемых выше источников, указаны в таблице ниже для сравнения. Точные номера остатков, которые охватывают конкретный CDR, будут варьировать в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники смогут определить в рабочем порядке, какие остатки составляют конкретный CDR, учитывая аминокислотную последовательность вариабельной области антитела.

	Kabat	Chothia
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

Kabat et al., также установили систему нумерации для последовательностей переменных доменов, которая применима к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначно сопоставить такую систему "нумерации по Kabat" с любой последовательностью переменного домена, не полагаясь на какие-либо экспериментальные данные, помимо самой последовательности. В настоящем документе термин "нумерация по Kabat" относится к системе нумерации, изложенной Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983).

В дополнение к таблице выше система нумерации по Kabat описывает участки CDR следующим образом: CDR-H1 начинается приблизительно с аминокислоты 31 (т.е. приблизительно 9 остатков после первого остатка цистеина), включает приблизительно 5-7 аминокислот и заканчивается у следующего остатка триптофана. CDR-H2 начинается с пятнадцатого остатка после конца CDR-H1, включает приблизительно 16-19 аминокислот и заканчивается у следующего остатка аргинина или лизина. CDR-H3 начинается приблизительно с тридцать третьего остатка аминокислоты после конца CDR-H2, включает 3-25 аминокислот и заканчивается у последовательности W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту. CDR-L1 начинается приблизительно с остатка 24 (т.е. после остатка цистеина), включает приблизительно 10-17 остатков и заканчивается у следующего остатка триптофана. CDR-L2 начинается приблизительно с шестнадцатого остатка после конца CDR-L1 и включает приблизительно 7 остатков. CDR-L3 начинается приблизительно с тридцать третьего остатка после конца CDR-L2 (т.е. после остатка цистеина), включает приблизительно 7-11 остатков и заканчивается у последовательности F или W-G-X-G, где X представляет собой любую аминокислоту.

Антитела, раскрытые в настоящем документе, могут происходить из любого животного, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела представляют собой человеческие антитела, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения переменная область может происходить из хрящевых рыб (например, акул). В настоящем документе термин "константная область тяжелой цепи" включает аминокислотные последовательности, происходящие из тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи, содержит по меньшей мере одно из: домена CH1, шарнирного (например, верхнего, среднего и/или нижнего шарнирного домена) домена, домена CH2, домена CH3 или его варианта или фрагмента. Например, антигенсвязывающий полипептид для применения в настоящем изобретении может содержать полипептидную цепь, содержащую домен CH1; полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен CH2; полипептидную цепь, содержащую домен CH1 и домен CH3; полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен CH3, или полипептидную цепь, содержащую домен CH1, по меньшей мере часть шарнирного домена, домен CH2 и домен CH3. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения полипептид согласно настоящему изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую домен CH3. Кроме того, антитело для применения в настоящем изобретении может не содержать по меньшей мере часть домена CH2 (например, весь или часть домена CH2). Как указано выше, специалист в данной области техники поймет, что константная область тяжелой цепи может быть модифицирована так, что она отличается по аминокислотной последовательности от природной молекулы иммуноглобулина.

Константная область тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе, может происходить из разных молекул иммуноглобулина. Например, константная область тяжелой цепи полипептида может содержать домен CH1, происходящий из молекулы IgG₁, и шарнирную область, происходящую из молекулы IgG₃. В другом примере константная область тяжелой цепи может содержать шарнирную область, происходящую частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₃. В другом примере участок тяжелой цепи может содержать химерную шарнирную область, происходящую частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₄.

В настоящем документе термин "константная область легкой цепи" включает аминокислотные последовательности, происходящие из легкой цепи антитела. Предпочтительно константная область легкой цепи содержит по меньшей мере один из константного каппа-домена или константного лямбда-домена.

"Пара легкая цепь-тяжелая цепь" относится к группе легкой цепи и тяжелой цепи, которые могут образовывать димер за счет дисульфидной связи между доменом CL легкой цепи и доменом CH1 тяжелой цепи.

Как указывалось ранее, структуры субъединиц и трехмерная конфигурация константных областей

различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. В настоящем документе термин "домен V_H" включает amino-концевой вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, и термин "домен CH1" включает первый (наиболее amino-концевой) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Домен CH1 является смежным с доменом V_H и amino-концевым относительно шарнирной области тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина.

В настоящем документе термин "домен CH2" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, от приблизительно остатка 244 до остатка 360 антитела в соответствии со стандартными схемами нумерации (остатки с 244 по 360, система нумерации по Kabat, и остатки 231-340, система нумерации EC, см. Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)). Домен CH2 уникален тем, что он не спарен прочно с другим доменом. Напротив, две N-соединенные разветвленные углеводные цепи расположены между двумя доменами CH2 интактной нативной молекулы IgG. Также хорошо документировано, что домен CH3 простирается от домена CH2 до C-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

В настоящем документе термин "шарнирная область" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая присоединяет домен CH1 к домену CH2. Шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, что обеспечивает независимое перемещение двух N-концевых антигенсвязывающих областей. Шарнирные области можно подразделить на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux et al., J. Immunol 161:4083 (1998)).

В настоящем документе термин "дисульфидная связь" включает ковалентную связь, образованную между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик со второй тиольной группой. В большинстве природных молекул IgG области CH1 и СК связаны дисульфидной связью, и две тяжелые цепи соединены двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 в соответствии с системой нумерации по Kabat (положение 226 или 229, система нумерации EC).

В настоящем документе термин "химерное антитело" будет означать любое антитело, в котором иммунореактивная область или сайт получены или происходят из первого вида и константная область (которая может быть интактной, частичной или модифицированной в соответствии с настоящим изобретением) получена из второго вида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения область или сайт связывания мишени будут получены из источника, отличного от человека (например, мыши или примата), и константная область представляет собой константную область человека.

В настоящем документе термин "процент гуманизации" рассчитывают путем определения количества различающихся аминокислот в каркасе (т.е. различия, без учета CDR) между гуманизированным доменом и доменом зародышевой линии, вычитания этого количества из общего количества аминокислот, последующего деления результата на общее количество аминокислот и умножения на 100.

Под "специфически связывается" или "обладает специфичностью в отношении" обычно подразумевают, что антитело связывается с эпитопом за счет его антигенсвязывающего домена и что связывание включает некоторую степень комплементарности между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно этому определению считается, что антитело "специфически связывается" с эпитопом, если оно связывается с этим эпитопом за счет его антигенсвязывающего домена легче, чем оно будет связываться со случайным, неродственным эпитопом. В настоящем документе термин "специфичность" используется для определения относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно считать, что антитело "А" обладает более высокой специфичностью в отношении конкретного эпитопа, чем антитело "В", или можно сказать, что антитело "А" связывается с эпитопом "С" с более высокой специфичностью, чем его специфичность связывания с родственным эпитопом "D".

В настоящем документе термины "лечить" или "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, когда целью является предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательных физиологических изменений или нарушений, таких как прогрессирование рака. Благоприятные или желательные клинические результаты включают, но не ограничиваются ими, ослабление симптомов, уменьшение степени тяжести заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, устранение или временное облегчение патологического состояния и ремиссию (частичную или полную), как детектируемые, так и недетектируемые. "Лечение" также может означать увеличение продолжительности выживания по сравнению с ожидаемым выживанием, если лечение не проводится. Нуждающиеся в лечении, включают тех, у кого уже имеется состояние или нарушение, а также тех, кто склонен иметь состояние или нарушение, или тех, у кого состояние или нарушение необходимо предотвратить.

Под "субъектом" или "индивидуумом", или "животным", или "пациентом", или "млекопитающим" подразумевают любого субъекта, в частности, субъекта-млекопитающего, которому необходима диагностика, прогноз или терапия. Субъекты-млекопитающие включают человека, домашних животных, сельскохозяйственных животных и зоопарковых животных, спортивных или домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и т.д.

В настоящем документе выражения, такие как "пациенту, нуждающемуся в лечении" или "субъекту,

нуждающемуся в лечении", включают субъектов, таких как субъекты-млекопитающие, которые получают пользу от введения антитела или композиции согласно настоящему изобретению, применяемой, например, для детектирования, для диагностической процедуры и/или для лечения.

Антитела к PD-L1.

Настоящее изобретение относится к антителам к PD-L1 с высокой аффинностью в отношении белка PD-L1 человека. Исследуемые антитела проявляли сильную связывающую активность и ингибиторную активность, а также пригодны для терапевтических и диагностических вариантов применения.

Белок PD-L1 представляет собой трансмембранный белок 1 типа массой 40 кДа. Его внеклеточная часть включает N-концевой V-домен иммуноглобулина (IgV) (аминокислоты 19-127) и C-концевой C-домен иммуноглобулина (IgC) (аминокислоты 133-225). PD-1 и PD-L1 взаимодействуют посредством консервативной фронтальной и боковой сторон своих доменов IgV, аналогично взаимодействию доменов IgV антител и T-клеточных рецепторов. Неудивительно, что все имеющиеся в настоящее время антитела к PD-L1 связываются с доменом IgV, что может нарушать связывание PD-1 с PD-L1. Поэтому удивительным и неожиданным открытием настоящего изобретения является то, что антитела, такие как многие, описанные в настоящем документе, которые связываются с доменом IgC белка PD-L1, все еще могут эффективно и, возможно, даже более этого, ингибировать PD-L1, что приводит к еще большему улучшению терапевтических эффектов.

Соответственно, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложено антитело к PD-L1 или его фрагмент, причем указанное антитело или его фрагмент может специфически связываться с C-доменом иммуноглобулина (Ig C) белка лиганда запрограммированной гибели клеток 1 человека (PD-L1). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения домен Ig C состоит из остатков аминокислот 133-225.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент может связываться с по меньшей мере одним из остатков аминокислот Y134, K162 или N183 белка PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент может связываться с по меньшей мере двумя из остатков аминокислот Y134, K162 или N183 белка PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент может связываться с по меньшей мере одним из остатков аминокислот Y134, K162 и N183 белка PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент не связывается с V-доменом иммуноглобулина (Ig V) белка PD-L1, причем указанный домен Ig V состоит из остатков аминокислот 19-127. В соответствии с одним вариантом реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое содержит переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи с участками CDR, определенными в SEQ ID NO: 1-6.

Таблица 1. Последовательности участков CDR

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR1 V _H	<u>SYDMS</u>	1
CDR2 V _H	<u>TISDGGGYIYSDSVKG</u>	2
CDR3 V _H	<u>EFGKRYALDY</u>	3
CDR1 V _L	<u>KASQDVTPAVA</u>	4
CDR2 V _L	<u>STSSRYT</u>	5
CDR3 V _L	<u>QQHYTTPLT</u>	6

Как продемонстрировано в экспериментальных примерах, антитела, которые содержали указанные участки CDR, будь то мышиные, гуманизированные или химерные, обладали сильной связывающей активностью и ингибиторной активностью в отношении PD-L1. Дальнейшее компьютерное моделирование свидетельствовало о том, что определенные остатки в CDR могут быть модифицированы для сохранения или улучшения свойства антител. Такие остатки называются "горячие точки", которые подчеркнуты в табл. 1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело к PD-L1 согласно настоящему изобретению содержит CDR V_H и CDR V_L, перечисленные в табл. 1, с одной, двумя или тремя дополнительными модификациями. Такие модификации могут представлять собой добавление, делецию или замену аминокислот.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модификация представляет собой замену не более чем в одном положении горячей точки каждого из CDR. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модификация представляет собой замену в одном, двух или трех таких положениях горячих точек. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения модификация представляет собой замену в одном из положений горячей точки. Такие замены, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, представляют собой консервативные замены.

"Консервативная замена аминокислоты" представляет собой такую замену, при которой остаток аминокислоты заменен остатком аминокислоты, имеющим сходную боковую цепь. Семейства остатков аминокислот, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, ас-

парагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Соответственно, остаток заменимой аминокислоты в полипептиде иммуноглобулина предпочтительно заменен другим остатком аминокислоты из того же семейства боковых цепей. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения цепь аминокислот может быть заменена структурно сходной цепью, которая отличается порядком и/или составом членов семейства боковых цепей.

Неограничивающие примеры консервативных замен аминокислот представлены в таблице ниже, где оценка сходства 0 или выше указывает на консервативную замену между двумя аминокислотами.

Таблица 2. Матрица сходства аминокислот

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	1	1	2	3	6										
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

Таблица 3. Консервативные замены аминокислот

Для аминокислот	Замена
Аланин	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
Аргинин	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Аспарагин	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Аспарагиновая кислота	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Цистеин	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
Глутамин	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Глутаминовая кислота	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Глицин	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala

Изолейцин	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лейцин	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Лизин	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Метионин	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Фенилаланин	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Пролин	D-Pro
Серин	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
Треонин	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Тирозин	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Валин	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

Конкретные примеры CDR с подходящими заменами представлены в SEQ ID NO: 61-111 из примера 11. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, соответственно, антитело согласно настоящему изобретению содержит CDR1 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1 или любой из 61-67. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению содержит CDR2 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2 или любой из 68-77. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению содержит CDR3 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1 или любой из 78-90. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению содержит CDR1 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 4 или любой из 91-92. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению содержит CDR2 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5 или любой из 93-105. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело согласно настоящему изобретению содержит CDR3 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 6 или любой из 106-110.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент содержит не более одной, не более двух или не более трех из вышеуказанных замен. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент содержит CDR1 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1 или любой из SEQ ID NO: 61-67, CDR2 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2, CDR3 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 3, CDR1 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 6.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент содержит CDR1 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2 или любой из SEQ ID NO: 68-77, CDR3 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 3, CDR1 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 6.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент содержит CDR1 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2, CDR3 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 3 или любой из SEQ ID NO: 78-90, CDR1 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 6.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент содержит CDR1 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2, CDR3 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 3, CDR1 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 4 или любой из SEQ ID NO: 91-92, CDR2 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 6.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент содержит CDR1 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2, CDR3 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 3, CDR1 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5 или любой из SEQ ID NO: 93-105, и CDR3 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 6.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело или его фрагмент содержит CDR1 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 2, CDR3 V_H, имеющий последовательность SEQ ID NO: 3, CDR1 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 V_L, имеющий последовательность SEQ ID NO: 6 или любой из SEQ ID NO: 106-111.

Неограничивающие примеры V_H представлены в SEQ ID NO: 7-26 и 113, из которых SEQ ID

NO: 113 представляет собой V_H мыши, и SEQ ID NO: 7-26 являются гуманизированными. Кроме того, среди гуманизированных V_H SEQ ID NO: 9-15, 17-21 и 23-26 содержат одну или более обратных мутаций к мышинному варианту. Аналогичным образом, неограничивающие примеры V_L (V_K) представлены в SEQ ID NO: 27-33. SEQ ID NO: 28 и 30 представляют собой исходные CDR-привитые гуманизированные последовательности, как показано в примерах. SEQ ID NO: 29 и 31-33 представляют собой гуманизированные V_L с обратными мутациями.

Показано, что обратные мутации могут быть подходящими для сохранения определенных характеристик антител к PD-L1. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению, в частности, человеческие антитела или гуманизированные антитела, содержат одну или более обратных мутаций. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обратная мутация V_H (т.е. включенная аминокислота в указанном положении) представляет собой одну или более мутаций, выбранных из (a) Ser в положении 44, (b) Ala в положении 49, (c) Ala в положении 53, (d) Ile в положении 91, (e) Glu в положении 1, (f) Val в положении 37, (g) Thr в положении 40, (h) Val в положении 53, (i) Glu в положении 54, (j) Asn в положении 77, (k) Arg в положении 94 и (l) Thr в положении 108 в соответствии с нумерацией по Kabat и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обратные мутации выбраны из (a) Ser в положении 44, (b) Ala в положении 49, (c) Ala в положении 53 и/или (d) Ile в положении 91 в соответствии с нумерацией по Kabat и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения обратная мутация V_L представляет собой одну или более мутаций, выбранных из (a) Ser в положении 22, (b) Gln в положении 42, (c) Ser в положении 43, (d) Asp в положении 60 и (e) Thr в положении 63 в соответствии с нумерацией по Kabat и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело к PD-L1 согласно настоящему изобретению содержит V_H , имеющую последовательность SEQ ID NO: 7-26, V_L , имеющую последовательность SEQ ID NO: 27-33, или их соответствующие биологические эквиваленты. Биологический эквивалент V_H или V_L представляет собой последовательность, которая содержит указанные аминокислоты, при этом общая идентичность последовательностей составляет 80, 85, 90, 95, 98 или 99%. Биологический эквивалент SEQ ID NO: 20, например, может представлять собой V_H , общая идентичность последовательности которой с SEQ ID NO: 20 составляет 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, но которая сохраняет CDR (SEQ ID NO: 1-6 или их варианты) и необязательно сохраняет одну или более, или все обратные мутации. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения V_H имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и V_L имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

Специалист в данной области техники также поймет, что антитела, описанные в настоящем документе, могут быть модифицированы так, что они отличаются по аминокислотной последовательности от природного полипептида, из которого они происходят. Например, полипептидная или аминокислотная последовательность, происходящая из указанного белка, может быть сходной, например иметь определенный процент идентичности с исходной последовательностью, например, она может быть на 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентична исходной последовательности.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит аминокислотную последовательность или один или более фрагментов, которые обычно не связаны с антителом. Примерные модификации описаны более подробно ниже. Например, антитело согласно настоящему изобретению может содержать гибкую линкерную последовательность или может быть модифицировано для добавления функционального фрагмента (например, ПЭГ, лекарственного средства, токсина или метки).

Антитела, их варианты или производные согласно настоящему изобретению включают производные, которые модифицированы, т.е. за счет ковалентного присоединения любого типа молекулы к антителу так, что ковалентное присоединение не препятствует связыванию антитела с эпитопом. Например, но не ограничиваясь этим, антитела могут быть модифицированы, например, за счет гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, соединения с клеточным лигандом или другим белком и т.д. Любую из многочисленных химических модификаций можно осуществлять с помощью известных методик, включая, но не ограничиваясь ими, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамина и т.д. Кроме того, антитела могут содержать одну или более неклассических аминокислот.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела могут быть конъюгированы с терапевтическими агентами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологического ответа, фармацевтическими агентами или ПЭГ.

Антитела могут быть конъюгированы или гибридизованы с терапевтическим агентом, который может включать детектируемые метки, такие как радиоактивные метки, иммуномодулятор, гормон, фермент, олигонуклеотид, фотоактивный терапевтический или диагностический агент, цитотоксический агент, который может представлять собой лекарственный препарат или токсин, усиливающий ультразвук агент, нерадиоактивную метку, их комбинацию и другие такие агенты, известные в данной области техники. Антитела можно детектируемо пометить путем их соединения с хемилюминесцентным соединени-

ем. Присутствие меченого хемилюминесцентной меткой антигенсвязывающего полипептида затем определяют путем детектирования присутствия люминесценции, которая возникает в ходе химической реакции. Примерами особенно подходящих соединений для хемилюминесцентной метки являются люминол, изолюминол, ароматический сложный эфир акридина, имидазол, соль акридина и сложный эфир оксалата.

Антитела также могут быть детектируемо помечены с использованием металлов, испускающих флуоресценцию, таких как Eu^{152} или других металлов из ряда лантаноидов. Эти металлы могут быть присоединены к антителу с использованием таких хелатирующих металл групп, как диэтилентриаминпентауксусная кислота (DTPA) или этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA, ЭДТА). Методики конъюгирования различных фрагментов с антителом хорошо известны, см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", в *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", в *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", в *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), и Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* (52:119-58 (1982)) Бифункциональные молекулы PD-L1 является молекулой контрольной точки иммунитета, а также опухолевым антигеном. В качестве молекулы, нацеленной на опухолевый антиген, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфичный в отношении PD-L1, можно комбинировать со вторым антигенсвязывающим фрагментом, специфичным в отношении иммунной клетки, для получения биспецифического антитела.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения иммунная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-клетки, В-клетки, моноцита, макрофага, нейтрофила, дендритной клетки, фагоцита, природной клетки-киллера, эозинофила, базофила и тучной клетки. Молекулы на иммунной клетке, которые могут являться мишенями, включают, например, CD3, CD16, CD19, CD28 и CD64. Другие примеры включают PD-1, CTLA-4, LAG-3 (также известный как CD223), CD28, CD122, 4-1BB (также известный как CD137), TIM3, OX-40 или OX40L, CD40 или CD40L, LIGHT, ICOS/ICOSL, GITR/GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVМ или BTLA (также известный как CD272), иммуноглобулиноподобные рецепторы клеток-киллеров (KTR) и CD47. Конкретные примеры биспецифичности включают, но не ограничиваясь ими, PD-L1/PD-1, PD-L1/LAG3, PD-L1/TIGIT и PD-L1/CD47.

В качестве ингибитора контрольной точки иммунитета антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфичный в отношении PD-L1, можно комбинировать со вторым антигенсвязывающим фрагментом, специфичным в отношении опухолевого антигена, для получения биспецифического антитела. "Опухолевый антиген" представляет собой антигенное вещество, вырабатываемое в опухолевых клетках, т.е. оно вызывает иммунный ответ у хозяина. Опухолевые антигены могут применяться при выявлении опухолевых клеток и являются потенциальными кандидатами для применения в терапии рака. Нормальные белки в организме не являются антигенными. Определенные белки, однако, вырабатываются или гиперэкспрессируются во время опухолеобразования и, соответственно, становятся "чужеродными" для организма. Это может затрагивать нормальные белки, которые хорошо изолированы от иммунной системы, белки, которые обычно вырабатываются в чрезвычайно небольших количествах, белки, которые обычно вырабатываются только на определенных стадиях развития, или белки, структура которых модифицирована вследствие мутации.

В данной области техники известно большое количество опухолевых антигенов, и новые опухолевые антигены можно легко выявить путем скрининга. Неограничивающие примеры опухолевых антигенов включают EGFR, Her2, EpCAM, CD20, CD30, CD33, CD47, CD52, CD133, CD73, CEA, gpA33, муцины, TAG-72, CGX, PSMA, связывающий фолат белок, GD2, GD3, GM2, VEGF, VEGFR, интегрин, $\alpha\text{V}\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, ERBB2, ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP и тенацин.

Согласно некоторым аспектам моновалентный блок обладает специфичностью в отношении белка, который гиперэкспрессирован на опухолевой клетке по сравнению с соответствующей неопухолевой клеткой. В настоящем документе "соответствующая неопухолевая клетка" относится к неопухолевой клетке того же типа, как и клетка, из которой происходит опухолевая клетка. Отмечено, что такие белки не обязательно отличаются от опухолевых антигенов. Неограничивающие примеры включают карциноэмбриональный антиген (CEA), который гиперэкспрессирован в большинстве случаев карциномы толстой кишки, карциномы прямой кишки, карциномы молочной железы, карциномы легких, карциномы поджелудочной железы и карциномы желудочно-кишечного тракта; рецепторы херегулина (HER-2, neu или c-erbB-2), которые часто гиперэкспрессированы при раке молочной железы, раке яичников, раке толстой кишки, раке легких, раке предстательной железы и раке шейки матки; рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), который высокоэкспрессирован в ряде солидных опухолей, включая опухоль молочной железы, опухоль головы и шеи, немелкоклеточную опухоль легких и опухоль предстательной железы; асиалогликопротеиновый рецептор; рецептор трансферрина; рецептор комплекса фермент-

серпин, который экспрессирован на гепатоцитах; рецептор фактора роста фибробластов (FGFR), который гиперэкспрессирован на клетках аденокарциномы протоков поджелудочной железы; рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) для генной терапии против ангиогенеза; рецептор фолата, который селективно гиперэкспрессирован в 90% случаев неслизистой карциномы яичников; гликокаликс клеточной поверхности; рецепторы углеводов; и рецептор полимерного иммуноглобулина, который можно применять для доставки генов к клеткам респираторного эпителия и который является перспективным для лечения заболеваний легких, таких как муковисцидоз. Неограничивающие примеры биспецифичности в этом отношении включают PD-L1/EGFR, PD-L1/Her2, PD-L1/CD33, PD-L1/CD133, PD-L1/CEA и PD-L1/VEGF.

Настоящее изобретение также относится к различным формам биспецифических антител. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения каждый из фрагмента антитела к PD-L1 и второго фрагмента независимо выбран из фрагмента Fab, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv) или однодоменного антитела. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифическое антитело дополнительно содержит фрагмент Fc. Настоящее изобретение также относится к бифункциональным молекулам, которые включают не только антитело или антигенсвязывающий фрагмент. В качестве молекулы, нацеленной на опухолевый антиген, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, специфичный в отношении PD-L1, такие как те, которые описаны в настоящем изобретении, можно комбинировать с иммунным цитокином или лигандом, необязательно посредством пептидного линкера. Присоединенные иммунные цитокины или лиганды включают, но не ограничиваются ими, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ГМ-КСФ, ФНО- α , CD40L, OX40L, CD27L, CD30L, 4-1BBL, LIGHT и GITRL. Такие бифункциональные молекулы могут сочетать эффект блокирования контрольной точки иммунитета с локальной иммунной модуляцией опухолевого очага.

Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения антител.

Настоящее изобретение также относится к выделенным полинуклеотидам или молекулам нуклеиновых кислот (например, SEQ ID NO: 34-60, 112 и 114), кодирующим антитела, их варианты или производные согласно настоящему изобретению. Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать полные вариабельные области тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов. Кроме того, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать части вариабельных областей тяжелой и легкой цепей антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов или производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов. Способы получения антител хорошо известны в данной области техники и описаны в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения как вариабельные, так и константные области антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению полностью человеческие. Полностью человеческие антитела могут быть получены с использованием методик, описанных в данной области техники и описанных в настоящем документе. Например, полностью человеческие антитела против специфического антигена могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для выработки таких антител в ответ на иммунизацию антигеном, но эндогенные локусы которого были деактивированы. Примерные методики, которые можно применять для получения таких антител, описаны в патентах США № 6150584; 6458592; 6420140, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полученные антитела не будут вызывать вредный иммунный ответ у животного, подлежащего лечению, например у человека. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антигенсвязывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему изобретению модифицированы для снижения их иммуногенности с использованием методик, общепринятых в данной области техники. Например, антитела могут быть гуманизированными, приматизированными, деиммунизированными или могут быть получены химерные антитела. Эти типы антител происходят из антитела из вида, отличного от человека, обычно антитела мыши или примата, которое сохраняет или по существу сохраняет антигенсвязывающие свойства исходного антитела, но которое является менее иммуногенным у человека. Это может быть достигнуто с помощью различных способов, включая (а) прививку полноразмерных вариабельных доменов из вида, отличного от человека, на константные области человека для получения химерных антител; (b) прививку по меньшей мере части одного или более из гипервариабельных участков (CDR) из вида, отличного от человека, в каркас человека и константные области с сохранением существенных каркасных остатков или без их сохранения; или (с) трансплантацию полноразмерных вариабельных доменов из вида, отличного от человека, с их "маскировкой" участком, сходным с участком у человека, путем замены поверхностных остатков. Такие способы описаны в Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57:6851-6855 (1984); Morrison et al., Adv. Immunol. 44:65-92 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 25:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun. 31:169-217 (1994), и патенты США № 5585089, 5693761, 5693762 и 6190370, которые все полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Деиммунизацию также можно применять для уменьшения иммуногенности антитела. В настоящем документе термин "деиммунизация" включает изменение антитела для модификации Т-клеточных эпитопов (см., например,

публикации международных заявок на патент WO/9852976 A1 и WO/0034317 A2). Например, исследуют последовательности варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи исходного антитела и создают "карту" Т-клеточного эпитопа человека из каждой V-области, показывающую расположение эпитопов относительно гиперварибельных участков (CDR) и других ключевых остатков в последовательности. Отдельные Т-клеточные эпитопы из карты Т-клеточных эпитопов исследуют для выявления альтернативных замен аминокислот с низким риском изменения активности готового антитела. Разработан ряд альтернативных последовательностей варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи, содержащих комбинации замен аминокислот, и такие последовательности впоследствии включают в ряд связывающих полипептидов. Обычно получают от 12 до 24 вариантов антител и исследуют для оценки связывания и/или функции. Гены полной тяжелой и легкой цепей, содержащих модифицированные варибельные и константные области человека, затем клонируют в векторы экспрессии, и полученные в результате плазмиды вводят в клеточные линии для получения целого антитела. Антитела затем сравнивают в соответствующих биохимических или биологических количественных исследованиях, и выявляют оптимальный вариант.

Специфичность связывания антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению может быть определена с помощью количественных исследований в условиях *in vitro*, таких как иммунопреципитация, радиоиммуноанализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).

Согласно другому варианту методики, описанные для получения одноцепочечных блоков (патент США № 4694778; Bird, Science 242:423-442 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55:5879-5883 (1988); и Ward et al., Nature 334:544-554 (1989)), могут быть адаптированы для получения одноцепочечных блоков согласно настоящему изобретению. Одноцепочечные блоки образуются путем соединения фрагментов тяжелой и легкой цепей области Fv за счет аминокислотного мостика, что приводит к образованию одноцепочечного гибридного пептида. Также можно применять методики для сборки функциональных фрагментов Fv в *E. coli* (Skerra et al., Science 242: 1038-1041 (1988)).

Примеры методик, которые можно применять для получения одноцепочечных Fv (scFv) и антител, включают методики, описанные в патентах США № 4946778 и 5258498; Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., Proc. Natl. Sci. USA 90:1995-1999 (1993); и Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988). Для некоторых вариантов применения, включая применение антител в условиях *in vivo* у человека и количественное детектирование в условиях *in vitro*, предпочтительным может быть применение химерных антител, гуманизированных антител или человеческих антител. Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части антитела происходят из разных видов животных, например антитела, имеющие варибельную область, происходящую из моноклонального антитела мыши, и константную область иммуноглобулина человека. Способы получения химерных антител известны в данной области техники. См., например, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191-202 (1989); патенты США № 5807715; 4816567; и 4816397, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител, происходящие из антитела из вида, отличного от человека, которые связывают желательный антиген, содержащие один или более гиперварибельных участков (CDR) из вида, отличного от человека, и каркасные участки из молекулы иммуноглобулина человека. Часто каркасные остатки в каркасных участках человека заменяются соответствующим остатком из CDR донорного антитела, чтобы изменить, предпочтительно улучшить, связывание антигена. Такие замены каркаса выявляют с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, например путем моделирования взаимодействий CDR и остатков каркаса для выявления остатков каркаса, которые важны для связывания антигена, и сравнения последовательностей для выявления нетипичных остатков каркаса в конкретных положениях. (См., например, Queen et al., патент США № 5585089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988), которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Антитела могут быть гуманизированы с использованием множества методик, известных в данной области техники, включая, например, прививку CDR (EP 239400; публикация PCT WO 91/09967; патенты США № 5225539; 5530101; и 5585089), рекомбинацию поверхностных остатков или изменение поверхности (EP 592106; EP 519596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., Proc. Natl. Sci. USA 91:969-973 (1994)) и перекомпоновку цепей (патент США № 5565332, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки). Полностью человеческие антитела являются особенно желательными для терапевтического лечения пациентов-людей. Человеческие антитела могут быть получены различными способами, известными в данной области техники, включая способы фагового дисплея с использованием библиотек антител, происходящих из последовательностей иммуноглобулинов человека. См. также патенты США № 4444887 и 4716111; и публикации PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741; каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Человеческие антитела также могут быть получены с использованием трансгенных мышей, которые не способны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать гены иммуноглобулинов человека. Например, комплексы генов тяжелой и легкой цепей иммуног-

лобулинов человека могут быть введены случайным образом или путем гомологичной рекомбинации в эмбриональные стволовые клетки мыши. Согласно другому варианту переменная область, константная область и области вариабельности человека могут быть введены в эмбриональные стволовые клетки мыши в дополнение к генам тяжелой и легкой цепей человека. Гены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулинов мыши могут быть сделаны нефункциональными по отдельности или одновременно с введением локусов иммуноглобулина человека путем гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция области JH предотвращает выработку эндогенных антител. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножают и вводят путем микроинъекции в бластоцисты для получения химерных мышей. Затем химерных мышей разводят для получения гомозиготного потомства, которое экспрессирует человеческие антитела. Трансгенных мышей иммунизируют обычным образом отобранным антигеном, например полно-размерным желательным полипептидом-мишенью или его частью. Моноклональные антитела, направленные против антигена, могут быть получены от иммунизированных трансгенных мышей с использованием обычной технологии гибридомы. Трансгены иммуноглобулина человека, которые несут трансгенные мыши, перегруппировываются во время дифференцировки В-клеток и впоследствии подвергаются переключению класса и соматическим мутациям. Соответственно, с помощью указанной методики можно получить терапевтически пригодные антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Для обзора этой технологии получения человеческих антител см. Lonberg and Huszar *Int. Rev. Immunol.* 73:65-93 (1995). Подробное обсуждение этой технологии получения человеческих антител и моноклональных человеческих антител и протоколов получения таких антител приведено, например, в публикациях PCT WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; патентах США № 5413923; 5625126; 5633425; 5569825; 5661016; 5545806; 5814318; и 5939598, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, для получения человеческих антител, направленных против выбранного антигена, с помощью технологии, аналогичной той, которая описана выше, могут быть привлечены такие компании как Abgenix Inc. (Фримонт, Калифорния, США) и GenPharm (Сан-Хосе, Калифорния, США). Полностью человеческие антитела, которые распознают отобранный эпитоп, также можно получить с помощью методики, называемой "направляемый отбор". В этом подходе отобранное моноклональное антитело из вида, отличного от человека, например антитело мыши, применяют для направления отбора полностью человеческие антитела, распознающего тот же эпитоп. (Jespers et al., *Bio/Technology* 72:899-903 (1988). См. также патент США № 5565332, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки).

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения ДНК, кодирующая желательные моноклональные антитела, может быть легко выделена и секвенирована с применением обычных процедур (например, с применением олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител мыши). Выделенные и субклонированные клетки гибридомы служат предпочтительным источником такой ДНК. После выделения ДНК может быть помещена в векторы экспрессии, которые затем трансфецируют в прокариотические или эукариотические клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки линии COS обезьяны, клетки яичника китайского хомяка (CHO) или клетки миеломы, которые в ином случае не вырабатывают иммуноглобулины. Более конкретно, выделенную ДНК (которая может быть синтетической, как описано в настоящем документе) можно применять для клонирования последовательностей константной и переменной областей для изготовления антител, как описано в Newman et al., патент США № 5658570, поданный 25 января 1995 г., который включен в настоящий документ посредством ссылки. По существу этот подход заключается в выделении РНК из отобранных клеток, преобразовании в кДНК и амплификации с помощью ПЦР с применением Ig-специфических праймеров. Праймеры, подходящие для этой цели, также описаны в патенте США № 5658570. Как будет обсуждаться более подробно ниже, трансформированные клетки, экспрессирующие целевое антитело, могут быть выращены в относительно больших количествах, чтобы обеспечить клинические и коммерческие поставки иммуноглобулина.

Кроме того, один или более из CDR антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению могут быть вставлены с помощью обычных методик рекомбинантной ДНК в каркасные участки, например в каркасные участки человека, чтобы гуманизировать антитело из вида, отличного от человека. Каркасные участки могут представлять собой природные или консенсусные каркасные участки и предпочтительно каркасные участки человека (см., например, Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 278:457-479 (1998), где приведен перечень каркасных участков человека). Предпочтительно полинуклеотид, полученный с применением комбинации каркасных участков и CDR, кодирует антитело, которое специфически связывается с по меньшей мере одним эпитопом желательного полипептида, например, LIGHT. Предпочтительно одна или более замен аминокислот могут быть сделаны в каркасных участках, и предпочтительно замены аминокислот улучшают связывание антитела с его антигеном. Кроме того, такие способы можно применять для осуществления замен аминокислот или делеций одного или более остатков цистеина переменной области, которые участвуют в образовании внутрицепочечной дисульфидной связи, чтобы получить молекулы антител, не содержащие одну или более внутрицепочечных дисульфидных связей. Другие изменения полинуклеотида включены в объем настоящего изобретения и находятся в пределах компетентности в данной области техники.

Кроме того, можно применять методики, разработанные для получения "химерных антител" (Morgi-

son et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA:851-855 (1984); Neuberger et al., Nature 372:604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314:452-454 (1985)) путем сплайсинга генов из молекулы антитела мыши, имеющего соответствующую антигенную специфичность, вместе с генами из молекулы человеческого антитела, имеющего соответствующую биологическую активность. В настоящем документе химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части происходят из разных видов животных, например антитела, которые содержат вариабельную область, происходящую из моноклонального антитела мыши, и константную область иммуноглобулина человека. Еще один высокоэффективный способ получения рекомбинантных антител раскрыт в Newman, Biotechnology 10: 1455-1460 (1992). В частности, эта методика позволяет получать приматизированные антитела, которые содержат вариабельные домены обезьян и константные последовательности человека. Этот литературный источник полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, данная методика также описана в патентах США № 5658570, 5693780 и 5756096, принадлежащих одному правообладателю, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно другому варианту клеточные линии, вырабатывающие антитела, могут быть отобраны и культивированы с использованием методик, хорошо известных специалисту в данной области техники. Такие методики описаны в различных лабораторных руководствах и исходных публикациях. В этом отношении методики, подходящие для применения в настоящем изобретении, как описано ниже, описаны в руководстве Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991), которое полностью включено в настоящий документ посредством ссылки, включая дополнения. Кроме того, стандартные методики, известные специалистам в данной области техники, можно применять для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело согласно настоящему изобретению, включая, но не ограничиваясь ими, сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредуемый мутагенез, которые приводят к заменам аминокислот. Предпочтительно варианты (включая производные) кодируют менее 50 замен аминокислот, менее 40 замен аминокислот, менее 30 замен аминокислот, менее 25 замен аминокислот, менее 20 замен аминокислот, менее 15 замен аминокислот, менее 10 замен аминокислот, менее 5 замен аминокислот, менее 4 замен аминокислот, менее 3 замен аминокислот или менее 2 замен аминокислот по сравнению с эталонной вариабельной областью тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, вариабельной областью легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3. Согласно другому варианту мутации могут быть введены случайным образом на протяжении всей кодирующей последовательности или ее части, например, путем насыщающего мутагенеза, и полученные мутантные варианты могут быть подвергнуты скринингу для оценки биологической активности для выявления мутантных вариантов, которые сохраняют активность.

Лечение рака.

Как описано в настоящем документе, антитела, варианты или производные согласно настоящему изобретению можно применять в некоторых способах лечения и диагностики.

Настоящее изобретение дополнительно относится к видам терапии на основе антител, которые включают введение антител согласно настоящему изобретению пациенту, такому как животное, млекопитающее и человек, для лечения одного или более расстройств или состояний, описанных в настоящем документе. Терапевтические соединения согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, антитела согласно настоящему изобретению (включая их варианты и производные, описанные в настоящем документе) и нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, кодирующие антитела согласно настоящему изобретению (включая их варианты и производные, описанные в настоящем документе).

Антитела согласно настоящему изобретению также можно применять для лечения или ингибирования рака. PD-L1 может быть гиперэкспрессирован в опухолевых клетках. PD-L1, происходящий из опухоли, может связываться с PD-1 на иммунных клетках, ограничивая тем самым противоопухолевый Т-клеточный иммунитет. Результаты, полученные с использованием низкомолекулярных ингибиторов или моноклональных антител, нацеленных на PD-L1, в моделях опухолей на мышах, указывают на то, что нацеленная на PD-L1 терапия является важной альтернативой и целесообразным подходом к эффективному контролю роста опухоли. Как показано в экспериментальных примерах, антитела к PD-L1 активировали механизм адаптивного иммунного ответа, который может привести к улучшенной выживаемости у пациентов с раком.

Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены способы лечения рака у пациента, нуждающегося в этом. Способ, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, включает введение пациенту эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере одна из раковых клеток (например, стромальных клеток) у пациента экспрессирует, гиперэкспрессирует или индуцирована для экспрессии PD-L1. Например, индукцию экспрессии PD-L1 можно осуществлять путем введения опухолевой вакцины или радиотерапии.

Опухоли, которые экспрессируют белок PD-L1, включают рак мочевого пузыря, немелкоклеточный рак легких, рак почек, рак молочной железы, рак уретры, колоректальный рак, рак головы и шеи, плоскоклеточный рак, рак из клеток Меркеля, рак желудочно-кишечного тракта, рак желудка, рак пищевода,

рак яичников, рак почек и мелкоклеточный рак легких. Соответственно, антитела согласно настоящему изобретению можно применять для лечения любого одного или более таких видов рака. Настоящее изобретение также относится к видам клеточной терапии, таким как виды терапии на основе Т-клеток, несущих химерный антигенный рецептор (CAR). Можно применять подходящую клетку, которую приводят в контакт с антителом к PD-L1 согласно настоящему изобретению (или в другом варианте модифицируют для экспрессии антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению). После такого контакта или модификации клетка затем может быть введена пациенту с раком, нуждающемуся в лечении. Пациент с раком может иметь рак любого из типов, описанных в настоящем документе. Клетка (например, Т-клетка) может представлять собой, например, инфильтрирующий опухоль Т-лимфоцит, $CD4^+$ Т-клетку, $CD8^+$ Т-клетку или их комбинацию, но не ограничиваясь ими.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка была самостоятельно выделена пациентом (пациенткой) с раком. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетка была предоставлена донором или получена из банка клеток. Если клетка выделена у пациента с раком, нежелательные иммунные реакции могут быть сведены к минимуму.

Дополнительные заболевания или состояния, связанные с увеличенным выживанием клеток, которые можно лечить, предотвратить, диагностировать и/или прогнозировать с помощью антител или их вариантов или производных согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, прогрессирование и/или метастазы злокачественных новообразований и связанных расстройств, таких как лейкоз (включая острые лейкозы (например, острый лимфолейкоз, острый миелолейкоз (включая миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный и эритролейкемический)) и хронические лейкозы (например, хронический миелолейкоз (гранулоцитарный лейкоз) и хронический лимфолейкоз)), болезнь Ослера, лимфомы (например, лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому), множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей и солидные опухоли, включая, но не ограничиваясь ими, саркомы и карциномы, такие как фибросаркома, миксосаркома, липосаркома, хондросаркома, остеогенная саркома, хордома, ангиосаркома, эндотелиосаркома, лимфангиосаркома, лимфангиоэндотелиосаркома, синовиома, мезотелиома, опухоль Юинга, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, карцинома толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак щитовидной железы, рак эндометрия, меланома, рак предстательной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточная карцинома, базальноклеточная карцинома, аденокарцинома, карцинома потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярная карцинома, папиллярная аденокарцинома, цистаденокарцинома, медуллярная карцинома, бронхогенная карцинома, карцинома почек, гепатома, карцинома желчных протоков, хориокарцинома, семинома, эмбриональная карцинома, опухоль Вильма, рак шейки матки, опухоль яичек, карцинома легких, мелкоклеточная карцинома легких, карцинома мочевого пузыря, эпителиальная карцинома, глиома, астроцитомы, медуллобластома, краниофарингиома, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластома, невриномы слухового нерва, олигодендроглиомы, менингиомы, меланома, нейробластома и ретинобластома. Виды комбинированной терапии Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения композиции согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с антинеопластическим агентом, противовирусным агентом, антибактериальным или антибиотическим агентом или противогрибковыми агентами. Любой из этих агентов, известных в данной области техники, может быть введен в композиции согласно настоящему изобретению.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения композиции согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с химиотерапевтическим агентом. Химиотерапевтические агенты, которые можно вводить с композициями согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, производные антибиотиков (например, доксорубин, блеомицин, даунорубин и дактиномицин); антиэстрогены (например, тамоксифен); антиметаболиты (например, фторурацил, 5-ФУ, метотрексат, флоксурин, интерферон альфа-2b, глутаминовую кислоту, пликамицин, меркаптопурин и 6-тиогуанин); цитотоксические агенты (например, кармустин, BCNU, ломустин, CCNU, цитозинарабинозид, циклофосфамид, эстрамустин, гидроксимочевину, прокарбазин, митомицин, бусульфид, цисплатин и сульфат винкристина); гормоны (например, медроксипрогестерон, эстрамустин фосфат натрия, этинилэстрадиол, эстрадиол, ацетат мегестрола, метилтестостерон, дифосфат диэтилстилбэстрола, хлортрианизен и тестостерон); производные азотистого иприта (например, мефален, хлорамбуцил, мехлорэтамин (азотистый иприт) и тиотепа); стероиды и комбинации (например, фосфат натрия бетаметазона); и другие (например, дикарбазин, аспарагиназа, митотан, сульфат винкристина, сульфат винбластина и этопозид). Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения композиции согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с цитокинами. Цитокины, которые можно вводить с композициями согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, анти-CD40, CD40L и ФНО- α .

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения композиции согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с другими терапевтическими или профилактическими схемами, такими как, например, лучевая терапия.

Настоящее изобретение также относится к видам комбинированной терапии, которые включают применение одного или более антител к PD-L1 согласно настоящему изобретению вместе со вторым

противораковым (химиотерапевтическим) агентом. По своему механизму действия химиотерапевтические агенты могут быть классифицированы, например, на следующие группы:

антиметаболиты/противораковые агенты, такие как аналоги пиримидина флоксуридин, капецитабин и цитарабин;

аналоги пурина, антагонисты фолата и родственные ингибиторы;

противоопролиферативные/противомитотические агенты, включая природные продукты, такие как алкалоид барвинка (винбластин, винкристин) и действующие на микротрубочки агенты, такие как таксан (паклитаксел, доцетаксел), винбластин, нокадазол, эпотилоны, винорелбин (навелбен (NAVELBINE®)) и эпиподифиллотоксины (этопозид, тенипозид);

агенты, повреждающие ДНК, такие как актиномицин, амсакрин, бусульфан, карбоплатин, хлорамбуцил, цисплатин, циклофосфамид (цитоксан (CYTOXAN®)), дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, ифосфамид, мелфалан, мехлорэтамин, митомицин, митоксантрон, нитрозомочевина, прокарбазин, таксол, таксотер, тенипозид, этопозид и триэтиленфосфамид;

антибиотики, такие как дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, идарубицин, антрациклины, митоксантрон, блеомицины, пликамицин (митрамицин) и митомицин;

ферменты, такие как L-аспарагиназа, которая системно метаболизирует L-аспарагин и истощает клетки, которые не способны синтезировать свой собственный аспарагин;

противоагрегантные агенты;

противоопролиферативные/противомитотические алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты, циклофосфамид и аналоги (мелфалан, хлорамбуцил, гексаметилмеламин и тиотепа), алкилнитрозомочевины (кармустин) и аналоги, стрептозоцин и триазены (дакарбазин);

противоопролиферативные/противомитотические антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты (метотрексат);

координационные комплексы платины (цисплатин, оксиплатин и карбоплатин), прокарбазин, гидроксимочевина, митотан и аминоклутетимид;

гормоны, аналоги гормонов (эстроген, тамоксифен, гозерелин, бикалутамид и нилутамид) и ингибиторы ароматазы (летрозол и анастрозол);

антикоагулянты, такие как гепарин, соли синтетического гепарина и другие ингибиторы тромбина;

фибринолитические агенты, такие как тканевой активатор плазминогена, стрептокиназа, урокиназа, аспирин, дипиридамол, тиклопидин и клопидогрел;

противомиграционные агенты;

противосекреторные агенты (бревелдин);

иммуносупрессорные агенты, такие как такролимус, сиролимус, азатиоприн и микофенолат;

соединения (TNF-470, генистеин) и ингибиторы факторов роста (ингибиторы фактора роста эндотелия сосудов и ингибиторы фактора роста фибробластов);

блокаторы рецепторов ангиотензина, доноры оксида азота;

антисмысловые олигонуклеотиды;

антитела, такие как трастузумаб и ритуксимаб;

ингибиторы клеточного цикла и индукторы дифференцировки, такие как третиноин;

ингибиторы, ингибиторы топоизомеразы (доксорубицин, даунорубицин, дактиномицин, энипозид, эпирубицин, этопозид, идарубицин, иринотекан, митоксантрон, топотекан и иринотекан) и кортикостероиды (кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизон и преднизолон);

ингибиторы киназы сигнальной трансдукции фактора роста;

индукторы дисфункции;

токсины, такие как токсин холеры, рицин, экзотоксин *Pseudomonas*, аденилатциклаза *Bordetella pertussis*, токсин дифтерии и активаторы каспазы; и

хроматин.

Дополнительные примеры химиотерапевтических агентов включают:

алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (цитоксан (CYTOXAN®));

алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан;

азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа;

эмилерумины и мемиламеламины, включая алфретамин, триэтиленфосфамид, триэтиленфосфамид и тримемилломеламин;

ацетогенины, в частности, буллатацин и буллатацинон;

камптотецин, включая синтетический аналог топотекан;

бриостатин;

каллистатин;

СС-1065, включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин;

криптофицины, в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8;

доластатин;

дуокармицин, включая синтетические аналоги KW-2189 и CBI-TMI;

элейтеробин;
панкратистатин;
саркодиктин;
спонгистатин;

азотные иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, циклофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид окиси мехлорэтамину, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид и урациловый иприт;

нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, формустин, ломустин, нимустин и ранимустин;

антибиотики, такие как энединные антибиотики (например, калихеамицин, в частности, калихеамицин гамма II и калихеамицин phiII), динемидин, включая динемидин А, бисфосфонаты, такие как клодронат, эсперамидин, хромофор неокарциностатина и родственные антибиотические хромофоров на основе хромопротеина энедина, аклаиномицины, актиномицин, отрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эсорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногамицин, оливомицин, пепломицин, порфирамицин, пурамицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин и зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-ФУ);

аналоги фолиевой кислоты, такие как демоптерин, метотрексат, птероптерин и триметотрексат;

аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн и тиогуанин;

аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флоксурин;

андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолон, эпителиостанол, мепителиостан и тестостерон;

агенты, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан и трилостан;

агенты для восполнения фолиевой кислоты, такие как фоллиевая кислота;

трихотечены, в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангицин;

таксоиды, такие как паклитаксел (таксол (TAXOL®)) и доцетаксел (таксотер (TAXOTERE®));

аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин;

ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновую кислоту; этилурацил; амсакрин; эстрабуцил; бисатрен; эдотаксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформтин; ацетат эллиптиния; эпотион; этоглоцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лейковорин; лонидамин; мейтансиноиды, такие как мейтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; фторпиримидин; фолиевую кислоту; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахарид-К (PSK); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенаузоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2''-триуротриэтиламин; уретан; виндизин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ара-С"); циклофосфамид; тиопета; хлорамбуцил; гемцитабин (гемзар (GEMZAR®)); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митроксантрон; винкристин; винорелбин (навелбен (NAVELBINE®)); новантрон; тенипозид; эдотаксат; дауномицин; аминоклутерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (ДФМО); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин; FOLFIRI (фторурацил, лейковорин и иринотекан); и

фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из перечисленных выше.

В определение "химиотерапевтический агент" также включены противогормональные агенты, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогенов (SERM), ингибиторы фермента ароматазы, антиандрогены и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из упомянутых выше, функция которых заключается в регулировании или ингибировании действия гормона на опухоли.

Примеры антиэстрогенов и SERM включают, например, тамоксифен (включая нолвадекс (NOLVADEX™)), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (фарестон (FARESTON®)). Ингибиторы фермента ароматазы регулируют выработку эстрогена в надпочечниках. Примеры включают 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, ацетат мегестрола (мегейс (MEGACE®)), экзестан, форместан, фадрозол, ворозол (ривисор (RIVISOR®)), летрозол (фемара (FEMARA®)) и анастрозол (аримидекс (ARIMIDEX®)). Примеры антиандрогенов включают флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпрод и гозерелин.

Примеры химиотерапевтических агентов также включают противоангиогенные агенты, включая, но не ограничиваясь ими, ретиноидную кислоту и ее производные, 2-метоксиэстрадиол, ангиостатин (ANGIOSTATIN®), эндостатин (ENDOSTATIN®), сурамин, скваламин, тканевой ингибитор металлопротеиназы-1, тканевой ингибитор металлопротеиназы-2, ингибитор активатора плазминогена-1, ингибитор актива-

тора плазминогена-2, ингибитор хрящевого происхождения, паклитаксел (наб-паклитаксел), тромбоцитарный фактор 4, сульфат протамина (клапейн), сульфатированные производные хитина (полученные из раковин королевского краба), комплекс сульфатированного полисахарида и пептидогликана (sp-pg), стауроспорин, модуляторы метаболизма матрикса, включая аналоги пролина ((1-азетидин-2-карбоновую кислоту (LACA)), цис-гидроксипролин, d,l-3,4-дегидропролин, тиапролин, α,α' -дипиридил-бета-аминопропионитрилфумарат, 4-пропил-5-(4-пиридинил)-2(3H)-оксазолон, метотрексат, митоксантрон, гепарин, интерфероны, 2 макроглобулин сыворотки, куриный ингибитор металлопротеиназы-3 (ChIMP-3), хмостатин, тетрадекасульфат бета-циклодекстрина, эпонемидин, фумагиллин, тиомалат золота натрия, d-пеницилламин, бета-1-антиколлагеназу сыворотки, альфа-2-антиплазмин, бисантрон, динатриевую соль лобензарита, динатриевую соль n-2-карбоксифенил-4-хлорантраниловой кислоты или "ССА", талидомид, ангиостатический стероид, карбоксиаминоимидазол и ингибиторы металлопротеиназы, такие как BB-94. Другие противоангиогенные агенты включают антитела, предпочтительно моноклональные антитела против ангиогенных факторов роста: FGF- β , FGF- α , FGF-5, изоформ VEGF, VEGF-C, HGF/SF и Ang-1/Ang-2. Примеры химиотерапевтических агентов также включают противofiброзные агенты, включая, но не ограничиваясь ими, такие соединения как бета-аминопропионитрил (BAPN), а также соединения, раскрытые в патенте США № 4965288 (Palfreyman, et al.), относящемся к ингибиторам лизилоксидазы и их применению при лечении заболеваний и состояний, связанных с патологическим отложением коллагена, и в патенте США № 4997854 (Kagan et al.), относящемся к соединениям, которые ингибируют LOX, для лечения различных патологических фиброзных состояний, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Дополнительные примерные ингибиторы описаны в патенте США № 4943593 (Palfreyman et al.), относящемся к соединениям, таким как 2-изобутил-3-фтор-, хлор- или бромаллиламин, в патентах США № 5021456 (Palfreyman et al.), 5059714 (Palfreyman et al.), 5120764 (McCarthy et al.), 5182297 (Palfreyman et al.), 5252608 (Palfreyman et al.), относящихся к 2-(1-нафтилоксимемил)-3-фтораллиламину, и публикации US 2004/0248871 (Farjanel et al.), которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Примерные противofiброзные агенты также включают первичные амины, реагирующие с карбонильной группой активного сайта лизилоксидаз, и более конкретно те, которые после связывания с карбониллом образуют продукт, стабилизированный за счет резонанса, такие как следующие первичные амины: эмиленмамин, гидразин, фенилгидразин и их производные; семикарбазид и производные мочевины; аминонитрилы, такие как BAPN или 2-нитроэтиламин; ненасыщенные или насыщенные галогенамины, такие как 2-бромэтиламин, 2-хлорэтиламин, 2-трифторэтиламин, 3-бромпропиламин и п-галогенбензиламины; и лактон селеногомоцистеина. Другие противofiброзные агенты представляют собой хелатирующие медь агенты, как проникающие в клетки, так и не проникающие в них. Примерные соединения включают не прямые ингибиторы, которые блокируют производные альдегидов, возникающие в результате окислительного дезаминирования лизилоксидазами лизильных и гидроксизильных остатков. Примеры включают тиоламины, в частности, D-пеницилламин и его аналоги, такие как 2-амино-5-меркапто-5-метилгексановая кислота, D-2-амино-3-метил-3-((2-ацетамидоэтил)дитио)бутановая кислота, n-2-амино-3-метил-3-((2-аминоэтил)дитио)бутановая кислота, натрий-4-((n-1-диметил-2-амино-2-карбоксиэтил) дитио)бутансульфурат, 2-ацетамидоэтил-2-ацетамидоэтанттиолсульфанат и тригидрат натрий-4-меркаптобутансульфината.

Примеры химиотерапевтических агентов также включают иммунотерапевтические агенты, включая, но не ограничиваясь ими, терапевтические антитела, подходящие для лечения пациентов. Некоторые примеры терапевтических антител включают симтузумаб, абаговомаб, адекватумумаб, афутузумаб, алемтузумаб, алтумумаб, аматуксимаб, анатумумаб, арцитумумаб, бавитуксимаб, бектумумаб, бевацизумаб, биватузумаб, блинатумумаб, брентуксимаб, кантузумаб, катумаксумаб, цетуксимаб, цитатузумаб, циксумумаб, кливатузумаб, конатумумаб, даратумумаб, дрозитумаб, дулиготумаб, дусигитумаб, детумумаб, дацетумумаб, далотумумаб, экромексимаб, элотузумаб, энситуксимаб, эртумаксумаб, этарацизумаб, фарлетузумаб, фиклатузумаб, фигитумумаб, фланвотумаб, футуксимаб, ганитумаб, гемтузумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб, ибритумумаб, иговомаб, имгатузумаб, индатуксимаб, инотузумаб, интетумумаб, ипилимумаб, иратумумаб, лабетузумаб, лексатумумаб, линтузумаб, лорвотузумаб, лукатумумаб, мапатумумаб, матузумаб, милатузумаб, минретумумаб, митумумаб, моксетумумаб, нарнатумаб, наптумумаб, нецитумумаб, нимотузумаб, нофетумумаб, окаратузумаб, офатумумаб, оларатумаб, онартузумаб, опортумумаб, ореговомаб, панитумумаб, парсатузумаб, патритумаб, пемтумумаб, пертузумаб, пинтумумаб, притумумаб, ракотумумаб, радретумаб, рилотумумаб, ритуксимаб, робатумумаб, сатумумаб, сибротузумаб, силтуксимаб, солитомаб, такатузумаб, таплитумумаб, тенатумумаб, тепротумумаб, тигатузумаб, тозитумумаб, трастузумаб, тукотузумаб, ублитуксимаб, велтузумаб, ворсетузумаб, вотумумаб, залутумумаб, CC49 и 3F8. Ритуксимаб можно применять для лечения разных видов индолентного В-клеточного рака, включая лимфому из клеток краевой зоны, WM, ХЛЛ и мелкоклеточные лимфоцитарные лимфомы. Комбинация ритуксимаба и химиотерапевтических агентов является особенно эффективной.

Приведенные в качестве примера терапевтические антитела могут быть дополнительно помечены или комбинированы с радиоизотопной частицей, такой как индий-111, иттрий-90 или йод-131.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения дополнительный терапевтический

агент представляет собой алкилирующий азотистый иприт. Неограничивающие примеры алкилирующих азотистых ипритов включают хлорамбуцил.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения соединения и композиции, описанные в настоящем документе, можно применять или комбинировать с одним или более дополнительными терапевтическими агентами. Один или более терапевтических агентов включают, но не ограничиваются ими, ингибитор Ab1, активированную CDC-киназу (ACK), рецептор аденозина A2B (A2B), регулирующий сигнал апоптоза киназу (ASK), Аугоа-киназу, тирозинкиназу Брутона (BTK), ВЕТ-бромдомен (BRD), такой как BRD4, c-Kit, c-Met, CDK-активирующую киназу (CAK), кальмодулин-зависимую протеинкиназу (CaMK), циклин-зависимую киназу (CDK), казеинкиназу (CK), рецептор дискоидинового домена (DDR), рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR), киназу точечной адгезии (FAK), Flt-3, FYN, киназу гликогенсинтазы (GSK), HCK, гистондеацетилазу (HDAC), IKK, такую как IKK β , изоцитратдегидрогеназу (IDH), такую как IDH1, Janus-киназу (JAK), KDR, лимфоцит-специфическую тирозиновую протеинкиназу (LCK), белок лизилоксидазы, лизилоксидазоподобный белок (LOXL), LYN, матриксную металлопротеиназу (ММП), MEK, митоген-активируемую протеинкиназу (MAPK), NEK9, NPM-ALK, киназу p38, фактор роста тромбоцитов (PDGF), киназу фосфорилазы (PK), polo-подобную киназу (PLK), фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K), протеинкиназу (PK), такую как протеинкиназа A, B и/или C, PYK, тирозинкиназу селезенки (SYK), серин/треонин-специфичную киназу TPL2, серин/треонин-специфичную киназу STK, члена семейства белков передачи сигнала трансдукции и активаторов транскрипции (STAT), SRC, серин/треонин-специфичную протеинкиназу (TBK), такую как TBK1, TIE, тирозинкиназу (TK), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), YES или любую их комбинацию.

Ингибиторы ASK включают ингибиторы ASK1. Примеры ингибиторов ASK1 включают, но не ограничиваются ими, те, которые описаны в WO 2011/008709 (Gilead Sciences) и WO 2013/112741 (Gilead Sciences).

Примеры ингибиторов BTK включают, но не ограничиваются ими, ибрутиниб, HM71224, ONO-4059 и CC-292.

Ингибиторы DDR включают ингибиторы DDR1 и/или DDR2. Примеры ингибиторов DDR включают, но не ограничиваются ими, те, которые раскрыты в WO 2014/047624 (Gilead Sciences), US 2009/0142345 (Takeda Pharmaceutical), US 2011/0287011 (Oncomed Pharmaceuticals), WO 2013/027802 (Chugai Pharmaceutical) и WO 2013/034933 (Imperial Innovations).

Примеры ингибиторов HDAC включают, но не ограничиваются ими, прациностат и панобиностат.

Ингибиторы JAK ингибируют JAK1, JAK2 и/или JAK3. Примеры ингибиторов JAK включают, но не ограничиваются ими, филготиниб, руксолитиниб, федратиниб, тофацитиниб, барицитиниб, лестауртиниб, пакритиниб, XL019, AZD1480, INCB039110, LY2784544, BMS911543 и NS018.

Ингибиторы LOXL включают ингибиторы LOXL1, LOXL2, LOXL3, LOXL4 и/или LOXL5. Примеры ингибиторов LOXL включают, но не ограничиваются ими, антитела, описанные в WO 2009/017833 (Arresto Biosciences).

Примеры ингибиторов LOXL2 включают, но не ограничиваются ими, антитела, описанные в WO 2009/017833 (Arresto Biosciences), WO 2009/035791 (Arresto Biosciences) и WO 2011/097513 (Gilead Biologies).

Ингибиторы ММП включают ингибиторы ММП 1-10. Примеры ингибиторов ММП-9 включают, но не ограничиваются ими, маримастат (BB-2516), ципемастат (Ro 32-3555) и те, которые описаны в WO 2012/027721 (Gilead Biologies).

Ингибиторы PI3K включают ингибиторы PI3K γ , PI3K δ , PI3K β , PI3K α и/или пан-PI3K. Примеры ингибиторов PI3K включают, но не ограничиваются ими, вортманнин, BKM120, CH5132799, XL756 и GDC-0980.

Примеры ингибиторов PI3K γ включают, но не ограничиваются ими, ZSTK474, AS252424, LY294002 и TG100115.

Примеры ингибиторов PI3K δ включают, но не ограничиваются ими, PI3K II, TGR-1202, AMG-319, GSK2269557, X-339, X-414, RP5090, KAR4141, XL499, OXY111A, IPI-145, IPI-443 и соединения, описанные в WO 2005/113556 (ICOS), WO 2013/052699 (Gilead Calistoga), WO 2013/116562 (Gilead Calistoga), WO 2014/100765 (Gilead Calistoga), WO 2014/100767 (Gilead Calistoga) и WO 2014/201409 (Gilead Sciences).

Примеры ингибиторов PI3K β включают, но не ограничиваются ими, GSK2636771, BAY 10824391 и TGX221.

Примеры ингибиторов PI3K α включают, но не ограничиваются ими, бупарлисиб, BAY 80-6946, BYL719, PX-866, RG7604, MLN1117, WX-037, AEZA-129 и PA799.

Примеры ингибиторов пан-PBK включают, но не ограничиваются ими, LY294002, BEZ235, XL147 (SAR245408) и GDC-0941.

Примеры ингибиторов SYK включают, но не ограничиваются ими, таматиниб (R406), фостаматиниб (R788), PRT062607, BAY-61-3606, NVP-QAB 205 AA, R112, R343 и те, которые описаны в патенте

США № 8450321 (Gilead Connecticut).

TKI могут быть нацелены на рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR) и рецепторы фактора роста фибробластов (FGF), фактора роста тромбоцитов (PDGF) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Примеры TKI, которые нацелены на EGFR, включают, но не ограничиваются ими, гефитиниб и эрлотиниб. Санитиниб является неограничивающим примером TKI, который нацелен на рецепторы FGF, PDGF и VEGF.

Антитела к PD-L1 согласно настоящему изобретению можно применять, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, вместе с ингибитором контрольной точки иммунитета. Контрольные точки иммунитета представляют собой молекулы иммунной системы, которые либо усиливают сигнал (костимулирующие молекулы), либо подавляют сигнал (коингибирующие молекулы). Многие виды рака защищают себя от иммунной системы, ингибируя сигнал Т-клеток с помощью агониста коингибирующих молекул или антагониста костимулирующих молекул. Агонист или антагонист контрольной точки иммунитета может помочь остановить такой защитный механизм раковых клеток. Агонист или антагонист контрольной точки иммунитета может быть нацелен на любую одну или более из следующих молекул контрольной точки PD-1, CTLA-4, LAG-3 (также известный как CD223), CD28, CD122, 4-1BB (также известный как CD137), TIM3, OX-40/OX40L, CD40/CD40L, LIGHT, ICOS/ICOSL, GITR/GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVIM или BTLA (также известный как CD272).

Белок запрограммированной гибели Т-клеток 1 (PD-1) представляет собой трансмембранный белок, обнаруженный на поверхности Т-клеток, который, при связывании с лигандом запрограммированной гибели Т-клеток 1 (PD-L1) на опухолевых клетках, приводит к подавлению активности Т-клеток и снижению опосредуемой Т-клетками цитотоксичности. Соответственно, PD-1 и PD-L1 являются супрессорами иммунитета или "выключателями" контрольной точки иммунитета. Пример ингибитора PD-1 включает, но не ограничивается ими, ниволумаб (опдиво (Opdivo)) (BMS-936558), пембролизумаб (кейтруда (Keytruda)), пидилизумаб, AMP-224, MEDI0680 (AMP-514), PDR001, MPDL3280A, MEDI4736, BMS-936559 и MSB0010718C.

CTLA-4 является белковым рецептором, который подавляет иммунную систему. Неограничивающие примеры ингибиторов CTLA-4 включают ипилимумаб (ервой (Yervoy)) (также известный как BMS-734016, MDX-010, MDX-101) и тремелидумаб (ранее тицилимумаб, CP-675,206).

Ген активации лимфоцитов-3 (LAG-3) представляет собой рецептор контрольной точки иммунитета на поверхности клетки, который подавляет иммунный ответ путем действия на Tregs, а также прямого действия на CD8⁺ Т-клетки. Ингибиторы LAG-3 включают, но не ограничиваются ими, LAG525 и BMS-986016. CD28 конститутивно экспрессируется почти на всех CD4⁺ Т-клетках человека и приблизительно на половине всех CD8 Т-клеток и стимулирует размножение Т-клеток. Неограничивающие примеры ингибиторов CD28 включают TGN1412. CD122 усиливает пролиферацию CD8⁺ эффекторных Т-клеток. Неограничивающие примеры включают NKTR-214.

4-1BB (также известный как CD137) участвует в пролиферации Т-клеток. Также известно, что опосредуемая CD137 передача сигналов защищает Т-клетки и, в частности, CD8⁺ Т-клетки от гибели клеток, индуцированной активацией. Примеры ингибиторов CD137 включают PF-05082566, урелумаб (BMS-663513) и липокалин. Для любого из вышеуказанных комбинированных способов лечения антитело к PD-L1 можно вводить одновременно или отдельно от другого противоракового агента. При отдельном введении антитело к PD-L1 можно вводить до или после введения другого противоракового агента.

Лечение инфекций.

Как продемонстрировано в экспериментальных примерах, антитела согласно настоящему изобретению могут активировать иммунный ответ, который затем может быть подходящим для лечения инфекций.

Инфекция это проникновение в ткани организма агентов, вызывающих заболевания, их размножение и ответ тканей хозяина на такие организмы и токсины, которые они вырабатывают. Инфекция может быть вызвана инфекционными агентами, такими как вирусы, вириды, прионы, бактерии, нематоды, такие как паразитические круглые черви и острицы, членистоногие, такие как иксодовые клещи, микроскопические клещи, блохи и вши, грибки, такие как стригущий лишай, и другими макропаразитами, такими как ленточные черви и другие гельминты. Согласно одному аспекту инфекционный агент представляет собой бактерию, такую как грамотрицательная бактерия. Согласно одному аспекту инфекционный агент представляет собой вирус, такой как ДНК-вирусы, РНК-вирусы и вирусы с обратной транскрипцией. Неограничивающие примеры вирусов включают аденовирус, вирус Коксаки, вирус Эпштейна-Барр, вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус простого герпеса 1 типа, вирус простого герпеса 2 типа, цитомегаловирус, вирус герпеса человека 8 типа, ВИЧ, вирус гриппа, вирус кори, вирус эпидемического паротита, вирус папилломы человека, вирус парагриппа, полиовирус, вирус бешенства, респираторно-синцитиальный вирус, вирус краснухи, вирус ветряной оспы.

Антитела согласно настоящему изобретению также можно применять для лечения инфекционного заболевания, вызванного микроорганизмом, или для уничтожения микроорганизма путем нацеливания на микроорганизм и иммунную клетку, чтобы осуществить устранение микроорганизма. Согласно одному аспекту микроорганизм представляет собой вирус, включая РНК- и ДНК-вирусы, грамположитель-

ную бактерию, грамотрицательную бактерию, простейший организм или грибок. Неограничивающие примеры инфекционных заболеваний и соответствующих микроорганизмов приведены в табл. 4 ниже.

Таблица 4. Инфекционные заболевания и источники соответствующих микроорганизмов

Инфекционное заболевание	Источник микроорганизма
Акинетобактерные инфекции	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Актиномикоз	<i>Actinomyces israelii</i> , <i>Actinomyces gerencseriae</i> и <i>Propionibacterium propionicus</i>
Африканская сонная болезнь (африканский трипаносомоз)	<i>Trypanosoma brucei</i>
СПИД (синдром приобретенного иммунодефицита)	<i>HIV</i> (вирус иммунодефицита человека)
Амебиаз	<i>Entamoeba histolytica</i>
Анаплазмоз	Род <i>Anaplasma</i>
Сибирская язва	<i>Bacillus anthracis</i>
Инфекция <i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>
Аргентинская геморрагическая лихорадка	Вирус Джунин
Аскаридоз	<i>Ascaris lumbricoides</i>
Аспергиллез	Род <i>Aspergillus</i>
Астровирусная инфекция	Семейство <i>Astroviridae</i>
Бабезиоз	Род <i>Babesia</i>
Инфекция <i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Бактериальная пневмония	Несколько бактерий
Бактериальный вагиноз (БВ)	Несколько бактерий
Бактероидная инфекция	Род <i>Bacteroides</i>
Балантидиаз	<i>Balantidium coli</i>
Байлисаскар-гельминтоз	Род <i>Baylisascaris</i>
Вирусная инфекция	Вирус <i>BK</i>
Черная пьедра	<i>Piedraia hortae</i>
Инфекция <i>Blastocystis hominis</i>	<i>Blastocystis hominis</i>
Бластомикоз	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
Боливийская геморрагическая лихорадка	Вирус Мачупо
Боррелиоз	Род <i>Borrelia</i>

Ботулизм (и детский ботулизм)	<i>Clostridium botulinum</i>
Бразильская геморрагическая лихорадка	Вирус Сабиа
Бруцеллез	Род <i>Brucella</i>
Инфекция <i>Burkholderia</i>	Обычно <i>Burkholderia cepacia</i> и другие виды <i>Burkholderia</i>
Язва бурули	<i>Mycobacterium ulcerans</i>
Калицивирусная инфекция (норовирус и саповирус)	Семейство <i>Caliciviridae</i>
Кампилобактериоз	Род <i>Campylobacter</i>
Кандидоз (монилиаз; молочница)	Обычно <i>Candida albicans</i> и другие виды <i>Candida</i>
Болезнь кошачьих царапин	<i>Bartonella henselae</i>
Целлюлит	Обычно <i>Streptococcus</i> и <i>Staphylococcus</i> группы А
Болезнь Шагаса (американский трипаносомоз)	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Мягкий шанкр	<i>Haemophilus ducreyi</i>
Ветряная оспа	Вирус <i>Varicella zoster (VZV)</i>
Хламидиоз	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Инфекция <i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
Холера	<i>Vibrio cholerae</i>
Хромобластомикоз	Обычно <i>Fonsecaea pedrosoi</i>
Клонорхоз	<i>Clonorchis sinensis</i>
Инфекция <i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
Кокцидиоидомикоз	<i>Coccidioides immitis</i> и <i>Coccidioides posadasii</i>
Колорадская клещевая лихорадка (CTF)	Вирус колорадской клещевой лихорадки (CTFV)
Простуда (острый вирусный ринофарингит; острая вирусная инфекция верхних дыхательных путей)	Обычно риновирусы и коронавирусы
Болезнь Крейцфельда-Якоба (CJD)	Прион <i>CJD</i>
Геморрагическая лихорадка Крым-Конго (CCHF)	Вирус геморрагической лихорадки Крым-Конго

Криптококкоз	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Криптоспоридиоз	Род <i>Cryptosporidium</i>
Мигрирующая кожная личинка (CLM)	Обычно <i>Ancylostoma braziliense</i> ; несколько других паразитов
Циклоспороз	<i>Cyclospora cayetanensis</i>
Цистицеркоз	<i>Taenia solium</i>
Цитомегаловирусная инфекция	Цитомегаловирус
Лихорадка Денге	Вирусы денге (<i>DEN-1</i> , <i>DEN-2</i> , <i>DEN-3</i> и <i>DEN-4</i>) – флавивирuses
Диамебиаз	<i>Dientamoeba fragilis</i>
Дифтерия	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Дифиллоботриоз	<i>Diphyllobothrium</i>
Дракункулез	<i>Dracunculus medinensis</i>
Геморрагическая лихорадка Эбола	Вирус Эбола (EBOV)
Эхинококкоз	Род <i>Echinococcus</i>
Эрлихиоз	Род <i>Ehrlichia</i>
Энтеробиоз (острая инфекция)	<i>Enterobius vermicularis</i>
Энтерококковая инфекция	Род <i>Enterococcus</i>
Энтеровирусная инфекция	Род <i>Enterovirus</i>
Эпидемический тиф	<i>Rickettsia prowazekii</i>
Инфекционная эритема (болезнь Штиккера)	Парвовирус B19
Внезапная экзантема (болезнь Никола-Фавра)	Вирус герпеса человека 6 (HHV-6) и вирус герпеса человека 7 (HHV-7)
Фасциолопсидоз	<i>Fasciolopsis buski</i>
Фасциолез	<i>Fasciola hepatica</i> и <i>Fasciola gigantica</i>
Фатальная семейная бессонница (FFI)	Прион FFI
Филяриатоз	Суперсемейство <i>Filarioidea</i>
Пищевое отравление <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
Инфекция свободноживущими амебами	Несколько бактерий
Фузобактериальная инфекция	Род <i>Fusobacterium</i>
Газовая гангрена (кlostридиальный)	Обычно <i>Clostridium perfringens</i> ; другие виды

мионекроз)	<i>Clostridium</i>
Геотрихоз	<i>Geotrichum candidum</i>
Синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера (GSS)	Прион GSS
Лямблиоз	<i>Giardia intestinalis</i>
Сап	<i>Burkholderia mallei</i>
Гнатостомоз	<i>Gnathostoma spinigerum</i> и <i>Gnathostoma hispidum</i>
Гонорея	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Паховая гранулема (донованоз)	<i>Klebsiella granulomatis</i>
Инфекция стрептококками группы А	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Инфекция стрептококками группы В	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Гемофильная инфекция	<i>Haemophilus influenzae</i>
Заболевание кистей рук, стоп и полости рта (HFMD)	Энтеровирусы, в основном вирус Коксаки А и энтеровирус 71 (EV71)
Хантавирусный легочный синдром (HPS)	Вирус Син Номбре
Инфекция <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Гемолитическо-уремический синдром (ГУС)	<i>Escherichia coli</i> O157:H7, O111 и O104:H4
Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС)	Семейство <i>Bunyaviridae</i>
Гепатит А	Вирус гепатита А
Гепатит В	Вирус гепатита В
Гепатит С	Вирус гепатита С
Гепатит D	Вирус гепатита D
Гепатит Е	Вирус гепатита Е
Простой герпес	Вирус простого герпеса 1 и 2 (HSV-1 и HSV-2)
Гистоплазмоз	<i>Histoplasma capsulatum</i>
Инфекция анкилостомами	<i>Ancylostoma duodenale</i> и <i>Necator americanus</i>
Бокавирусная инфекция человека	Бокавирус человека (HBoV)
Инфекция человека <i>Ehrlichia ewingii</i>	<i>Ehrlichia ewingii</i>
Гранулоцитарный анаплазмоз человека (HGA)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>

Метапневмовирусная инфекция человека	<i>Human metapneumovirus</i> (hMPV)
Человеческий моноцитарный эрлихиоз	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>
Инфекция вирусом папилломы человека (ВПЧ)	Вирус папилломы человека (HPV)
Инфекция вирусом парагриппа человека	Вирусы парагриппа человека (HPIV)
Гименолепидоз	<i>Hymenolepis nana</i> и <i>Hymenolepis diminuta</i>
Инфекционный мононуклеоз, вызванный вирусом Эпштейна-Барр (моно)	Вирус Эпштейна-Барр (EBV)
Грипп (грипп)	Семейство <i>Orthomyxoviridae</i>
Изоспороз	<i>Isospora belli</i>
Болезнь Kawasaki	Не известно; данные свидетельствуют об инфекции
Кератит	Несколько возбудителей
Инфекция <i>Kingella kingae</i>	<i>Kingella kingae</i>
Куру	Прион <i>Kuru</i>
Лихорадка Ласса	Вирус <i>Lassa</i>
Легионеллез (болезнь легионеров)	<i>Legionella pneumophila</i>
Легионеллез (пontiакская лихорадка)	<i>Legionella pneumophila</i>
Лейшманиоз	Род <i>Leishmania</i>
Проказа	<i>Mycobacterium leprae</i> и <i>Mycobacterium lepromatosis</i>
Лептоспироз	Род <i>Leptospira</i>
Листерия	<i>Listeria monocytogenes</i>
Болезнь Лайма (боррелиоз Лайма)	Обычно <i>Borrelia burgdorferi</i> и другие виды <i>Borrelia</i>
Лимфатический филяриатоз (слоновая болезнь)	<i>Wuchereria bancrofti</i> и <i>Brugia malayi</i>
Лимфоцитарный хориоменингит	Вирус лимфатического хориоменингита (LCMV)
Малярия	Род <i>Plasmodium</i>
Марбургская геморрагическая	Вирус Марбург

лихорадка (МНГ)	
Корь	Вирус кори
Мелиоидоз (болезнь Уитмора)	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
Менингит	Несколько возбудителей
Менингококковая инфекция	<i>Neisseria meningitidis</i>
Метагонимоз	Обычно <i>Metagonimus yokagawai</i>
Микроспоридиоз	<i>Microsporidia phylum</i>
Контагиозный моллюск (МС)	Вирус контагиозного моллюска (MCV)
Эпидемический паротит	Вирус эпидемического паротита
Мышиный тиф (эндемический тиф)	<i>Rickettsia typhi</i>
Микоплазменная пневмония	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Мицетома	Многие виды бактерий (<i>Actinomycetoma</i>) и грибов (<i>Eumycetoma</i>)
Мназ	Личинки паразитических двукрылых мух
Неонатальный конъюнктивит (<i>Ophthalmia neonatorum</i>)	Наиболее часто <i>Chlamydia trachomatis</i> и <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
(Новый) Вариант болезни Крейтцфельда-Якоба (vCJD, nvCJD)	Прион vCJD
Нокардиоз	Обычно <i>Nocardia asteroides</i> и другие виды <i>Nocardia</i>
Онхоцеркоз (речная слепота)	<i>Onchocerca volvulus</i>
Паракокцидиомикоз (южноамериканский бластомикоз)	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Парагонимоз	Обычно <i>Paragonimus westermani</i> и другие виды <i>Paragonimus</i>
Пастереллез	Род <i>Pasteurella</i>
Головной педикулез (головные вши)	<i>Pediculus humanus capitis</i>
Нательный педикулез (нательные вши)	<i>Pediculus humanus corporis</i>
Лобковый педикулез (лобковые вши, крабовые вши)	<i>Phthirus pubis</i>
Воспалительное заболевание органов малого таза (PID)	Несколько возбудителей
Коклюш (коклюш)	<i>Bordetella pertussis</i>
Чума	<i>Yersinia pestis</i>

Пневмококковая инфекция	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Пневмоцистная пневмония (PCP)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
Пневмония	Несколько возбудителей
Полиомиелит	Полиовирус
Инфекция <i>Prevotella</i>	Род <i>Prevotella</i>
Первичный амебный менингоэнцефалит (ПАМ)	Обычно <i>Naegleria fowleri</i>
Прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия	Вирус JC
Пситтакоз	<i>Chlamydophila psittaci</i>
Лихорадка Q	<i>Coxiella burnetii</i>
Бешенство	Вирус бешенства
Болезнь от укуса крыс	<i>Streptobacillus moniliformis</i> и <i>Spirillum minus</i>
Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция	Респираторно-синцитиальный вирус (RSV)
Риноспоридиоз	<i>Rhinosporidium seeberi</i>
Риновирусная инфекция	Риновирус
Риккетсиозная инфекция	Род <i>Rickettsia</i>
Осповидный риккетсиоз	<i>Rickettsia akari</i>
Лихорадка долины Рифт (RVF)	Вирус лихорадки долины Рифт
Пятнистая лихорадка Скалистых гор (RMSF)	<i>Rickettsia rickettsii</i>
Ротавирусная инфекция	Ротавирус
Краснуха	Вирус краснухи
Сальмонеллез	Род <i>Salmonella</i>
SARS (тяжелый острый респираторный синдром)	SARS-коронавирус
Чесотка	<i>Sarcoptes scabiei</i>
Шистосомоз	Род <i>Schistosoma</i>
Сепсис	Несколько возбудителей
Шигеллез (бациллярная дизентерия)	Род <i>Shigella</i>
Опоясывающий лишай (опоясывающий герпес)	Вирус ветряной оспы (VZV)
Оспа (вариола)	<i>Variola major</i> или <i>Variola minor</i>

Споротрихоз	<i>Sporothrix schenckii</i>
Стафилококковое пищевое отравление	Род <i>Staphylococcus</i>
Стафилококковая инфекция	Род <i>Staphylococcus</i>
Стронгилоидоз	<i>Strongyloides stercoralis</i>
Сифилис	<i>Treponema pallidum</i>
Тениоз	Род <i>Taenia</i>
Столбняк	<i>Clostridium tetani</i>
Дерматомикоз бороды и усов (псевдофолликулит волос бороды)	Обычно род <i>Trichophyton</i>
Дерматомикоз волосистой части головы (стригущий лишай)	Обычно <i>Trichophyton tonsurans</i>
Дерматомикоз тела (дерматофития туловища)	Обычно род <i>Trichophyton</i>
Паховый дерматомикоз (трихофития промежности)	Обычно <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> и <i>Trichophyton mentagrophytes</i>
Дерматомикоз рук (микоз кистей)	<i>Trichophyton rubrum</i>
Черный лишай	Обычно <i>Hortaea werneckii</i>
Эпидермомикоз стоп (дерматофития стоп)	Обычно род <i>Trichophyton</i>
Дерматофитный онихомикоз (Онихомикоз)	Обычно род <i>Trichophyton</i>
Разноцветный лишай (отрубевидный лишай)	Род <i>Malassezia</i>
Токсокароз (синдром мигрирующей личинки, глазная форма (ОЛМ))	<i>Toxocara canis</i> или <i>Toxocara cati</i>
Токсокароз (синдром мигрирующей личинки, висцеральная форма (VLM))	<i>Toxocara canis</i> или <i>Toxocara cati</i>
Токсоплазмоз	<i>Toxoplasma gondii</i>
Трихинеллез	<i>Trichinella spiralis</i>
Трихомониаз	<i>Trichomonas vaginalis</i>
Трихуриаз (инфекция власоглавом)	<i>Trichuris trichiura</i>
Туберкулез	Обычно <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Туляремия	<i>Francisella tularensis</i>
Инфекция <i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
Венесуэльский лошадиный энцефалит	Вирус венесуэльского лошадиного энцефалита
Венесуэльская геморрагическая лихорадка	Вирус Гуанарито
Вирусная пневмония	Несколько вирусов
Лихорадка Западного Нила	Вирус Западного Нила
Белая пьедра	<i>Trichosporon beigelii</i>
Инфекция <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
Иерсиниоз	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Желтая лихорадка	Вирус Желтой лихорадки
Зигомикоз	Порядок <i>Mucorales</i> (<i>Mucormycosis</i>) и порядок <i>Entomophthorales</i> (<i>Entomophthoramycosis</i>)

Конкретная доза и схема лечения для любого конкретного пациента будут зависеть от множества факторов, включая конкретные антитела, их вариант или производное, которые применяют, возраст пациента, массу тела, общее состояние здоровья, пол и режим питания, а также время введения, скорость выведения, комбинацию лекарственных препаратов и степень тяжести конкретного заболевания, которое

лечат. Оценка таких факторов медицинскими работниками находится в пределах обычной квалификации в данной области техники. Количество также будет зависеть от конкретного пациента, которого нужно лечить, пути введения, типа состава, характеристик применяемого соединения, степени тяжести заболевания и желательного эффекта. Применяемое количество может быть определено с помощью фармакологических и фармакокинетических принципов, хорошо известных в данной области техники.

Способы введения антител или их вариантов включают, но не ограничиваются ими, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, внутриназальный, эпидуральный и пероральный пути введения. Антигенсвязывающие полипептиды или композиции можно вводить любым удобным путем, например путем инфузии или болюсной инъекции, путем всасывания через эпителиальные или слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.), и могут вводиться вместе с другими биологически активными веществами. Соответственно, фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему изобретению, могут быть введены перорально, ректально, парентерально, внутрисистемно, внутривагинально, внутрибрюшинно, местно (например, с помощью порошков, мазей, капель или трансдермального пластыря), буккально или в виде перорального или назального спрея.

В настоящем документе термин "парентеральный" относится к способам введения, которые включают внутривенную, внутримышечную, внутрибрюшинную, внутривенную, подкожную и внутрисуставную инъекцию и инфузию. Введение может быть системным или местным. Кроме того, желательным может быть введение антител согласно настоящему изобретению в центральную нервную систему любым подходящим путем, включая внутримозговую и внутримозговую инъекцию; внутримозговая инъекция может быть облегчена с помощью внутримозгового катетера, например, прикрепленного к резервуару, такому как резервуар Оммаи. Также можно применять легочное введение, например, с использованием ингалятора или небулайзера и состава с аэрозольным агентом. Желательным может быть введение полипептидов антител или композиций согласно настоящему изобретению местно в область, нуждающуюся в лечении; это может быть достигнуто с помощью, например, но не ограничиваясь этим, местной инфузии во время хирургического вмешательства, местного применения, например, в комбинации с перевязкой раны после хирургического вмешательства, путем инъекции, с помощью катетера, с помощью суппозитория или с помощью имплантата, причем указанный имплантат изготовлен из пористого, непористого или желатинового материала, включая мембраны, такие как силиконовые мембраны, или волокна. Предпочтительно при введении белка, включая антитело, согласно настоящему изобретению особое внимание следует уделить применению материалов, которые не абсорбируют белок. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения антитела или композиции могут быть доставлены в везикуле, в частности, в липосоме (см. Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Treat et al., в *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; см. в целом там же).

Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения антигенсвязывающий полипептид или композиция могут быть доставлены в системе с контролируемым высвобождением. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения можно применять насос (см. Sefton, 1987, *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения можно применять полимерные материалы (см. *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; см. также Levy et al., 1985, *Science* 228:190; Doring et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). Согласно еще одному варианту реализации настоящего изобретения система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от мишени терапии, т.е. мозга, в результате этого потребуется лишь часть системной дозы (см., например, Goodson, в *Medical Applications of Controlled Release*, выше, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer (1990, *Science* 249:1527-1533).

Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения, если композиция согласно настоящему изобретению содержит нуклеиновую кислоту или полинуклеотид, кодирующий белок, нуклеиновую кислоту можно вводить в условиях *in vivo*, чтобы стимулировать экспрессию белка, который она кодирует, путем конструирования ее как части соответствующего вектора экспрессии нуклеиновой кислоты и введения таким способом, что она становится внутриклеточной, например, с помощью ретровирусного вектора (см. патент США № 4980286) или путем прямой инъекции, или путем бомбардировки микрочастицами (например, с помощью генной пушки; Biolistic, Dupont) или путем покрытия липидами или рецепторами клеточной поверхности или трансфецирующими агентами, или путем ее введения в комплексе с гомеобоксоподобным пептидом, который, как известно, проникает в ядро (см., например, Joliot et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868) и т.д. Согласно другому варианту нуклеиновая кислота может быть введена внутриклеточно и включена в ДНК клетки хозяина для экспрессии путем гомологичной рекомбинации.

Количество антител согласно настоящему изобретению, которое будет эффективным при лечении,

ингибировании и предотвращении воспалительного, иммунного или злокачественного заболевания, нарушения или состояния, может быть определено с помощью стандартных клинических методик. Кроме того, при необходимости для определения оптимальных диапазонов доз можно применять количественные исследования в условиях *in vitro*. Точная доза состава, которая будет применяться, также будет зависеть от пути введения и серьезности заболевания, нарушения или состояния и должна быть определена в соответствии с мнением практикующего врача и обстоятельствами для каждого пациента. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных в исследовательских системах в условиях *in vitro* или в моделях на животных.

В качестве общего положения, доза антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению, вводимая пациенту, обычно составляет от 0,1 до 100 мг/кг массы тела пациента, от 0,1 до 20 мг/кг массы тела пациента или от 1 до 10 мг/кг массы тела пациента. Обычно человеческие антитела имеют более длительный период полужизни в организме человека, чем антитела других видов, вследствие иммунного ответа на чужеродные полипептиды. Соответственно, часто возможно введение более низких доз человеческих антител и менее частое введение. Кроме того, доза и частота введения антител согласно настоящему изобретению может быть уменьшена за счет усиления поглощения и проникновения в ткани антител (например, в мозг) с помощью модификаций, таких как, например, липидирование. Способы лечения инфекционного или злокачественного заболевания, состояния или нарушения, включающие введение антитела, его варианта или производного согласно настоящему изобретению, обычно исследуют в условиях *in vitro* и затем в условиях *in vivo* на приемлемой модели на животных, чтобы определить желательную терапевтическую или профилактическую активность перед применением у человека. Подходящие модели на животных, включая трансгенных животных, хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, количественные исследования в условиях *in vitro*, чтобы продемонстрировать терапевтическую функциональность антигенсвязывающего полипептида, описанного в настоящем документе, включают действие антигенсвязывающего полипептида на клеточную линию или образец ткани пациента. Действие антигенсвязывающего полипептида на клеточную линию и/или образец ткани можно определить с применением методик, известных специалистам в данной области техники, таких как количественные исследования, раскрытые в другом месте настоящего документа. В соответствии с настоящим изобретением количественные исследования в условиях *in vitro*, которые можно применять для определения показаний для введения специфического антигенсвязывающего полипептида, включают количественные исследования клеточной культуры в условиях *in vitro*, в которых образец ткани пациента выращивают в культуре и подвергают воздействию соединения или вводят соединение иным способом и наблюдают влияние такого соединения на образец ткани.

Различные системы доставки известны и могут применяться для введения антитела согласно настоящему изобретению или полинуклеотида, кодирующего антитело согласно настоящему изобретению, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать соединение, опосредуемый рецептором эндоцитоз (см. например, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), конструирование нуклеиновой кислоты как части ретровирусного или другого вектора и т.д.

Способы диагностики Гиперэкспрессию PD-L1 наблюдают в образцах определенных опухолей, и пациенты, имеющие клетки, гиперэкспрессирующие PD-L1, вероятно, чувствительны к лечению антителами к PD-L1 согласно настоящему изобретению. Соответственно, антитела согласно настоящему изобретению также можно применять для диагностических и прогностических целей.

Образец, который предпочтительно включает клетку, может быть получен от пациента, который может представлять собой пациента с раком или пациента, желающего установить диагноз. Клетка представляет собой клетку опухолевой ткани или опухолевого блока, образец крови, образец мочи или любой образец от пациента. После необязательной предварительной обработки образец можно инкубировать с антителом согласно настоящему изобретению в условиях, обеспечивающих взаимодействие антитела с белком PD-L1, возможно, присутствующим в образце. Для детектирования присутствия белка PD-L1 в образце можно применять такие способы как ИФА, которые позволяют воспользоваться преимуществом антитела к PD-L1.

Присутствие белка PD-L1 в образце (необязательно с данными о количестве или концентрации) можно применять для диагностики рака, как признак того, что пациент подходит для лечения антителом, или как признак того, что пациент ответил (или не ответил) на лечение рака. Для способа прогнозирования детектирование можно осуществлять однократно, двукратно или более раз на определенных этапах после начала лечения рака, чтобы показать прогресс лечения.

Композиции.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям.

Такие композиции содержат эффективное количество антитела и приемлемый носитель.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиция дополнительно содержит второй противораковый агент (например, ингибитор контрольной точки иммунитета).

Согласно конкретному варианту реализации термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечис-

ленный в фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у человека.

Кроме того, "фармацевтически приемлемый носитель" обычно будет являться нетоксичным, твердым, полутвердым или жидким наполнителем, разбавителем, инкапсулирующим материалом или вспомогательным агентом любого типа. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, вспомогательному веществу или основе, с которыми вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая минеральное масло, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является предпочтительным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно применять в качестве жидких носителей, в частности, для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и т.п. При необходимости композиция также может содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или pH-забуферизующих агентов, таких как ацетаты, цитраты или фосфаты. Также предусмотрены антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; и агенты для корректировки тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Такие композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, составов с пролонгированным высвобождением и т.п. Композиция может быть изготовлена в виде суппозитория с обычными связующими веществами и носителями, такими как триглицериды. Состав для перорального введения может содержать стандартные носители, такие как маннит, лактоза, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, целлюлоза, карбонат магния и т.д. фармацевтического качества. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны E. W. Martin в Remington's Pharmaceutical Sciences, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Такие композиции будут содержать терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего полипептида, предпочтительно в очищенной форме, совместно с подходящим количеством носителя так, чтобы обеспечить форму для надлежащего введения пациенту. Состав должен соответствовать способу введения. Исходный препарат может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для нескольких доз, изготовленные из стекла или пластика.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения композиция изготовлена в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения человеку. Обычно композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция также может содержать солубилизирующий агент и местный анестетик, такой как лигнокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Обычно ингредиенты поставляются по отдельности или в смешанном виде в стандартной лекарственной форме, например в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметизированном контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Если композиция предназначена для введения путем инфузии, она может отпусаться с инфузионной бутылкой, содержащей стерильную воду или солевой раствор фармацевтического качества. Если композицию вводят путем инъекции, может быть обеспечена ампула со стерильной водой для инъекций или солевым раствором так, что ингредиенты могут быть смешаны перед введением.

Соединения согласно настоящему изобретению могут быть изготовлены в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные с анионами, такие как соли, происходящие из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и соли, образованные с катионами, такие как соли, происходящие из гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция и трехвалентного железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и др.

Примеры

Пример 1. Получение моноклональных человеческих антител к PD-L1 человека.

Мышинные моноклональные антитела к PD-L1 человека получали с использованием технологии гибридомы.

Антиген: белок PD-L1 человека-Fc и клеточная линия CHOK1, гиперэкспрессирующая PD-L1 человека (клеточная линия PDL1-CHOK1).

Иммунизация. Для получения мышиных моноклональных антител к PD-L1 человека самок мышей линии BALB/c в возрасте 6-8 недель сначала иммунизировали $1,5 \times 10^7$ клеток PDL1-CHOK1. На 14 и 33 день после первой иммунизации иммунизированных мышей повторно иммунизировали $1,5 \times 10^7$ клеток PDL1-CHOK1, соответственно. Для отбора мышей, вырабатывающих антитела, которые связывают белок PD-L1, сыворотку от иммунизированных мышей исследовали методом ИФА. В общих чертах, планшеты для микротитрования покрывали белком PD-L1 человека в концентрации 1 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в количестве 100 мкл/лунку при комнатной температуре (RT) в течение ночи, за-

тем блокировали 100 мкл/лунку 5% БСА. Плазму иммунизированных мышей в различных разведениях добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1-2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали ФСБ/твин и затем инкубировали с антителом к IgG мыши, конъюгированным с пероксидазой хрена (ПХ), в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки окрашивание в планшетах проявляли с помощью субстрата ABTS и анализировали с помощью спектрофотометра при OD 405 нм. Мышей с достаточными титрами IgG к PD-L1 повторно стимулировали 50 мкг белка PD-L1 человека-Fc на 54 день после иммунизации. Полученных мышей использовали для получения гибридом. Супернатанты гибридом исследовали методом ИФА для определения IgG к PD-L1.

Для последующего исследования отбирали клоны гибридом HL1210-3, HL1207-3, HL1207-9 и HL1120-3. Аминокислотные и полинуклеотидные последовательности вариабельных областей HL1210-3 представлены в табл. 5 ниже.

Таблица 5. Последовательности вариабельных областей HL1210-3

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
HL1210-3 V _H	GAAGTGAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTG GAGGGTCCCTGAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTT CAGTAGCTATGACATGTCTTGGGTTCCGACAGCTCCGGAGAAG AGTCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTGGTTACA TCTACTATTTCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTTACCATCTCCAG AGACAATGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAATGAGCAGTCTG AGGTCTGAGGACACGGCCTTGATATTTGTGCAAGAGAATTG GTAAGCGCTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT CACCGTCTCTCA	112
HL1210-3 V _H	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYDMSWVRQTPEK SLEWVATISDGGGYIYSDSVKGRFTISRDNKNNLYLQMSL RSEDTALYICAREFGKRYALDYWGQTSVT	113
HL1210-3 V _L	GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAATTCATGTCCACATCGG TAGGAGACAGGGTCAGCATCTCCTGCAAGGCCAGTCAGGATGT GACTCCTGCTGTCGCCTGGTATCAACAGAAGCCAGGACAATCT CCTAACTACTGATTTACTCCACATCTCCCGGTACACTGGAG TCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTAC TTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTAT	114
	TACTGTGACGAACATTATACTACTCCGCTCACGTTCCGGTGCTG GGACCAAGCTGGAGCTGAAA	
HL1210-3 V _L	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSISCKASQDVTFAVAWYQQKPGQS PKLLIYSTSSRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVY YCQQHYTTPLTFGAGTKLELK	115

Пример 2. Активность связывания мышинового моноклонального антитела HL1210-3 с PD-L1 человека.

Чтобы оценить активность связывания клон гибридомы HL1210-3, очищенные МАТ из этого клон исследовали методом ИФА. В общих чертах, планшеты для микротитрования покрывали белком PD-L1 человека-Fc в концентрации 0,1 мкг/мл в ФСБ в количестве 100 мкл/лунку при 4°C в течение ночи, затем блокировали 100 мкл/лунку 5% БСА. Трехкратные разведения антител HL1210-3, начиная с 0,2 мкг/мл, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1-2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали ФСБ/твин и затем инкубировали с козым антителом к IgG мыши, конъюгированным с пероксидазой хрена (ПХ), в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки окрашивание в планшетах проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при OD 450-630 нм. Как показано на фиг. 1, HL1210-3 может связываться с PD-L1 человека с высокой активностью ($ЭК_{50}=5,539$ нг/мл).

Пример 3. МАТ мыши HL1210-3 блокировало связывание PD-L1 человека с его рецептором PD-1.

Количественное исследование блокирования рецептора с использованием рекомбинантного PD-L1 человека.

Чтобы оценить блокирующее действие МАТ мыши HL1210-3 на связывание рекомбинантного PD-L1 человека с его рецептором PD-1, использовали количественное исследование блокирования рецептора на основе ИФА. В общих чертах, планшеты для микротитрования покрывали белком PD-L1 человека-Fc в концентрации 1 мкг/мл в ФСБ в количестве 100 мкл/лунку при 4°C в течение ночи, затем блокировали 100 мкл/лунку 5% БСА. По 50 мкл меченого биотином белка PD-1 человека-Fc и трехкратных разведений антител HL1210-3, начиная с 2 мкг/мл в 50 мкл, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение

ние 1 ч при 37°C. Планшеты промывали ФСБ/твин и затем инкубировали со стрептавидином-ПХ в течение 1 ч при 37°C. После промывки окрашивание в планшетах проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при OD 450-630 нм. Как показано на фиг. 2, HL1210-3 может эффективно ингибировать связывание PD-L1 человека с PD1 человека при $IC_{50}=0,7835$ нМ.

Количественное исследование блокирования рецептора с использованием клеток млекопитающих, экспрессирующих PD-L1 человека.

Чтобы оценить блокирующее действие МАТ мыши HL1210-3 на связывание PD-L1 человека, экспрессируемого на клетках млекопитающих, с его рецептором PD-1, использовали количественное исследование блокирования рецептора на основе флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS). В общих чертах, клетки PDL1-CHOK1 сначала инкубировали с трехкратными последовательными разведениями моноклонального антитела мыши HL1210-3, начиная с 20 мкг/мл, при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывки буфером для FACS (ФСБ с 2% фетальной бычьей сыворотки (ФБС)), меченый биотином PD-1 человека добавляли в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем в каждую лунку добавляли стрептавидин-ФЭ, инкубировали в течение 0,5 ч и промывали два раза буфером для FACS. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) ФЭ оценивали с помощью FACS Aria III. Как показано на фиг. 3, антитело HL1210-3 может очень эффективно ингибировать связывание PD-1 с PD-L1, экспрессируемым на клетках млекопитающих, при $IC_{50}=2,56$ нМ, при этом максимальная частота ингибирования составила 92,6%.

Ингибирование (%) = $(1 - (MFI \text{ исследуемого антитела} / MFI \text{ контрольной среды})) \times 100\%$.

Пример 4. МАТ мыши HL1210-3 стимулировало иммунный ответ Т-клеток человека.

Чтобы оценить влияние МАТ мыши HL1210-3, ответ Т-клеток человека оценивали в реакции смешанной культуры лимфоцитов. Дендритные клетки (ДК) человека дифференцировали из $CD14^+$ моноцитов в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4 в течение 7 дней. $CD4^+$ Т-клетки, выделенные у другого донора, затем совместно культивировали с ДК и последовательными разведениями блокирующего антитела к PD-L1. На 5 день после инокуляции культуральный супернатант количественно исследовали для определения выработки ИФН- γ . Результаты свидетельствовали о том, что антитела HL1210-3 могут дозозависимым образом стимулировать выработку ИФН- γ , это указывает на то, что антитело к PD-L1 может стимулировать ответ Т-клеток человека (фиг. 4).

Пример 5. Аффинность связывания МАТ мыши HL1210-3.

Связывание антител HL1210-3 с рекомбинантным белком PD-L1 (His-PD-L1 человека) исследовали с помощью BIACORE™ с использованием способа захвата. МАТ мыши HL1210-3 захватывали с использованием антитела к Fc мыши, нанесенного на чип CM5. Последовательные разведения белка His-PD-L1 человека впрыскивали над захваченным антителом в течение 3 мин при скорости потока 25 мкг/мл. Обеспечивали время для диссоциации антигена в течение 900 с. Весь эксперимент осуществляли на Biacore T200. Анализ данных проводили с использованием оценочного программного обеспечения Biacore T200. Результаты представлены на фиг. 5 и в табл. 6 ниже.

Таблица 6. Кинетика связывания HL1210-3 с рекомбинантным PD-L1 человека

Антитело	k_a (1/М·с)	k_d (1/с)	KD (М)
HL1210-3	$1,61 \times 10^5$	$4,69 \times 10^{-5}$	$2,93 \times 10^{-10}$

Пример 6. Гуманизация МАТ мыши HL1210-3.

Гены варибельной области МАТ HL1210-3 использовали для создания гуманизированного МАТ. На первом этапе этого способа аминокислотные последовательности V_H и V_K МАТ HL1210-3 сравнивали с доступной базой данных последовательностей генов Ig человека, чтобы найти общие наиболее совпадающие последовательности генов Ig зародышевой линии человека. Для легкой цепи наиболее сходным геном человека был ген O18/Jk2 и KV1-39*01/KJ2*04, и для тяжелой цепи наиболее сходным геном человека был ген VH3-21. Гены VH3-11, VH3-23, VH3-7*01 и VH3-48 также были отобраны из-за их значительного сходства.

Затем конструировали гуманизированные последовательности варибельного домена, в которых CDR1 (SEQ ID NO: 4), 2 (SEQ ID NO: 5) и 3 (SEQ ID NO: 6) легкой цепи HL1210-3 прививали на каркасные последовательности гена O18/Jk2 и KV1-39*01/KJ2*04, и последовательности CDR1 (SEQ ID NO: 1), 2 (SEQ ID NO: 2) и 3 (SEQ ID NO: 3) VH HL1210-3 прививали на каркасные последовательности гена VH3-21, VH3-11, VH3-23, VH3-48 или VH3-7*01. Затем получали трехмерную модель, чтобы определить, существуют ли какие-либо положения каркаса, в которых замена аминокислоты мыши аминокислотой человека может повлиять на связывание и/или конформацию CDR. В случае легкой цепи в каркасе выявили 22S, 43S, 60D, 63T и 42Q (нумерация по Kabat, см. табл. 7). В случае тяжелой цепи 1E, 37V, 40T, 44S, 49A, 77N, 91I, 94R и 108T в каркасе участвовали в обратных мутациях.

Таблица 7. Дизайн гуманизации

Дизайн V _H I: VH3-21/JH6	
Конструкция	Мутация
Hu1210 V _H	Химера
Hu1210 V _H .1	Привит CDR
Hu1210 V _H .1a	S49A
Hu1210 V _H .1b	S49A, G44S, Y91I
Дизайн V _H II: VH3-11/JH6	
Hu1210 V _H .2	Привит CDR, Q1E
Hu1210 V _H .2a	Q1E, S49A
Hu1210 V _H .2b	Q1E, I37V, S49A, G44S, Y91I
Дизайн V _H III: VH3-23/JH6	
Hu1210 V _H .3	Привит CDR, K94R
Hu1210 V _H .3a	G44S, S49A, Y91I, K94R
Дизайн V _H IV: VH3-48/JH6	
Hu1210 V _H .4	Привит CDR
Hu1210 V _H .4a	S49A
Hu1210 V _H .4b	S49A, G44S, Y91I
Hu1210 V _H .4c	D52E, S49A, G44S, Y91I
Hu1210 V _H .4d	G53A, S49A, G44S, Y91I
Hu1210 V _H .4e	G53V, S49A, G44S, Y91I
Дизайн V _H V: VH3-7*01/ HJ1*01	
Hu1210 V _H .5	Привит CDR
Hu1210 V _H .5a	H91I
Hu1210 V _H .5b	H91I, H108T
Hu1210 V _H .5c	H91I, H77N
Hu1210 V _H .5d	H91I, H77N, H40T
Дизайн V _K I: 018/Jk2	
Конструкция	Мутация
Hu1210 V _K	Химера
Hu1210 V _K .1	Привит CDR
Hu1210 V _K .1a	A43S
Дизайн V _K II: KV1-39*01/KJ2*04	
Hu1210 V _K .2	Привит CDR
Hu1210 V _K .2a	L60D, L63T
Hu1210 V _K .2b	L60D, L63T, L42Q, L43S
Hu1210 V _K .2c	L60D, L63T, L42Q, L43S, T22S

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности некоторых гуманизированных антител перечислены в табл. 8 ниже.

Таблица 8. Последовательности гуманизированных антител
(CDR обозначены жирным шрифтом)

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
HL1210-V _H	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFS SYDMS WVRQTPEKSL EWVAT ISDGGGYIYYSDSVKGR FTISRDNAKNNLYLQMSSLRAED TALYICARE EFGKRYALDY WGQGTSTVTVSS	7
Hu1210 V _H .1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WVRQAPGKGL EWVST ISDGGGYIYYSDSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARE EFGKRYALDY WGQGTSTVTVSS	8
Hu1210 V _H .1a	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WVRQAPGKGL EWVAT ISDGGGYIYYSDSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARE EFGKRYALDY WGQGTSTVTVSS	9
Hu1210 V _H .1b	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WVRQAPGKSL EWVAT ISDGGGYIYYSDSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYICARE EFGKRYALDY WGQGTSTVTVSS	10
Hu1210 V _H .2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WIRQAPGKGL EWVST ISDGGGYIYYSDSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARE EFGKRYALDY WGQGTSTVTVSS	11
Hu1210 V _H .2a	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WIRQAPGKGL EWVAT ISDGGGYIYYSDSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARE EFGKRYALDY WGQGTSTVTVSS	12
Hu1210 V _H .2b	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WVRQAPGKSL EWVAT ISDGGGYIYYSDSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYICARE EFGKRYALDY WGQGTSTVTVSS	13
Hu1210 V _H .3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WVRQAPGKGL EWVST ISDGGGYIYYSDSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARE EFGKRYALDY WGQGTSTVTVSS	14
Hu1210 V _H .3a	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMS WVRQAPGKSL EWVAT ISDGGGYIYYSDSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYICARE EFGKRYALDY WGQGTSTVTVSS	15

Hu1210 V _{H.4}	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKGL EWV STISDGGGYIYYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDED TAVYYCARE EFGKRYALDYWGQGT TVTVSS	16
Hu1210 V _{H.4a}	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKGL EWV ATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDED TAVYYCARE EFGKRYALDYWGQGT TVTVSS	17
Hu1210 V _{H.4b}	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKSL EWV ATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDED TAVYICARE EFGKRYALDYWGQGT TVTVSS	18
Hu1210 V _{H.4c}	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKSL EWV ATISEGGGYIYYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDED TAVYICARE EFGKRYALDYWGQGT TVTVSS	19
Hu1210 V _{H.4d}	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKSL EWV ATISDAGGYIYYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDED TAVYICARE EFGKRYALDYWGQGT TVTVSS	20
Hu1210 V _{H.4e}	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKSL EWV ATISDVGGYIYYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDED TAVYICARE EFGKRYALDYWGQGT TVTVSS	21
Hu1210 V _{H.5}	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKGL EWV ATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARE EFGKRYALDYWGQGT LTVTVSS	22
HU1210 V _{H.5a}	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKGL EWV ATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYICARE EFGKRYALDYWGQGT LTVTVSS	23
HU1210 V _{H.5b}	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKGL EWV ATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYICARE EFGKRYALDYWGQGT TVTVSS	24
HU1210 V _{H.5C}	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQAPGKGL EWV ATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMNSLRAED TAVYICARE EFGKRYALDYWGQGT LTVTVSS	25
HU1210 V _{H.5d}	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYDMSWVRQTPEKSL EWV ATISDGGGYIYYSDSVKGRFTISRDNAKNNLYLQMNSLRAED TAVYICARE EFGKRYALDYWGQGT LTVTVSS	26

HL1210-VK	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSISC KASQDVTP PAVAWYQQKPGQSPK LLIY STSSRYT GVDPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC QQ HYTTPLT FGAGTKLELK	27
Hu1210 VK.1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KASQDVTP PAVAWYQQKPGKAPK LLIY STSSRYT GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAATYYC QQ HYTTPLT FGQGTKLEIK	28
Hu1210 VK.1a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KASQDVTP PAVAWYQQKPGKSPK LLIY STSSRYT GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAATYYC QQ HYTTPLT FGQGTKLEIK	29
Hu1210 Vk.2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KASQDVTP PAVAWYQQKPGKAPK LLIY STSSRYT GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQ HYTTPLT FGQGTKLEIKR	30
Hu1210 Vk.2a	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KASQDVTP PAVAWYQQKPGKAPK LLIY STSSRYT GVDPDRFTGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQ HYTTPLT FGQGTKLEIKR	31
Hu1210 Vk.2b	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC KASQDVTP PAVAWYQQKPGQSPK LLIY STSSRYT GVDPDRFTGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQ HYTTPLT FGQGTKLEIKR	32
Hu1210 Vk.2c	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIS CASQDVTP PAVAWYQQKPGQSPK LLIY STSSRYT GVDPDRFTGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQ HYTTPLT FGQGTKLEIKR	33
HL1210 V _H	GAGGTGAAGCTGGTGGAGAGCGGCGGAGATCTGGTGAAGCCTGGC GGCAGCCTGAAGCTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGC AGCTACGACATGAGCTGGGTGAGGCAGACCCCGAGAAGAGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCAGCGATGGCGGCGGCTACATCTACTAC AGCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCC AAGAACAACCTGTACCTGCAGATGAGCAGCCTGAGGAGCGAGGAC ACCGCCCTGTACATCTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAGAGGTACGCC CTGGACTACTGGGGACAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGC	34
Hu1210 V _H .1	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGAAGCCCGGA GGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGC AGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCCCCCTGGCAAAGGCCTG GAGTGGGTGAGCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCC	35

	AAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCC CTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	
Hu1210 V _H .1a	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGAAGCCCGGA GGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGC AGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGGCGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCC AAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCC CTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	36
Hu1210 V _H .1b	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGAAGCCCGGA GGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGC AGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGGCGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCC AAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGAC ACCGCCGTGTACATCTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCC CTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	37
Hu1210 V _H .2	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGAAGCCCGGA GGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGC AGCTACGACATGAGCTGGATCAGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTG GAGTGGGTGAGCACCATCTCCGATGGCGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCC AAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCC CTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	38
Hu1210 V _H .2a	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGAAGCCCGGA GGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGC AGCTACGACATGAGCTGGATCAGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGGCGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCC AAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAAGGTACGCC	39

	CTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	
Hu1210 V _H .2b	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGAAGCCCGGA GGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGC AGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCCCTGGCAAAGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCC AAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGAC ACCGCCGTGTACATCTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAGGTACGCC CTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	40
Hu1210 V _H .3	GAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAACCCGGA GGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGC AGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTG GAGTGGGTGAGCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACAGC AAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAGGTACGCC CTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	41
Hu1210 V _H .3a	GAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAACCCGGA GGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGC AGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCCCTGGCAAAGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACAGC AAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGAC ACCGCCGTGTACATCTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAGGTACGCC CTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	42
Hu1210 V _H .4	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAACCCGGA GGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGC AGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTG GAGTGGGTGAGCACCATCTCCGATGGCGGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCC AAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGATGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAGGTACGCC CTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	43
Hu1210 V _H .4a	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAACCCGGA 	44

	GGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGC AGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCCCTGGCAAAGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGGCGGGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCC AAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGATGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAGGTACGCC CTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	
Hu1210 V _H .4b	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAACCCGGA GGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGC AGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCCCTGGCAAAGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGGCGGGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCC AAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGATGAGGAC ACCGCCGTGTACATCTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAGGTACGCC CTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	45
Hu1210 V _H .4c	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAACCCGGA GGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGC AGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCCCTGGCAAAGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGGCGGGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCC AAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGATGAGGAC ACCGCCGTGTACATCTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAGGTACGCC CTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	46
Hu1210_V _H .4d	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAACCCGGA GGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGC AGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCCCTGGCAAAGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGGCGGGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCC AAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGATGAGGAC ACCGCCGTGTACATCTGCGCCAGGGAGTTCGGCAAAGGTACGCC CTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGTGAGCAGC	47
Hu1210_V _H .4e	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAACCCGGA GGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGC AGCTACGACATGAGCTGGGTGAGACAGGCCCTGGCAAAGCCTG	48

	GAGTGGGTGGCCACCATCTCCGATGTTGGCGGCTACATCTATTAC TCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCC AAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGATGAGGAC ACCGCCGTGTACATCTGCGCCAGGGAGTTTCGGCAAAAGGTACGCC CTGGACTACTGGGGCCAGGGCACAAACCGTGACCGTGAGCAGC	
Hu1210 V _H .5	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGCAACCTGGA GGCTCCCTGAGGCTGTCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGC TCCTACGATATGAGCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCTCCGACGGAGGCGGCTACATCTACTAC TCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCGGGACAACGCC AAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACCTCTCTCAGGGCTGAGGAC ACCGCCGTGTATTACTGCGCCAGGGAGTTTGGCAAGAGGTACGCC CTGGATTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGAGCTCC	49
Hu1210 V _H .5a	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGCAACCTGGA GGCTCCCTGAGGCTGTCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGC TCCTACGATATGAGCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCTCCGACGGAGGCGGCTACATCTACTAC TCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCGGGACAACGCC AAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACCTCTCTCAGGGCTGAGGAC ACCGCCGTGTATATCTGCGCCAGGGAGTTTGGCAAGAGGTACGCC CTGGATTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGAGCTCC	50
Hu1210 V _H .5b	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGCAACCTGGA GGCTCCCTGAGGCTGTCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGC TCCTACGATATGAGCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCTCCGACGGAGGCGGCTACATCTACTAC TCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCGGGACAACGCC AAGAACAACCTGTACCTGCAGATGAACCTCTCTCAGGGCTGAGGAC ACCGCCGTGTATATCTGCGCCAGGGAGTTTGGCAAGAGGTACGCC CTGGATTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGAGCTCC	51
Hu1210 V _H .5c	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGCAACCTGGA GGCTCCCTGAGGCTGTCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGC TCCTACGATATGAGCTGGGTGAGGCAGACCCCTGAGAAGAGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCTCCGACGGAGGCGGCTACATCTACTAC TCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCGGGACAACGCC	52

	AAGAACAACCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTCAGGGCTGAGGAC ACCGCCGTGTATATCTGCGCCAGGGAGTTTGGCAAGAGGTACGCC CTGGATTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTGAGCTCC	
Hu1210_VH.5d	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCCTGGTGCAACCTGGA GGCTCCCTGAGGCTGTCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGC TCCTACGATATGAGCTGGGTGAGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTG GAGTGGGTGGCCACCATCTCCGACGGAGGCGGTACATCTACTAC TCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCCGGGACAACGCC AAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTCAGGGCTGAGGAC ACCGCCGTGTATATCTGCGCCAGGGAGTTTGGCAAGAGGTACGCC CTGGATTACTGGGGCCAGGGCACAAACCGTGACAGTGAGCTCC	53
HL1210 VK	GACATCGTGATGACCCAGAGCCACAAGTTCATGAGCACCAGCGTG GGCGATAGGGTGAGCATCAGCTGCAAGGCCAGCCAGGATGTGACC CCTGCCGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCAAG CTGCTGATCTACAGCACCAGCAGCAGGTACACCGGCGTGCCCGAC AGGTTTACAGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTTCACCATC AGCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAG CACTACACCACCCCTCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAG CTGAAG	54
Hu1210 VK.1	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTG GGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGATGTGACC CCTGCCGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCAAG CTGCTGATCTACAGCACCAGCAGCAGGTACACCGGCGTGCCAGC AGGTTTAGCGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCCGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAGCAG CACTACACCACCCCTCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAG ATCAAG	55
Hu1210 VK.1a	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCTAGCGTG GGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGATGTGACC CCTGCCGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGTCCCCAAG CTGCTGATCTACAGCACCAGCAGCAGGTACACCGGCGTGCCAGC AGGTTTAGCGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCCGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAGCAG CACTACACCACCCCTCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAG	56

	ATCAAG	
Hu1210 VK.2	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCTAGCAGCCTGTCCGCTTCCGTG GGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACGTGACA CCTGCTGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTGGCAAGGCTCCTAAG CTCCTGATCTACAGCACATCCTCCCGGTACACCGGAGTGCCCTCC AGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTTACCCCTGACCATT TCCTCCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAG CACTACACCACACCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAG ATCAAGCGG	57
Hu1210 VK.2a	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCTAGCAGCCTGTCCGCTTCCGTG GGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACGTGACA CCTGCTGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTGGCAAGGCTCCTAAG CTCCTGATCTACAGCACATCCTCCCGGTACACCGGAGTGCCCGAC AGGTTTACCGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTTACCCCTGACCATT TCCTCCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAG CACTACACCACACCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAG ATCAAGCGG	58
Hu1210 VK.2b	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCTAGCAGCCTGTCCGCTTCCGTG GGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAAGGCCAGCCAGGACGTGACA CCTGCTGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTGGCCAGAGCCCTAAG CTCCTGATCTACAGCACATCCTCCCGGTACACCGGAGTGCCCGAC AGGTTTACCGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTTACCCCTGACCATT TCCTCCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAG CACTACACCACACCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAG ATCAAGCGG	59
Hu1210 VK.2c	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCTAGCAGCCTGTCCGCTTCCGTG GGCGACAGGGTGACCATCAGCTGCAAGGCCAGCCAGGACGTGACA CCTGCTGTGGCCTGGTATCAACAGAAGCCTGGCCAGAGCCCTAAG CTCCTGATCTACAGCACATCCTCCCGGTACACCGGAGTGCCCGAC AGGTTTACCGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTTACCCCTGACCATT TCCTCCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAG CACTACACCACACCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAG ATCAAGCGG	60

Гены гуманизированных V_H и V_K получали синтетическим способом и затем, соответственно, клонировали в векторы, содержащие константные домены гамма-1 цепи и каппа-цепи человека. Спаривание V_H человека и V_K человека позволило получить 40 гуманизированных антител (см. табл. 9).

Таблица 9. Гуманизированные антитела и их области V_H и V_L

V_H	Hu1210	Hu1210	Hu1210	Hu1210	Hu1210	Hu1210	Hu1210
V_K	$V_{H.1}$	$V_{H.1a}$	$V_{H.1b}$	$V_{H.2}$	$V_{H.2a}$	$V_{H.2.b}$	V_H
Hu1210 Vk.1	Hu1210-1	Hu1210-2	Hu1210-3	Hu1210-4	Hu1210-5		
Hu1210 Vk.1a	Hu1210-7	Hu1210-8	Hu1210-9	Hu1210-10	Hu1210-11		
Hu1210 Vk							Химера H1210
V_H	Hu1210 $V_{H.3}$	Hu1210 $V_{H.3a}$	Hu1210 $V_{H.4}$	Hu1210 $V_{H.4a}$	Hu1210 $V_{H.4b}$		
Hu1210 Vk.1	Hu1210-13	Hu1210-14	Hu1210-15	Hu1210-16	Hu1210-17		
Hu1210 Vk.1a	Hu1210-18	Hu1210-19	Hu1210-20	Hu1210-21	Hu1210-22		

V_H	Hu1210 V_H.5	HU1210 V_H.5a	HU1210 V_H.5b	HU1210 V_H.5c	HU1210 V_H.5d
V_K					
Hu1210 V _K .2	Hu1210-23	Hu1210-27	Hu1210-31	Hu1210-32	Hu1210-36
Hu1210 V _K .2a	Hu1210-24	Hu1210-28		Hu1210-33	Hu1210-37
Hu1210 V _K .2b	Hu1210-25	Hu1210-29		Hu1210-34	Hu1210-38
Hu1210 V _K .2c	Hu1210-26	Hu1210-30		Hu1210-35	Hu1210-39
V_H					
V_K					
Hu1210 V _K .1	Hu1210-40	Hu1210-41		Hu1210-42	

Пример 7. Антигенсвязывающие свойства гуманизированных антител к PD-L1.

Способность связываться с рекомбинантным PD-L1 человека.

Для оценки антигенсвязывающей активности гуманизированные антитела исследовали методом ИФА. В общих чертах, планшеты для микротитрования покрывали белком PD-L1 человека-Fc в концентрации 0,1 мкг/мл в ФСБ в количестве 100 мкл/лунку при 4°C в течение ночи, затем блокировали 100 мкл/лунку 5% БСА. Пятикратные разведения гуманизированных антител, начиная с 10 мкг/мл, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1-2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали ФСБ/твин и затем инкубировали с козьим антителом к IgG мыши, конъюгированным с пероксидазой хрена (ПХ), в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки окрашивание в планшетах проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при OD 450-630 нм. Как показано на фиг. 6, все гуманизированные антитела проявляли эффективность связывания с PD-L1 человека, сопоставимую с эффективностью химерного антитела.

Способность связываться с PD-L1 человека, экспрессируемым на клетках млекопитающего.

Чтобы оценить антигенсвязывающее свойство, гуманизированные антитела исследовали для определения их связывания с PD-L1, экспрессируемым на клетках млекопитающего, методом FACS. В общих чертах, клетки PDL1-CHOK1 сначала инкубировали с пятикратными последовательными разведениями гуманизированных антител, начиная с 2 мкг/мл, при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывки буфером для FACS (ФСБ с 2% ФБС) в каждую лунку добавляли конъюгированное с Alexa-488 антитело к IgG человека и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. MFI Alexa-488 оценивали с помощью FACS Aria III. Как показано на фиг. 7, все гуманизированные антитела могут очень эффективно связываться с PD-L1, экспрессируемым на клетках млекопитающего, сопоставимо с химерным антителом.

Чтобы исследовать кинетику связывания гуманизированного антитела, в данном примере выполняли ранжирование аффинности с использованием Octet Red 96.

Как показано в табл. 10, Hu1210-3, Hu1210-8, Hu1210-9, Hu1210-14, Hu1210-17, Hu1210-1 и Hu1210-22 проявили лучшую аффинность, которая была сопоставима с аффинностью химерного антитела.

Таблица 10. Ранжирование аффинности гуманизированных антител

Антитело	KD (M)	kon(1/M·c)	kdis(1/c)	Антитело	KD (M)	kon(1/M·c)	kdis(1/c)
Hu1210 (mIgG)	7,16×10 ⁻⁹	3,94×10 ⁵	2,83×10 ⁻³	Hu1210-11	4,18×10 ⁻⁹	7,54×10 ⁻⁴	3,15×10 ⁻⁴
Химера Hu1210	1,07×10 ⁻⁹	1,62×10 ⁵	1,73×10 ⁻⁴	Hu1210-13	4,36×10 ⁻⁹	8,38×10 ⁻⁴	3,66×10 ⁻⁴
Hu1210-1	4,25×10 ⁻⁹	7,10×10 ⁻⁴	3,02×10 ⁻⁴	Hu1210-14	2,34×10 ⁻⁹	8,41×10 ⁻⁴	1,97×10 ⁻⁴
Hu1210-2	3,23×10 ⁻⁹	7,78×10 ⁻⁴	2,51×10 ⁻⁴	Hu1210-15	4,45×10 ⁻⁹	7,87×10 ⁻⁴	3,50×10 ⁻⁴
Hu1210-3	2,64×10 ⁻⁹	8,62×10 ⁻⁴	2,28×10 ⁻⁴	Hu1210-16	3,14×10 ⁻⁹	8,41×10 ⁻⁴	2,64×10 ⁻⁴
Hu1210-4	7,68×10 ⁻⁹	7,12×10 ⁻⁴	5,46×10 ⁻⁴	Hu1210-17	2,20×10 ⁻⁹	8,17×10 ⁻⁴	1,80×10 ⁻⁴
Hu1210-5	4,83×10 ⁻⁹	7,93×10 ⁻⁴	3,83×10 ⁻⁴	Hu1210-18	4,50×10 ⁻⁹	7,92×10 ⁻⁴	3,57×10 ⁻⁴
Hu1210-7	4,78×10 ⁻⁹	8,45×10 ⁻⁴	4,04×10 ⁻⁴	Hu1210-19	2,50×10 ⁻⁹	9,03×10 ⁻⁴	2,25×10 ⁻⁴
Hu1210-8	1,64×10 ⁻⁹	7,72×10 ⁻⁴	1,27×10 ⁻⁴	Hu1210-20	4,51×10 ⁻⁹	8,87×10 ⁻⁴	4,00×10 ⁻⁴
Hu1210-9	2,33×10 ⁻⁹	8,37×10 ⁻⁴	1,95×10 ⁻⁴	Hu1210-21	3,12×10 ⁻⁹	9,39×10 ⁻⁴	2,93×10 ⁻⁴
Hu1210-10	7,03×10 ⁻⁹	8,59×10 ⁻⁴	6,04×10 ⁻⁴	Hu1210-22	2,56×10 ⁻⁹	9,00×10 ⁻⁴	2,30×10 ⁻⁴

Полное кинетическое исследование аффинности гуманизированных антител с помощью Biacore™.

Связывание гуманизированных антител с рекомбинантным белком PD-L1 (PD-L1 человека-His метка) исследовали с помощью BIACORE™ с использованием способа захвата. МАТ мыши HL1210-3 захватывали с использованием антитела к Fc мыши, нанесенного на чип CM5. Последовательное разведение белка His-PD-L1 человека впрыскивали над захваченным антителом в течение 3 мин при скорости потока 25 мкг/мл. Обеспечивали время для диссоциации антигена в течение 900 с. Весь эксперимент осуществляли на Biacore T200. Анализ данных проводили с использованием оценочного программного обеспечения Biacore T200, и результаты представлены в табл. 11 ниже.

Таблица 11. Аффинность согласно данным Biotacore

Антитело	ka (1/М·с)	kd (1/с)	KD (М)
Hu1210-8	$9,346 \times 10^{-4}$	$7,169 \times 10^{-5}$	$7,671 \times 10^{-10}$
Hu1210-9	$9,856 \times 10^{-4}$	$4,528 \times 10^{-5}$	$4,594 \times 10^{-10}$
Hu1210-14	$1,216 \times 10^{-5}$	$5,293 \times 10^{-5}$	$4,352 \times 10^{-10}$
Hu1210-16	$9,978 \times 10^{-4}$	$6,704 \times 10^{-5}$	$6,720 \times 10^{-10}$
Hu1210-17	$1,101 \times 10^{-5}$	$2,128 \times 10^{-5}$	$1,933 \times 10^{-10}$
Hu1210-28	$1,289 \times 10^{-5}$	$1,080 \times 10^{-4}$	$8,378 \times 10^{-10}$
Hu1210-31	$1,486 \times 10^{-5}$	$1,168 \times 10^{-4}$	$7,862 \times 10^{-10}$
Hu1210-36	$1,461 \times 10^{-5}$	$7,852 \times 10^{-5}$	$5,376 \times 10^{-10}$
Hu1210-40	$8,77 \times 10^{-4}$	$1,31 \times 10^{-4}$	$1,49 \times 10^{-9}$
Hu1210-41	$9,17 \times 10^{-4}$	$3,46 \times 10^{-5}$	$3,78 \times 10^{-10}$
Hu1210-42	$8,68 \times 10^{-4}$	$7,53 \times 10^{-5}$	$8,67 \times 10^{-10}$
Химера 1210	$1,236 \times 10^{-5}$	$3,265 \times 10^{-5}$	$2,642 \times 10^{-10}$

Межвидовая активность.

Чтобы оценить связывание гуманизированных антител с PD-L1 человека, PD-L1 мыши, PD-L1 крысы и PD-L1 макаки-резуса, антитела исследовали методом ИФА. В общих чертах, планшеты для микротитрования покрывали белком PD-L1-Fc человека, мыши, крысы и макаки-резуса в концентрации 1 мкг/мл в ФСБ в количестве 100 мкл/лунку при 4°C в течение ночи, затем блокировали 100 мкл/лунку 5% БСА. Трехкратные разведения гуманизированных антител, начиная с 1 мкг/мл, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1-2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали ФСБ/твин и затем инкубировали с козым антителом к IgG мыши, конъюгированным с пероксидазой хрена (ПХ), в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки окрашивание в планшетах проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при OD 450-630 нм. Антитело Hu1210-41 связывалось с PD-L1 макаки-резуса с более низкой аффинностью и не связывалось с PD-L1 крысы и мыши (фиг. 8).

	Человек	Макака-резус	Крыса	Мышь
ЭК ₅₀	0,215 нМ	0,628 нМ	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует

Специфичность в отношении члена семейства.

Чтобы оценить связывание гуманизированного антитела к PD-L1 с семейством B7 человека и другой контрольной точкой иммунитета, оценивали связывание антитела с B7-H1 (PD-L1), B7-DC, B7-1, B7-2, B7-H2, PD-1, CD28, CTLA4, ICOS и BTLA методом ИФА. Как показано на фиг. 9, антитело Hu1210-41 может специфически связываться только с B7-H1 (PD-L1).

Пример 8. Гуманизированные антитела блокировали активность PD-L1 человека в отношении PD-1. Клеточное количественное исследование блокирования рецептора.

Чтобы оценить блокирующее действие гуманизированных антител на связывание PD-L1 человека, экспрессируемого на клетках млекопитающих, с его рецептором PD-1, применяли количественное исследование блокирования рецептора на основе FACS. В общих чертах, клетки PDL1-CHOK1 сначала инкубировали с трехкратными последовательными разведениями моноклонального антитела мыши HL1210-3, начиная с 20 мкг/мл, при комнатной температуре в течение 1 ч. После промывки буфером для FACS (ФСБ с 2% ФБС) меченый биотином PD-1 человека добавляли в каждую лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем в каждую лунку добавляли стрептавидин-ФЭ и инкубировали в течение 0,5 ч с последующей двукратной промывкой буфером для FACS. Среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) ФЭ оценивали с помощью FACSAriaIII.

Ингибирование (%) = $(1 - (\text{MFI исследуемого антитела} / \text{MFI контрольной среды})) \times 100\%$ Как показано в табл. 12 ниже, антитела Hu1210-3, Hu1210-9, Hu1210-8, Hu1210-14, Hu1210-17, Hu1210-19 и Hu1210-22 блокировали связывание PD-L1 с PD-1 с эффективностью, которая была сопоставима с эффективностью химерного антитела.

Таблица 12. Количественное исследование блокирования рецептора PD-1

	Bio-PD1(30 мкг/мл)	
	Максимум	ЭК ₅₀
Химера H1210	87,16	3,961
Hu1210-8	86,35	4,194
Hu1210-9	85,7	4,038
Hu1210-16	88,02	5,436
Hu1210-17	80,88	4,424
Hu1210-3	84,28	3,693
Hu1210-14	79,56	3,572
Hu1210-19	87,45	4,52
Hu1210-22	85,83	4,505
Hu1210-27	103,9	11,48
Hu1210-31	92,91	6,179
Hu1210-36	91,75	8,175

Количественное исследование блокирования рецептора с использованием рекомбинантного PD-L1 человека.

Существует два рецептора для PD-L1 человека, т.е. PD-1 и B7-1. Чтобы исследовать способность гуманизированного антитела к PD-L1 блокировать эти два белка, применяли количественное исследование блокирования рецептора на основе белка. В общих чертах, планшеты для микротитрования покрывали белком PD-L1 человека-Fc в концентрации 1 мкг/мл в ФСБ в количестве 100 мкл/лунку при 4°C в течение ночи, затем блокировали 200 мкл/лунку 5% БСА при 37°C в течение 2 ч. По 50 мкл меченого биотином PD-1 человека-Fc или белка B7-1 человека и пятикратных разведений антител к PD-L1, начиная с 100 нМ в объеме 50 мкл, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Планшеты промывали ФСБ/твин и затем инкубировали со стрептавидином-ПХ в течение 1 ч при 37°C. После промывки окрашивание в планшетах проявляли с помощью субстрата ТМВ и анализировали с помощью спектрофотометра при OD 450 нм. Как показано на фиг. 10 и 11, Hu1210-41 может эффективно ингибировать связывание PD-L1 человека с PD1 человека и B7-1 человека.

Пример 9. Гуманизированное антитело стимулирует иммунный ответ Т-клеток человека.

Количественное исследование с помощью реакции смешанной культуры лимфоцитов.

Чтобы оценить функцию гуманизированных антител в условиях *in vitro*, ответ Т-клеток человека оценивали в реакции смешанной культуры лимфоцитов. ДК человека дифференцировали из моноцитов CD14⁺ в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4 в течение 7 дней. CD4⁺ Т-клетки, выделенные от другого донора, затем совместно культивировали с ДК и последовательными разведениями блокирующего антитела к PD-L1. На 5 день после инокуляции культуральный супернатант количественно исследовали для определения выработки ИЛ-2 и ИФН-γ. Результаты свидетельствовали о том, что антитела Hu1210-8, Hu1210-9, Hu1210-16 и Hu1210-17 могли дозозависимым образом стимулировать выработку ИЛ-2 и ИФН-γ, это указывает на то, что антитела PD-L1 могут стимулировать ответ Т-клеток человека.

Количественное исследование вторичного иммунного ответа на ЦМВ.

Чтобы оценить функцию гуманизированных антител в условиях *in vitro*, ответ Т-клеток человека оценивали в количественном исследовании вторичного иммунного ответа на ЦМВ. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека стимулировали 1 мкг/мл антигена ЦМВ в присутствии последовательных разведений гуманизированных антител. Как показано на фиг. 12 и 13, Hu1210-40, Hu1210-41 и Hu1210-17 могут дозозависимым образом стимулировать выработку ИФН-γ.

Пример 10. Ингибирование роста опухоли под действием МАТ к PD-L1.

Клетки из линии клеток аденокарциномы легких человека HCC827 трансплантировали мышам линии NOD/SCIDγ (NSG). Мыши NSG представляют собой NOD/SCID дефицитных мышей и имеют наибольшую степень иммунодефицита, что делает их идеальными реципиентами для прививки опухолевых клеток человека и МКПК. Через 10 дней после прививки МКПК человека трансплантировали мышам с опухолями. Приблизительно через 20 дней после прививки, когда объем опухоли достигал 100-150 мм³, антитело к PD-L1 вводили мышам каждые два дня в дозе 5 мг/кг. Объем опухоли контролировали каждые два дня в комбинации с введением антител. Как показано на фиг. 14, Hu1210-31 в дозе 5 мг/кг может ингибировать рост опухоли на 30%. Антитело Hu1210-41 может дозозависимым образом ингибировать рост опухоли, при этом антитело Hu1210-41 также дозозависимым образом подавляло увеличение массы опухоли (фиг. 15).

Пример 11. Компьютерное моделирование дальнейшего изменения и оптимизации гуманизированных антител.

Предполагалось, что определенные аминокислотные остатки в участках CDR или каркасных участках могут быть изменены для дополнительного улучшения или сохранения активности и/или стабильности антител. Варианты исследовали с помощью вычислительного инструмента (VectorNTI, доступного по адресу www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo) в отношении их структурных, конформационных и функциональных свойств, и наиболее перспективные из них (в пределах участков CDR) перечислены в таблицах ниже.

Таблица 13. CDR V_H и V_L и их варианты, подходящие для включения в гуманизированные антитела

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
CDR1 V _H	<u>SYDMS</u>	1
	<u>T</u> YDMS	61
	<u>C</u> YDMS	62
	S <u>E</u> DMS	63
	S <u>H</u> DMS	64
	S <u>W</u> DMS	65
	SYDM <u>I</u>	66
	SYDM <u>C</u>	67
CDR2 V _H	TISDGG<u>G</u>YIYSD<u>S</u>VKG	2
	TISDGG <u>A</u> YIYSDSVKG	68
	TISDGG <u>P</u> YIYSDSVKG	69
	TISDGG <u>G</u> EYIYSDSVKG	70
	TISDGGG <u>H</u> IYIYSDSVKG	71
	TISDGGG <u>W</u> IYIYSDSVKG	72
	TISDGGGYIYSD <u>T</u> VKG	73
	TISDGGGYIYSD <u>C</u> VKG	74
	TISDGGGYIYSDS <u>L</u> KG	75
	TISDGGGYIYSDS <u>I</u> KG	76
	TISDGGGYIYSDS <u>M</u> KG	77
CDR3 V _H	<u>EFGKRY</u>ALDY	3
	<u>Q</u> FGKRYALDY	78
	<u>D</u> FGKRYALDY	79
	<u>N</u> FGKRYALDY	80
	E <u>Y</u> GKRYALDY	81
	E <u>H</u> GKRYALDY	82
	E <u>W</u> GKRYALDY	83
	E <u>F</u> AKRYALDY	84
	E <u>F</u> PKRYALDY	85
	EFG <u>R</u> RYALDY	86
	EFGK <u>K</u> YALDY	87
	EFGK <u>R</u> EALDY	88
	EFGKR <u>H</u> ALDY	89
	EFGKR <u>W</u> ALDY	90
CDR1 V _L	KASQDVTPAVA	4
	KATQDVTPAVA	91
	KACQDVTPAVA	92

CDR2 V _L	<u>STSSRYT</u>	5
	<u>T</u> TSSRYT	93
	<u>C</u> TSSRYT	94
	S <u>S</u> SSRYT	95
	S <u>M</u> SSRYT	96
	S <u>V</u> SSRYT	97
	ST <u>T</u> SSRYT	98
	ST <u>C</u> SSRYT	99
	STST <u>R</u> RYT	100
	STST <u>C</u> RYT	101
	STSS <u>K</u> RYT	102
	STSSR <u>E</u> T	103
	STSSRH <u>T</u>	104
	STSSRW <u>T</u>	105
CDR3 V _L	<u>QQHYTTPLT</u>	6
	<u>E</u> QHYTTPLT	106
	<u>D</u> QHYTTPLT	107
	<u>N</u> QHYTTPLT	108
	Q <u>E</u> HYTTPLT	109
	Q <u>D</u> HYTTPLT	110
	Q <u>N</u> HYTTPLT	111

Подчеркивание: остатки мутационных горячих точек и их замены.

Пример 12. Выявление эпитопа PD-L1.

Настоящее исследование проводили для выявления остатков аминокислот, вовлеченных в связывание PD-L1 с антителами согласно настоящему изобретению. Конструировали библиотеку PD-L1 для сканирования аланином. В общих чертах, 217 мутантных клонов PD-L1 получали на платформе для модификации белков Integral Molecular. Связывание Fab Hu1210-41 с каждым вариантом в библиотеке мутаций PD-L1 определяли с двумя повторами с помощью высокопроизводительной проточной цитометрии. Из необработанных данных для каждой точки вычитали фоновую интенсивность флуоресценции и нормировали к реактивности в отношении PD-L1 дикого типа (WT). Для каждого варианта PD-L1 среднее значение связывания наносили на график как функцию экспрессии (в качестве контроля использовали реактивность МАТ к PD-L1). Для выявления предварительных существенных клонов (кружки с крестиками) применяли пороги (пунктирные линии) >70% связывания WT с контрольным МАТ и <30% реактивности WT в отношении Fab Hu1210-41 (фиг. 16). Y134, K162 и N183 PD-L1 были выявлены как остатки, необходимые для связывания Hu1210-41. Низкая реактивность клона N183A в отношении Fab Hu1210-41 указывала на то, что он вносит основной энергетический вклад в связывание Hu1210-41, при этом Y134 и K162 вносили меньший вклад.

Существенные остатки (сферы) выявляли на 3D-структуре PD-L1 (PDB ID# 5JDR, Zhang et al., 2017), проиллюстрированной на фиг. 17. Соответственно, остатки Y134, K162 и N183 составляют эпитоп PD-L1, ответственный за связывание с антителами согласно различным вариантам реализации настоящего изобретения.

Интересно отметить, что все остатки Y134, K162 и N183 находятся в пределах домена IgC белка PD-L1. Внеклеточные части как PD-1, так и PD-L1 имеют домен IgV и домен IgC. Общеизвестно, что PD-L1 связывается с PD-1 за счет связывания между их доменами IgV. Тем не менее, в отличие от таких обычных антител Hu1210-41 связывается с доменом IgC, который, как могло ожидать, неэффективен в ингибировании связывания PD-1/PD-L1. Неожиданным фактом явилось то, что другой эпитоп Hu1210-41, вероятно, вносит вклад в превосходную активность Hu1210-41. Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться описанными конкретными вариантами реализации, которые предназначены в качестве отдельных иллюстраций конкретных аспектов настоящего изобретения, и любые композиции или способы, которые являются функционально эквивалентными, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Специалисты в данной области техники поймут, что в способы и композиции согласно настоящему изобретению могут быть внесены различные модификации и изменения, не выходя за пределы сущности и объема настоящего изобретения. Соответственно, предусмотрено, что настоящее

изобретение включает модификации и варианты настоящего изобретения при условии, что они включены в объем прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

Все публикации и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент была конкретно и индивидуально указана для включения посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его фрагмент, характеризующиеся тем, что указанное антитело или его фрагмент обладает специфичностью к белку лиганда рецептора запрограммированной гибели клеток 1 человека (PD-L1) и содержит CDR1 V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 CDR2 V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 2 с заменой, выбранной из D52E, G53A, или G53V в соответствии с нумерацией по Kabat, CDR3 V_H, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, CDR1 V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 V_L, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

2. Антитело или его фрагмент по п.1, характеризующиеся тем, что указанный CDR2 V_H содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 с заменой G53A.

3. Антитело или его фрагмент по п.1 или 2, характеризующиеся тем, что указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело.

4. Антитело или его фрагмент по п.3, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую один или более остатков аминокислот, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) Ser в положении 44,
- (b) Ala в положении 49,
- (c) Ile в положении 91,
- (d) Glu в положении 1,
- (e) Val в положении 37,
- (f) Thr в положении 40,
- (g) Asn в положении 77,
- (h) Arg в положении 94 и
- (i) Thr в положении 108 в соответствии с нумерацией по Kabat и их комбинаций.

5. Антитело или его фрагмент по п.3, содержащие вариабельную область легкой цепи, содержащую один или более остатков аминокислот, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) Ser в положении 22,
- (b) Gln в положении 42,
- (c) Ser в положении 43,
- (d) Asp в положении 60 и
- (e) Thr в положении 63 в соответствии с нумерацией по Kabat и их комбинаций.

6. Антитело или его фрагмент по п.1, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-26, или пептид, последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7-26.

7. Антитело или его фрагмент по п.1 или 6, содержащие вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27-33, или пептид, последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27-33.

8. Антитело или его фрагмент по п.1, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

9. Выделенное биспецифическое антитело, содержащее i) фрагмент антитела по любому из пп.1-8, обладающий специфичностью к белку лиганда рецептора запрограммированной гибели клеток 1 человека (PD-L1), и ii) второй антигенсвязывающий фрагмент, обладающий специфичностью к молекуле на иммунной клетке, причем указанная молекула выбрана из группы, состоящей из PD-1, CTLA-4, LAG-3, CD28, CD122, 4-1BB, TIM3, OX-40, OX40L, CD40, CD40L, LIGHT, ICOS, ICOSL, GITR, GITRL, TIGIT, CD27, VISTA, B7H3, B7H4, HEVM, BTLA, KIR и CD47.

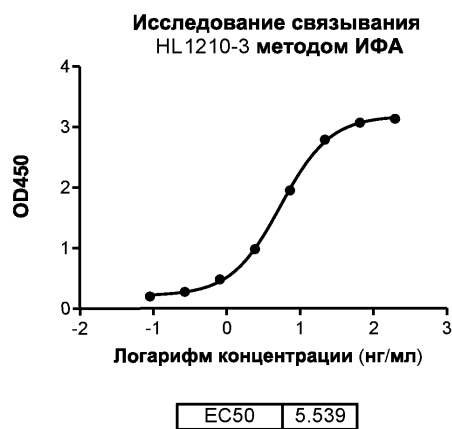
10. Полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела или его фрагмента по любому из пп.1-8, обладающего специфичностью к белку лиганда рецептора запрограммированной гибели клеток 1 человека (PD-L1).

11. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп.1-8 или биспецифического антитела по п.9 в лечении рака или инфекции у пациента, нуждающегося в этом.

12. Применение антитела или его фрагмента или биспецифического антитела по п.11, причем указанный рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака печени, рака толстой кишки,

рака прямой кишки, рака эндометрия, лейкоза, лимфомы, рака поджелудочной железы, мелкоклеточного рака легких, немелкоклеточного рака легких, рака молочной железы, рака уретры, рака головы и шеи, рака желудочно-кишечного тракта, рака желудка, рака пищевода, рака яичников, рака почек, меланомы, рака предстательной железы и рака щитовидной железы.

13. Полинуклеотид, кодирующий легкую цепь антитела или его фрагмента по любому из пп.1-8.



Фиг. 1

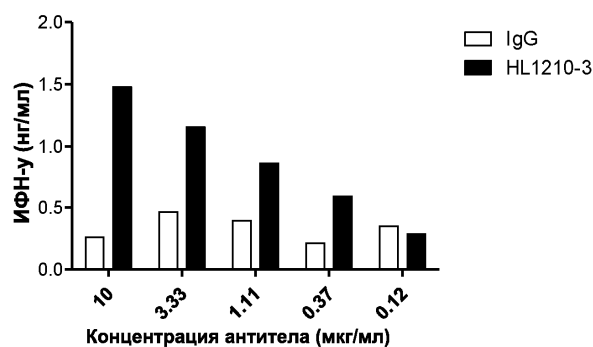


Фиг. 2

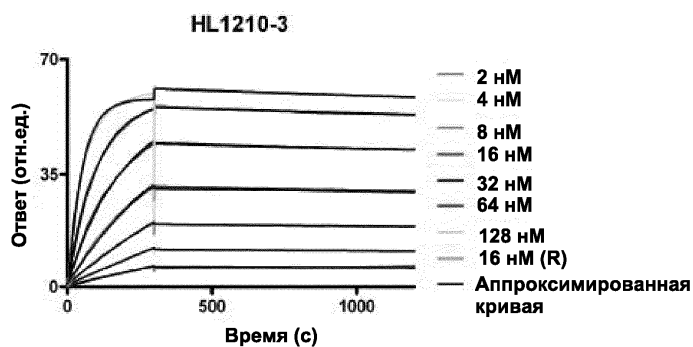


Фиг. 3

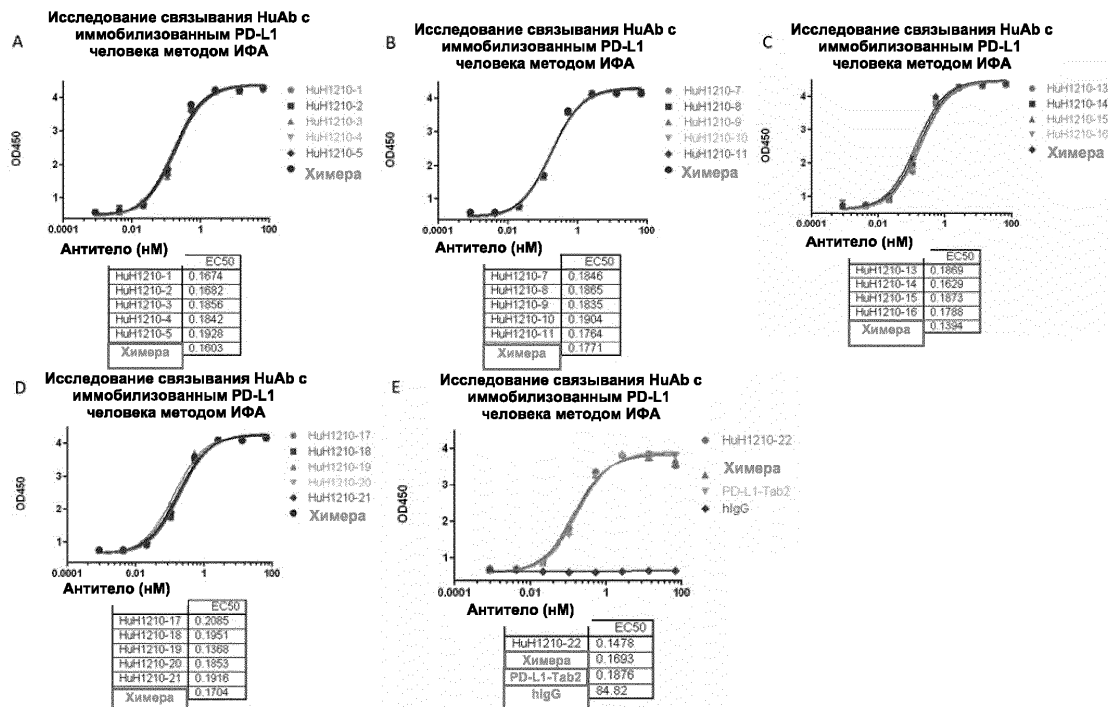
Количественное исследование с помощью
реакции смешанной культуры лимфоцитов



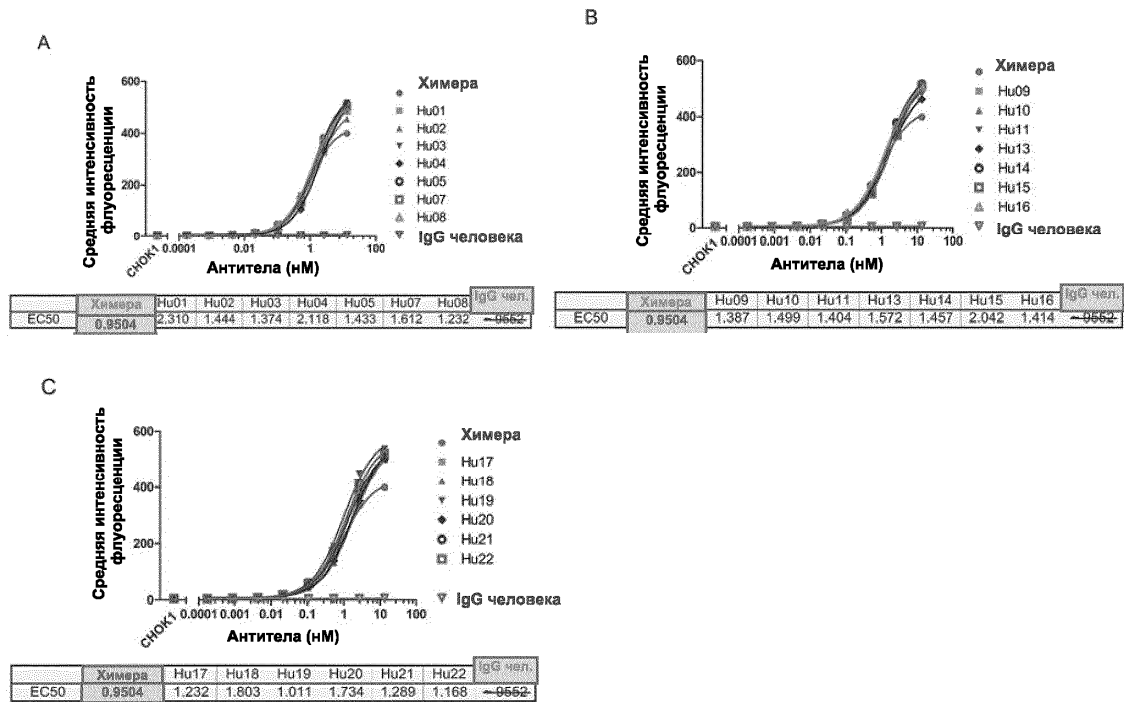
Фиг. 4



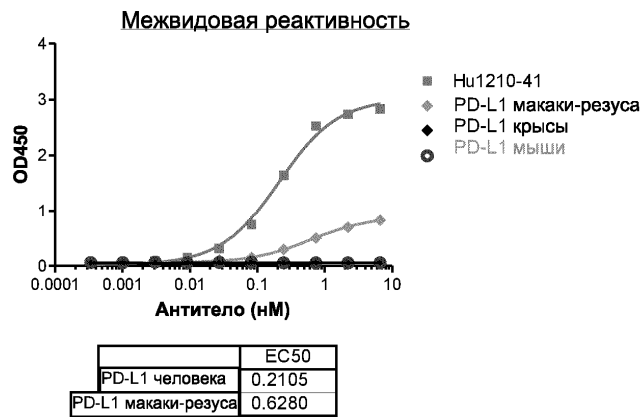
Фиг. 5



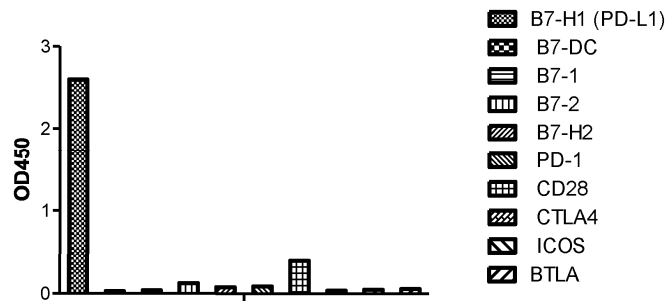
Фиг. 6



Фиг. 7

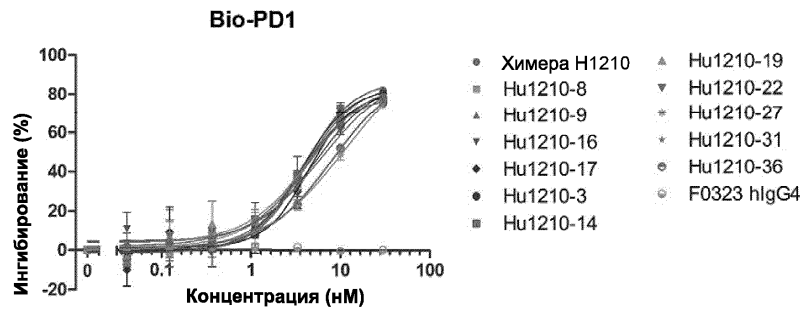


Фиг. 8



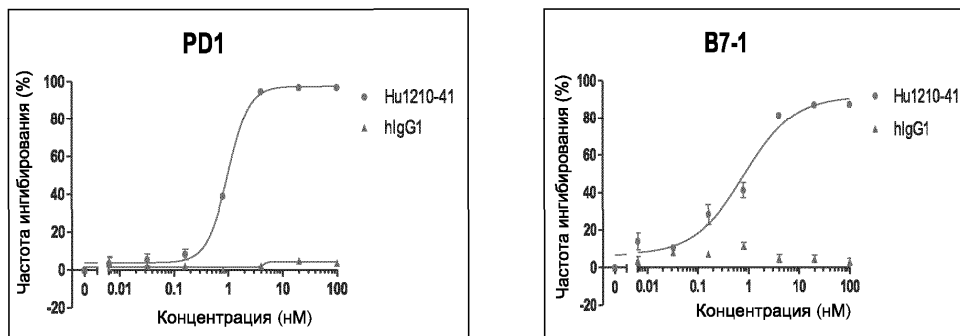
Фиг. 9

Клеточное количественное исследование
блокирования рецептора



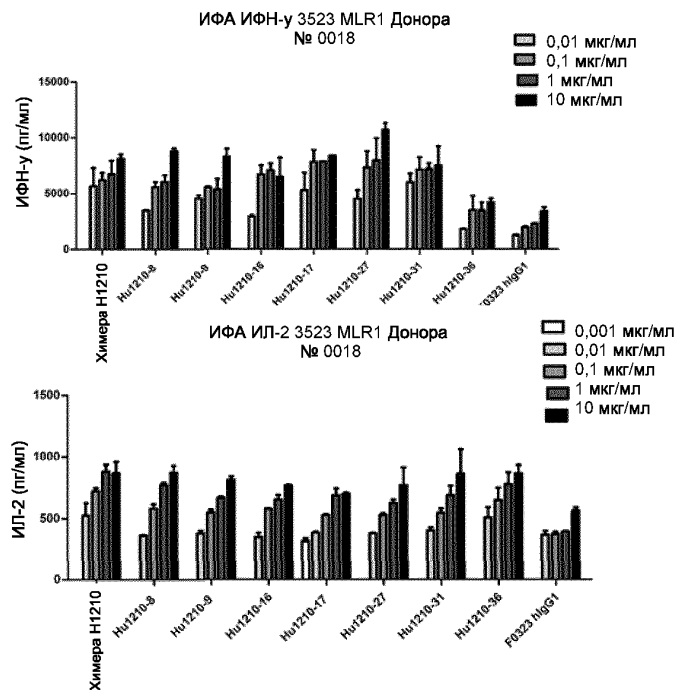
Фиг. 10

Клеточное количественное исследование
блокирования рецептора



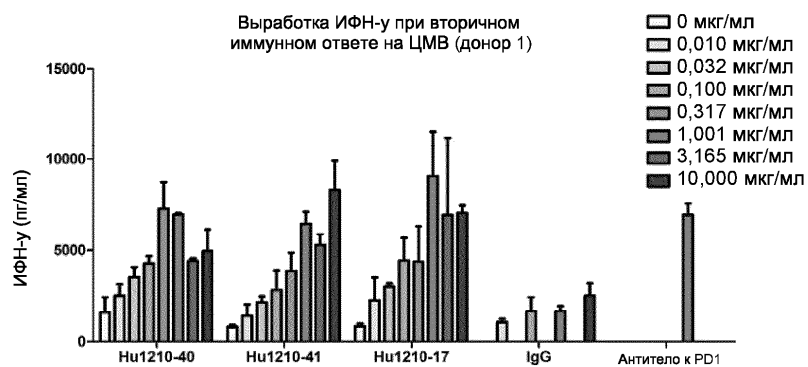
Фиг. 11

Количественное исследование с помощью
реакции смешанной культуры лимфоцитов

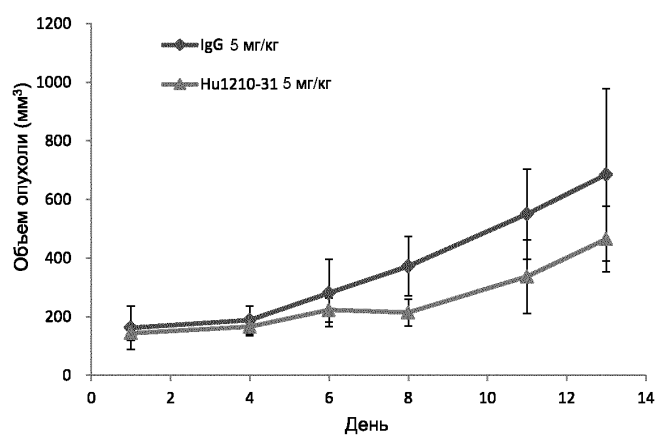


Фиг. 12

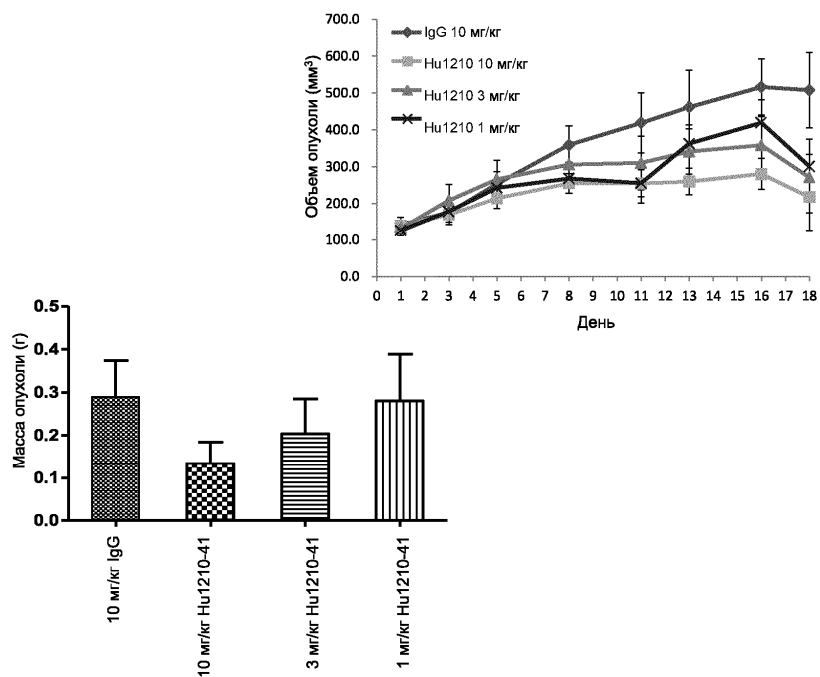
**Количественное исследование вторичного
иммунного ответа на ЦМВ**



Фиг. 13



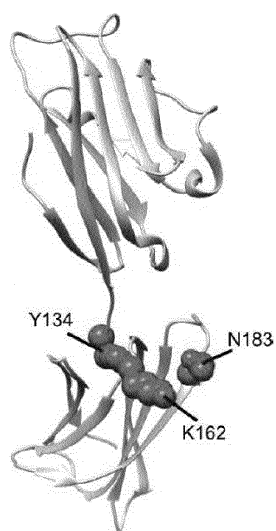
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

